

**Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích Přírodovědecká fakulta**

**Charakteristika přeměny larvální tukové tkáně v průběhu
metamorfózy u *Drosophila melanogaster***

Magisterská práce

Bc. Adéla Danielová

Školitel: Mgr. Adam Bajgar, Ph.D.

České Budějovice 2021

Danielová, A., 2021: Charakteristika přeměny larvální tukové tkáně v průběhu metamorfózy u *Drosophila melanogaster* [Characterization of remodeling of larval adipose tissue during the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. Master Thesis, in Czech] – 56 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Cílem této magisterské práce je charakterizovat morfologické a fyziologické změny larvální tukové tkáně za použití histologických technik v průběhu metamorfózy u *Drosophila melanogaster*. Vedle strukturální charakterizaci jsem se v této práci věnovala analýze exprese genů zapojených v lipolýze, mobilizaci tuků a ceramidovém metabolismu. V teoretické části se práce soustředí na souhrn dosavadních poznatků o funkci larválního tukového tělesa, vzniku lipofuscinových granul a roli genů hrajících zásadní úlohu v lipidovém a ceramidovém metabolismu. V praktické části se v magisterské práci zaměřuji na změny velikosti larválních adipocytů, charakteristiku počtu a velikosti lipofuscinových granul a zmapování velikosti a počtu lipidových kapek ve třech stádiích pupy a třech stádiích post-metamorfického vývoje dospělého. Dále se v práci soustředím na posouzení změny exprese genů zapojených v metabolismu lipidů a mobilizaci tukových zásob.

Annotation

The main aim of this master thesis is a characterization of morphological and physiological changes of larval adipose tissue in *Drosophila melanogaster* by using histological techniques. Moreover, the expression of genes involved in lipolysis, mobilization of lipids, and ceramides metabolism were analyzed. The theoretical part of this thesis provides the current knowledge about the function of the larval fat body, the formation of lipofuscin, and the role of genes involved in lipid and ceramide metabolism. In the practical part, the results of characterization of adipocytes size changes and changes of size and quantity of lipofuscin granules and lipid droplets during the metamorphosis and post-metamorphosis, are introduced. Furthermore, it involves the analysis of genes expression being essential for lipid metabolism and mobilization of lipid storage.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 7.12.2021

.....

Adéla Danielová

Poděkování

V první řadě chci poděkovat Adamovi a Gábině za jejich trpělivost, rady a čas strávený nad tím, abych se něco nového naučila. Váš přístup a nasazení k práci jsem po celých 5 let tajně obdivovala a doufám, že jsem si alespoň zlomek z toho odnesla. Snad není moc troufalé tvrdit, že vše, co jsem se doposud naučila, bylo převážně díky Vám. Zároveň chci poděkovat všem členům našim laboratoře včetně Páji, která svou přítomností umí vnést do kolektivu dobrou náladu za jakékoliv situace. Dále laborantce Lucii Hrádkové za její péči a obětavost a vedoucímu celé laboratoře doc. Tomáši Doležalovi.

Děkuji paní Mgr. Haně Sehadové, Ph.D. a paní laborantce Jitce Pflegerové z Laboratoře mikroskopie a histologie za zhotovení vzorků, za jejich rady, ochotu a za to, co mě naučily. Děkuji také Laboratoři elektronové mikroskopie za zhotovení vzorků pro TEM a jejich vlídný přístup.

Velké poděkování patří mým rodičům, kteří mě podporovali po celou dobu studia. Vždy si vyslechli moje problémy a nikdy o mně nepochybovali. Jsem si vědoma toho, že bez jejich materiální i mentální podpory by mé studium nebylo možné.

Chtěla bych poděkovat sama sobě, že jsem se dokázala motivovat a celý tohle ve zdraví dopsat.

Seznam použitých zkratk:

ABCA1 ATP-binding cassette A1

ABCG1 ATP-binding cassette A2

AC Kyselá ceramidáza

ACER Zásaditá ceramidáza

AKH adipokinetický hormon

AkhR Receptor adipokinetického hormonu

AKT Protein kináza B

AP-1 Aktivační protein 1

apo Apolipoproteiny

apoB Apolipoprotein B

apoC-II Apolipoprotein C II

ApoLPP Apolipophorin

ApoLTP Apolipoprotein lipid transport particle

ARE Antioxidant responsive element

Atg 1 Autophagy related 1

ATGL Adipose triglyceride lipáza

ATMs Makrofágy tukové tkáně

ATP Adenosin tri-fosfát

BAT Hnědá tuková tkáň

BAX Bcl-2-like protein 4, apoptotický protein

BHS Bouinova fixační tekutina

BM Bazální membrána

Bmm Brummer lipáza

BWA Brainwashing

CCAAT Protein řídící indukci a udržení adipogenese

CD36 Cluster of differentiation

CDase Ceramidáza

CerS Ceramid syntetázy

CETP Cholesterylester transferový protein
CGI-58 Comparative Gene Identification 58
CLS Crown-like structures
CO₂ Oxid uhličitý
DAG Diacylglycerol
dH₂O Destilovaná voda
DILPs drosophila insulin-like peptidy
dInR Drosophila insulin receptor
DNA Deoxyribonukleová kyselina
dNTPs Deoxinukleotid trifosfát
Dp110 Drosophila p110
ECM Extracellular matrix
EcR Ecdyson receptor
ER Endoplazmatické retikulum
EtOH Ethanol
FFAs Free fatty acids
GH Růstový hormon
GLUT4 Glukózový transportér
GS Glykogenovou syntetázu
GSK3 Glykogen synthese kinase 3
HDL High density lipoprotein
HgCl₂ Chlorid rtuťnatý
Hif1 α Hypoxii indukující faktor 1 α
Hpe Hours post eclosion
Hsl Hormon senzitivní lipáza
IDL Intermediate density lipoprotein
IGFBP7 Insuline-like growth factor binding protein 7
IGF-I Insulin-like growth factor

IL Interleukin

Iip6 Insulin-like peptid 6

ImpL2 Ekdyson inducibilní gen L2

INF Interferon

InR inzulinový receptor

IRF2 Interferon-regulační faktor

IRS Substrát inzulinového receptoru

IκKβ Inhibitor κB-kinaseβ

JH Juvenilní hormon

JNK C-Jun K-terminální kinázu

JNKs C-Jun amino-terminal kinases

LDL Low density lipoprotein

LPL Lipoproteinová lipáza

MAGL Monoacylglycerol lipáza

mTORC1 Mammalian target of rapamycin complex 1

Mtp Microsomal TAG transportní protein

MTTP Microsomal TAG transportní protein

MTTP Mikrosomální triglyceridový transferový protein

NAFLD Non-alcoholic fatty liver disease

NASH Non-alcoholic steatohepatitis

NF- κB Jaderný Faktor kappa B

Nrf2 NF-E2 p45 related factor 2 Nuclear factor, erythroid 2

nSMase Neutrální sfingomyelináza

PBS Phosphate-buffered saline

PDK1 Pyruvate dehydrogenáza (acetyl-transferring) kináza

PFA Paraformaldehyd

PG prothorakální žláza

PI3K Fosfatidyl inositol 3 kináza

PIP2 Fosfatidyl inositol -4,5- bisfosfát

PIP3 Fosfatidyl inositol -3,4,5- trifosfát

PKA CAMP-dependentní proteinová kináza A

PKA Proteinová kináza A

PKC Proteinová kináza C

PP2A Fosfatáza 2A

PPAR γ Peroxisome proliferator-activated receptor γ

PTEN Phosphatase and Tensin homolog

RG prstencová žláza

RNA Ribonukleová kyselina

ROS Reaktivní formy kyslíku

Sap-r Saposin related

SDR Secreted decoy of InR

SPT Serin palmitoyl-transferázy

SR-B1 Scavenger receptor B1

STAT1 Signální transducer a aktivátor transkripce

T2DM Diabetes mellitus typu 2

TAG Triacylglycerol

TEM Transmisní elektronový mikroskop

TLRs Toll-like receptory

TNF Tumor Necrosis Factor

TOR Target of rapamycin

UCP1 Uncoupling protein 1

Upd 3 Unpaired 3

Upd2 Unpaired2

VLDL Very-low density lipoprotein

WAT Bílá tuková tkáň

OBSAH

1	ÚVOD	1
1.1	Obecný přehled	1
1.2	Tuková tkáň savců	2
1.2.1	Role tukové tkáně	2
1.2.2	Typy tukové tkáně	4
1.3	Fyziologie jater	6
1.4	Transport a mobilizace lipidů	7
1.4.1	Lipolýza	10
1.5	Role makrofágů v játrech a tukové tkáni	11
1.6	Inzulinová rezistence	13
1.6.1	Role ceramidů v rozvoji onemocnění	13
1.7	Lipofuscin	15
1.8	<i>Drosophila melanogaster</i> jako modelový organismus	16
1.9	Mobilizace lipidů a lipolýza u <i>Drosophila melanogaster</i>	17
1.10	Inzulinová rezistence u <i>Drosophila melanogaster</i>	18
1.11	Role tukového tělesa u <i>Drosophila melanogaster</i>	19
1.12	Význam a regulace přeměny tukové tkáně u <i>Drosophila melanogaster</i>	20
1.12.1	Role makrofágů v larvální tukové tkáni	22
1.13	Ceramidový a sfiningosinový metabolismus u <i>Drosophila melanogaster</i>	23
2	CÍLE PRÁCE	26
3	MATERIÁLY A METODY	27
3.1	Práce s <i>Drosophilou</i>	27
3.2	Parafinové řezy	27
3.2.1	Příprava kukel	27
3.2.2	Fixace tkání	28
3.2.3	Odvodňovací řada	28
3.2.4	Zalítí vzorků do parafínu	29
3.2.5	Krájení vzorků	29
3.2.6	Malloryho trichrom barvení	30

3.3	Příprava vzorků pro TEM.....	31
3.3.1	Příprava skleněného nože.....	32
3.3.2	Trimování.....	32
3.3.3	Krájení a barvení polotenkých řezů.....	32
3.3.4	Příprava trvalých preparátů.....	33
3.4	Příprava tkání pro qPCR.....	33
3.5	Izolace RNA.....	34
3.6	Reverzní transkripce.....	34
3.7	qPCR.....	34
3.8	Invertovaný mikroskop.....	36
3.9	Thunder mikroskop.....	36
3.10	Transmisní elektronový mikroskop.....	37
3.11	ImageJ (Fiji).....	37
3.12	Graphpad Prism.....	37
4	VÝSLEDKY.....	39
4.1	Zmapování velikosti larválních adipocytů.....	39
4.2	Analýza počtu a velikosti lipofuscinových granul.....	40
4.3	Analýza počtu a velikosti lipidových kapek.....	44
4.4	Genová exprese vybraných genů.....	47
4.4.1	Genová exprese lipolytických genů - <i>hsl, bmm</i>	48
4.4.2	Genová exprese genů syntézy ceramidu – <i>nSMase, schlank</i>	49
4.4.3	Genová exprese genů zodpovědných za degradaci ceramidu - <i>sap-r, bwa, CDase</i>	50
4.4.4	Genová exprese genů <i>apoLTP, apoLPP, mtp</i>	52
5	DISKUSE.....	54
5.1	Změna velikosti larválních adipocytů.....	54
5.2	Změna velikosti a počtu lipofuscinových granul.....	55
5.3	Počet a velikost lipidových kapek.....	56
5.4	Expresce genů.....	57
6	ZÁVĚR.....	59
7	SEZNAM LITERATURY.....	60

1 Úvod

1.1 Obecný přehled

Drosophila melanogaster je široce využívaný modelový organismus sloužící pro studium řady lidských onemocnění od geneticky podmíněných chorob po komplexní systemické patologie spojené se ztrátou energetické a metabolické homeostáze. Právě *Drosophila melanogaster* je vhodným modelem pro výzkum systémických patologií, protože lze zkoumat tyto procesy *in vivo*, za účasti všech participujících faktorů a vlivů.

Dlouhodobým cílem našeho výzkumného týmu je zavedení *Drosophily melanogaster* jako nového experimentálního organismu pro výzkum role makrofágů v regulaci fyziologie tukové tkáně, nicméně infiltrace makrofágů do tukové tkáně drosophily nebyla doposud pozorována. Během analýzy přeměny tukového tělesa v průběhu metamorfózy jsme sledovali výraznou infiltraci tukové tkáně larválními plazmatocyty. Tyto imunitní buňky obklopují larvální adipocyty a tvoří charakteristické útvary, které jsou velmi podobné savčím „crown-like structures (CLSs)“, které jsou typickým znakem pro jaterní a tukovou tkáň pacientů trpících obezitou. Pochopení úlohy makrofágů v regulaci remodelace tukového tělesa v nepatologickém kontextu by tak mohlo vést i k pochopení jejich role v patofyziologii obezity a s obezitou spojených onemocnění.

Pro pochopení úlohy makrofágů v regulaci těchto procesů je potřeba nejprve detailně charakterizovat experimentální systém z hlediska změn morfologie, velikosti a počtu adipocytů, stejně tak jako exprese klíčových genů. Za tímto účelem jsme se zaměřili na zmapování přeměny tukové tkáně během metamorfózy *Drosophila melanogaster*. Tato práce navazuje na mou bakalářskou práci (Danielová, 2019) a detailní charakteristikou probíhajících změn by měla představovat jeden ze základních kamenů pro ustanovení *Drosophila melanogaster* jako budoucího modelu pro studium makrofágů v kontextu tukové tkáně, klíčových signálních kaskád a rozvoji inzulinové rezistence.

V této práci blíže představuji morfologii larvální tukové tkáně u *Drosophila melanogaster*, která by nám mohla pomoci objasnit procesy podílející se během metamorfózy na ztrátě larválního tuku a *de novo* formování dospělého tukového tělesa. Konkrétně se zaměřujeme na velikost larválních adipocytů, počet a velikost lipofuscinových granulí a počet a velikost lipidových kapek během tří stádií vývoje kukel (bílá prepupa, kukla P8 a kukla P 15) a tří stádií v post-metamorfickém vývoji (0 hpe (hours post-eclosion – hodiny po vykuklení), 24 hpe, 48 hpe). Na základě výskytu velkého množství

lipofuscinových granulí a změn v jejich zastoupení jsme se rozhodli pro měření míry exprese genů zapojených v metabolismu ceramidu (*schlank*, *nSMase*, *sap-r*, *CDase*, *bwa*) a k charakterizaci exprese genů zodpovědných za mobilizaci lipoproteinů (*apoLTP*, *apoLPP*, *mtp*, *bmm*, *hsl*). K dosažení výsledků byla použita řada přístupů – zhotovení histologických preparátů, mikroskopická analýza a měření genové exprese pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce.

Věřím, že naplněním cílů má tato práce potenciál přispět k pochopení doposud nedostatečně popsaných procesů přeměny tukové tkáně v průběhu metamorfózy holometabolního hmyzu a částečně by tak mohla ustanovit *Drosophila melanogaster* jako modelový organismus pro studium vlivu makrofágů na tyto procesy.

1.2 Tuková tkáň savců

Tuková tkáň představuje spolu s játry hlavní metabolický orgán v těle savců. Jejich úkolem je udržování energetické homeostázy výdejem a ukládáním energie v době nedostatku nebo nadbytku potravy (Choe *et al.*, 2016). Tuková tkáň je specializovaná tkáň skládající se z buněk adaptovaných na ukládání nadbytečných živin ve formě tuku, glykogenu a proteinových granulí. Tyto buňky jsou známé jako adipocyty (Trayhurn and Beattie, 2001). Během nadbytečného příjmu potravy dochází k ukládání energie ve formě lipidů do tukové tkáně, které mění svou velikost podle množství uložených zásob. V případě nedostatku energie je využita skladovaná energie, kdy dochází ke štěpení dříve uložených TAG (triacylglycerolů) na DAG (diacylglyceroly) (Birsoy, Festuccia and Laplante, 2013). Pro správnou funkci tukové tkáně je tak nutná její mimořádná plasticita charakteristická změnami její kapacity a regenerací.

1.2.1 Role tukové tkáně

Funkce tukové tkáně není pouze ukládání energie ve formě lipidů, ale zároveň se podílí na uvolňování endokrinních faktorů, které regulují výdej energie, pocit hladu a inzulínovou senzitivitu (Scheja and Heeren, 2019). Adipocyty sekretují hormony, které působí parakrinně i endokrinně a ovlivňují tak další orgány včetně mozku, pankreatu, jater, svalů a kardiovaskulárního systému. Jde například o peptidické hormony (adiponektin, leptin) a bioaktivní lipidy (lipokiny) (Guerre-Millo, 2002). Adiponektin a leptin jsou

hlavními endokrinními hormony, které jsou uvolňované z tukové tkáně a imunitních buněk, které je obklopují. Aktivita adiponektinu je přímo ovlivněná adiponektinovým receptorem, který je na povrchu buněk v mnoha tkáních. Role adiponektinu v buňkách je, mimo jiné, udržování inzulínové senzitivity (Lim and Jang, 2008). Vedle toho, úloha leptinu spočívá v navození pocitu hladu nebo nasycení. Nízká koncentrace leptinu navozuje pocit hladu a hraje tak klíčovou roli v regulaci příjmu potravy. Leptin tedy ovlivňuje množství uložených energetických zásob ve formě tuků a současně se podílí na udržení energetické homeostáze (Klok, Jakobsdottir a Drent, 2007).

Jako odpověď na změny v množství uložené energie je tukové těleso schopné rychle a dynamicky měnit počet adipocytů (hyperplazie) nebo jejich velikost (hypertrofie). Tyto změny přispívají k udržení funkce tukové tkáně a souhrnně se označují jako přeměna tukové tkáně (Choe *et al.*, 2016). Hyperplazie i hypertrofie jsou regulovány environmentálními a genetickými faktory. Poruchy v proměně tukové tkáně mohou vést k nesprávné regulaci sekrece metabolitů, cytokinů a hormonů. Tento stav je typický pro obézní pacienty. V obézní tukové tkáni lze najít oba typy mechanismů zvětšování tukových zásob. Hyperplazii předchází proces, který je regulovaný různými transkripčními faktory a hormony. Zásadní roli na adipogenesi mají peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) a protein řídící indukci a udržení adipogenese (CCAAT) (Wu *et al.*, 1999). Hyperplazie tukové tkáně je charakteristická nízkým množstvím unikajících volných mastných kyselin (FFAs) z adipocytů, nízkou expresí a sekrecí pro-zánětlivých cytokinů, tedy faktorů, které stojí za rozvojem inzulínové resistance (Choe *et al.*, 2016).

Hypertrofní tuková tkáň se vyznačuje zvětšováním velikosti adipocytů. Hypertrofické adipocyty vykazují zvýšenou expresi a sekreci pro-zánětlivých cytokinů, jde například o tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 6 (IL6), interleukin 8 (IL8) a monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) (Jernås *et al.*, 2006). Pro-zánětlivý stav vede k infiltraci tukové tkáně imunitními buňkami. Jde především o makrofágy a T lymfocyty. Přítomnost imunitních buněk indukuje zánětlivou reakci v tkáni (Ye *et al.*, 2007). Současně hypertrofované adipocyty indukují aktivaci transkripčního faktoru *HIF1 α* (*Hypoxia-Inducibilního Faktoru 1*) v makrofázích, který je zodpovědný za rozvoj hypoxie a fibrózy v tukové tkáni a šíření zánětlivé reakce v obézní tukové tkáni (Halberg *et al.*, 2009). Dalším znakem hypertrofických adipocytů je aktivace lipolýzy, jejíž aktivita je zvýšena kvůli velkému množství unikajících FFAs. Nadměrné množství FFAs uvolněné z obézní tukové tkáně je ukládáno v jiných orgánech, především ve svalech a játrech. Ukládání FFAs

v jiných orgánech může vyústit v rozvoj ektopické akumulace lipidů a vznik lipotoxicity (Slawik and Vidal-Puig, 2006).

Kromě indukce zánětu v tukové tkáni se přítomnost zvýšeného množství TNF α společně s FFAs podílí na vzniku inzulinové rezistence. V rozvoji inzulinové rezistence hraje zásadní roli dráha c-Jun amino-terminal kinases (JNKs), která je aktivovaná právě prozánětlivými faktory a FFAs. Aktivita JNKs dráhy je zvýšená u obézních pacientů v buňkách jater, svalů a tukové tkáně (Hirosumi *et al.*, 2002).

1.2.2 Typy tukové tkáně

Tuková tkáň savců se rozděluje na bílou tukovou tkáň (WAT) a hnědou tukovou tkáň (BAT). Zásadními rozdíly mezi WAT a BAT jsou energetický metabolismus a velikost lipidových kapek.

Pro adipocyty WAT je charakteristická variabilní velikost závislá na velikosti jednotlivých lipidových kapek, které zabírají až 90 % obsahu buňky. V lipidových kapkách jsou uloženy lipidy ve formě triglyceridu, který je využíván v případě nároků organismu na zvýšený výdej energie. Velikost lipidových kapek v adipocytech bílé tukové tkáně se liší na základě toho, zda buňka preferuje anabolický proces, kdy jsou lipidové kapky větší, nebo katabolický proces, při kterém je přítomno mnoho malých kapek. Malou velikostí lipidových kapek je zvětšen jejich povrch a stávají se tak dostupnějšími pro lipolytické enzymy (lipázám) (Heid *et al.*, 2014; Suzuki, Shinohara, Ohsaki, & Fujimoto, 2011). Mitochondrie v adipocytech bílé tukové tkáně mají protáhlý tvar a jejich množství je velmi variabilní. Bílou tukovou tkání je produkován adipokinetický hormon leptin (Saely, Geiger and Drexel, 2012).

Naproti tomu BAT je adaptovaná pro výdej energie za účelem produkce tepla. K této funkci je přizpůsobená morfologie adipocytů BAT, které obsahují mnoho malých tukových kapek a velké kulaté mitochondrie, které mají větší početní zastoupení než adipocyty WAT. Právě kvůli vysoké koncentraci mitochondrií má BAT typické hnědé zbarvení. Pro mitochondrie hnědých adipocytů je charakteristická laminárně uspořádaná vnitřní membrána, která je přizpůsobena pro zvýšenou produkci ATP, který je využíván jako zdroj energie pro produkci tepla (Zoico *et al.*, 2019). Na vnitřní membráně mitochondrií BAT se nachází uncoupling protein 1 (UCP1), který je aktivován chladem nebo hladověním a je zodpovědný za generování tepla (Villarroya, Iglesias and Giralt, 2007). Dalším

charakteristickým znakem hnědé tukové tkáně je výrazné zastoupení kapilár kvůli zvýšeným požadavkům tkáně na přísun dostatečného množství kyslíku. Vzhledem ke své funkci je BAT přítomná především u malých savců a novorozenců, u dospělých lidí se vyskytuje pouze v minimálním množství u jedinců, kteří jsou dlouhodobě vystavováni chladu (van Marken Lichtenbelt, 2012).

Významnou roli hraje BAT u savců, kteří prodělávají hibernaci, během níž je z adipocytů hnědé tukové tkáně generováno teplo po celou dobu nehybnosti. Teplo získané z BAT se uplatňuje hlavně pro znovunastolení tělesné teploty hibernujícího organismu, který je po celou dobu hibernace udržován v hypotermické nečinnosti. Před hibernací dojde ke zvýšení obsahu lipidů v tukové tkáni, které jsou využívány v jejím průběhu. Zásoby lipidů se hromadí v hnědé i bílé tukové tkáni. Lipidy z WAT jsou využívány jako zdroj energie pro udržení životních funkcí organismu (Ballinger and Andrews, 2018).

Vedle bílých a hnědých adipocytů můžeme v tukové tkáni najít běžové adipocyty, které se běžně vyskytují mezi adipocyty bílé tukové tkáně. Fenotyp běžových adipocytů se může za určitých podmínek (dlouhodobé vystavení chladu) změnit na fenotyp typický pro adipocyty hnědé tukové tkáně. Proces přeměny běžových na hnědé adipocyty se označuje jako „hnědnutí“ a jeho součástí je zvýšení exprese UPC1 na vnitřní mitochondriální membráně v měnících se adipocytech (Wu *et al.*, 2012).

Kromě odlišné morfologie adipocytů může být tuková tkáň savců rozdělena podle umístění v těle. Jde o rozdělení na viscerální a subkutánní tuk. Subkutánní tuk tvoří vrstvu podkožního tuku, který odděluje pokožku a svaly. Viscerální tuk obklopuje vnitřní orgány, kterým poskytuje termo izolační vrstvu a chrání je před fyzickým poškozením. Viscerální tuk se hromadí především okolo jater, střev a ledvin. (Sanchez-Gurmaches, Hung and Guertin, 2016). Lipidovou vrstvu obklopující vnitřní orgány můžeme dále rozdělit na epikardiální, perirenální, pericaskulární, periorganovou a omentální tukovou tkáň (A. Park, 2014).

Ukládání tuků mimo tukovou tkáň vlivem nadměrného množství energeticky bohatých látek vede k nesprávné regulaci sekrece metabolitů, cytokinů a hormonů. Tento stav je typický pro obézní pacienty a vede k rozvoji řady poškození, které mají vliv na systemický metabolismus. Klíčovou roli ve vzniku patologických onemocnění, které jsou spojené s obézní tukovou tkání, hrají makrofágy. Tyto imunitní buňky se zásadně podílejí například na rozvoji inzulinové rezistence, která je spojená s mnoha onemocněními, jako je například diabetes mellitus typu 2 (T2DM) a aterosklerózou. Nadměrné uvolňování lipidových zásob

z tukové tkáně může mít vedle zmíněných metabolických onemocnění negativní dopad také na ostatní orgány zapojené v metabolismu živin, jako jsou například játra.

1.3 Fyziologie jater

Společně s tukovou tkání jsou játra hlavním metabolickým orgánem savců. Játra se podílejí na metabolismu cukrů, proteinů a tuků a hrají významnou roli pro udržování energetické homeostáze například regulací hladiny glukózy a lipoproteinů v krvi. Nadbytek glukózy je ukládán v játrech ve formě glykogenu, který je využíván k pokrytí akutní potřeby energie v případě poklesu hladiny cukru. Vedle toho se v játrech uskladňují některé vitamíny (B12, A) a minerály (železo, měď) (Alamri, 2018). Játra se uplatňují během metabolismu proteinů, kdy jaterní buňky (hepatocyty) mění aminokyseliny tak, aby mohly být využity jako zdroj energie (Mitra and Metcalf, 2009). Během metabolismu proteinů vzniká jako vedlejší produkt toxický amoniak, který játra konvertují na netoxickou ureu (močovinu). Urea se stává součástí močovinového cyklu, který odbourává přebytečný dusík z těla (Alamri, 2018).

Játra hrají klíčovou roli v metabolismu lipidů, kdy slouží jako centrum syntézy mastných kyselin a lipoproteinů, čímž zprostředkovávají cirkulaci lipidů v těle organismu. Regulace procesů lipidového metabolismu je stěžejní pro zachování energetické homeostáze. V případě akumulace lipidových kapek uvnitř hepatocytů může dojít k rozvoji jaterní steatózy, která se vyznačuje poškozením některých metabolických funkcí jater, jako jsou například změny v beta oxidaci, v sekreci very low-density lipoproteinů (VLDL) a změny v syntéze mastných kyselin (Nguyen *et al.*, 2008). Během steatózy dochází v ER hepatocytů k hromadění kolagenu, proteoglykanů a dalších makromolekul. Zároveň jsou aktivované imunitní buňky zodpovědné za spuštění pro-zánětlivé reakce v tkáni a dochází tak k rozvoji non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Dlouhodobá přítomnost proti-zánětlivých cytokinů může vést k fibróze jater, která nevratně snižuje jejich funkčnost (Heyens *et al.*, 2021).

Narušení homeostáze lipidů uvnitř jater může vyústit v akumulaci TAG, což je charakteristické pro soubor onemocnění nazývaných jako ztučnění jater (non-alcoholic fatty liver disease – NAFLD). Ztučnění jater je doprovázeno změnami v metabolismu lipidů jako například zvýšený příjem FFAs hepatocyty, zvýšení *de novo* lipogeneze, redukce sekrece VLDL, které transportují TAG z jater a snížení oxidace FFAs (Grefhorst *et al.*, 2021). K tomuto stavu může dojít vlivem nemožnosti ukládat FFAs do tukové tkáně a dochází

k ektopickému skladování v játrech a v menším množství ve svalové tkáni (Polyzos, Perakakis and Mantzoros, 2019).

Vlivem ektopického ukládání FFAs a oxidativního stresu může docházet k chybné regulaci lipidového metabolismu a ukládání lipidů v játrech, kde způsobují jejich poškození a zánět. Hromadění lipidů uvnitř hepatocytů vede ke snaze o snížení množství lipidových kapek pomocí lipofagie. Nesprávná regulace lipofagie je spojená s rozvojem NAFLD. Lipofagie je katabolický proces odbourání lipidů, jde o druh autofagie, která probíhá specificky pro degradaci lipidových kapek (Grefhorst *et al.*, 2021). Během autofagie dojde k obalení buněčného materiálu, který je určený k degradaci, plazmatickou membránou za vzniku fagoforu, který expanduje a vytváří dvojitou membránu a vzniká autofagosomu. Autofagosom je přepraven k lysozomům, kde dojde ke splynutí, obsah autofagosomu je natráven pomocí lytických enzymů a zrecyklované zbytky jsou vráceny zpět do cytoplazmy (Ward *et al.*, 2016). Současně s lipofagií ve ztučněných játrech dochází k rozvoji zánětu vlivem infiltrace monocytů (především makrofágů), které v místě způsobují inzulinovou rezistenci. Během inzulinové rezistence není potlačovaná lipolýza inzulinem (viz 1.4.1 Lipolýza) a dochází k chronicky zvýšenému množství FFAs, což je jeden z hlavních příznaků rozvoje ztučnění jater (Grefhorst *et al.*, 2021).

Vedle své metabolické funkce jsou játra zodpovědná například za syntézu některých hormonů a detoxikaci organismu. Během detoxikace neutralizují široké spektrum toxických látek, které vznikají jako vedlejší produkty reakcí v těle organismu nebo jsou přijímány externě. Uvnitř jater dochází k filtrování krve a k syntéze a sekreci žluči, která se uplatňuje při trávení lipidů a je tak důležitá pro zpracování toxinů rozpustných v tucích. Současně s tím jsou v játrech enzymaticky neutralizovány nežádoucí chemické látky (Grant, 1991).

1.4 Transport a mobilizace lipidů

Lipidy jsou transportovány v podobě TAG a cholesteryl esterů a k jejich mobilizaci slouží plazmatické proteiny za vzniku lipoproteinů (chylomikrony, VLDL, LDL, IDL, HDL, chylomikronové zbytky) (Spector, 1984). Na složení lipoproteinů se podílí mikrosomální triglyceridový transferový protein (MTTP) společně s interakcí s apoB (apolipoproteinem B). MTTP se nachází uvnitř ER a je zodpovědný za transport lipidů do formujících se lipoproteinů (Wetterau *et al.*, 1992; Swift *et al.*, 2003).

Významnou roli během transportu lipidů hrají chylomikrony, které obsahují až 90 % TAG, zbytek je tvořen fosfolipidy, cholesterolem a proteiny. Chylomikrony jsou přítomny v buňkách střev a mimo přenosu TAG a cholesterolu (ten je dopravován jako cholesteryl ester) se podílejí na transportu vitamínů rozpustných v tucích (A, D, E, K). Hlavním úkolem chylomikronů je přenos lipidů v podobě TAG a cholesteryl esterů do krevního oběhu a jejich dopravení do tkání, nejčastěji jde o tukovou tkáň, játra a v menší míře i svaly (Gofman *et al.*, 1950). Ve chvíli, kdy jsou chylomikrony dopraveny k cílové tkáni, aktivují extracelulární enzym – lipoproteinovou lipázu (LPL) (Goldberg *et al.*, 1990). LPL je přítomná ve stěně kapilár většiny tkání, největší zastoupení má právě v tukové a svalové tkáni a je zodpovědná za hydrolyzu TAG dopravené lipoproteiny. TAG je hydrolyzován na dvě molekuly FFAs a jednu molekulu monoacylglycerolu. Vzniklé FFAs jsou ukládány do cílové tkáně (Mead, Irvine and Ramji, 2002). V případě nutnosti využití lipidových zásob dojde k uvolnění FFAs z tukové tkáně do plazmy, kde tvoří komplex s plazmatickou bílkovinou albuminem a v této formě jsou dopravovány k cílovým tkáním (játra, svaly) (Spector, 1984).

Na mobilizaci lipidů z tukové tkáně se podílejí VLDL, které transportují TAG, fosfolipidy, cholesterol a cholesteryl estery a ceramidy. VLDL jsou sekretovány játry do krve jako nativní VLDL a obsahují apolipoproteiny (apo) B100, C1 a E, cholesterol, cholesteryl estery a TAG (Gibbons *et al.*, 2004). Apolipoprotein B je zásadní pro přichycení lipidů na lipoprotein a pro jeho správnou funkci je klíčový MTTP (Tanoli *et al.*, 2004). Tím, jak VLDL postupují krevním oběhem, získávají od high-density lipoproteins (HDL) apoC-II a dodatečný apoE, tímto krokem se z nativních VLDL stávají maturované VLDL, které díky přítomnosti apoC-II aktivují LPL v kapilárách konkrétních tkání (tuková, srdeční a svalová) (Jong, Hofker and Havekes, 1999). Lipáza z VLDL odstraní TAG, který je uskladněný nebo využitý jako zdroj energie. Po aktivaci lipázy VLDL vrací zpět apoC-II na HDL. Přes cholesterylester transferový protein (CETP) se z HDL na VLDL dále přenáší cholesteryl estery výměnou za fosfolipidy a TAG. Všechny zmíněné procesy v podobě výměn různých částí lipoproteinů vedou ke změně složení původních VLDL, ze kterých se stávají intermediate-density lipoproteins (IDL) a low-density lipoproteins (LDL) (Oi *et al.*, 1999). Správně regulovaný přenos a odbourání VLDL je zásadní pro udržení lipidové homeostáze v organismu. Zvýšené množství sekrece VLDL játry je charakteristické pro obezní pacienty a může vést k rozvoji metabolického syndromu (Willebrords *et al.*, 2015).

Kolem 50 % IDL je rozpoznáno receptory hepatocytů (kvůli přítomnosti apoB-100 a apoE) a podstupují endocytózu. Druhá polovina IDL ztratila apoE v důsledku většího obsahu

cholesterolu než TAG a stává se tak nerozpoznatelnou pro receptory jaterních buněk. Z těchto IDL se stávají LDL (Shelness and Sellers, 2001).

Odštěpením TAG z VLDL pomocí lipoproteinové lipázy dojde ke změně poměrů mezi TAG a cholesterolem v původní molekule VLDL, kdy cholesterolu je více a z VLDL se stává LDL, které hraje zásadní roli v transportu cholesterolu (Lafontan and Langin, 2009). LDL jsou sekretovány v játrech, odkud se dostávají do oběhu a transportují cholesterol a ceramidy do periferních tkání (Horton, Cuthbert and Spady, 1993). Na povrchu buněk (především hepatocytů a buněk periferních tkání) je exprimován LDL receptor, přes který se cholesterol procesem endocytózy dostává do buněk. Až 70 % cholesterolu z krve je odstraňováno játry, která regulují syntézu LDL receptoru podle množství cholesterolu uvnitř hepatocytů. Ve chvíli akumulace cholesterolových zásob uvnitř hepatocytů klesá množství receptorů v jejich plazmatické membráně a dochází tak k ukládání cholesterolu mimo játra. Role LDL receptoru je tedy klíčová pro udržování stálé hladiny LDL cholesterolu v krvi (Leren, 2014). Nadměrné množství LDL cholesterolu v krvi a jeho nedostatečné odbourávání vede k ukládání na stěny artérií (Lebeau *et al.*, 2019). Toto místo nahromadění LDL cholesterolu v cévách rozpoznávají jako první monocyty (makrofágy a dendritické buňky). Makrofágy se snaží zachytávat uskladněný cholesterol ze stěn cév a tím zvětšují svůj objem. Uvnitř makrofágů přibývá cytoplazmatických váčků, ve kterých se zvyšuje obsah lipidů a buňky tak získávají charakteristický fenotyp – „foam cells“ (Yu *et al.*, 2013). V této chvíli dochází k metabolické aktivaci makrofágů, které začínají sekretovat chemokiny a prozánětlivé cytokiny (IL-1, IL-6, TNF) (Bobryshev *et al.*, 2016). Dlouhodobá přítomnost prozánětlivých cytokinů zvyšuje riziko rozvoje chronického zánětu – aterosklerózy, která má za následek vznik řady kardiovaskulárních komplikací (zvýšení krevního tlaku, vyšší riziko mrtvice, poškození cév a srdce) (Ivanova *et al.*, 2017).

Uskladňování LDL cholesterolu v artériích se snaží eliminovat HDL. Tento proces je označován jako reverzní cholesterolový transport (Zhao, Van Berkel and Van Eck, 2010). HDL transportuje cholesterol z makrofágů na stěně artérií zpět do jater, kde je využitý pro produkci žluči. Přenos cholesterolu mezi makrofágy a játry je zprostředkován přes ATP-dependentní transmembránové transportní proteiny (ABCA1 a ABCG1) na makrofázích, na které se váže HDL (Zhou *et al.*, 2015). Pro transport cholesterolu do buněk je potřeba vazba HDL na scavenger receptor B1 (SR-B1), který je exprimován na povrchu buněk (Marques *et al.*, 2019).

Vedle chylomikronů se na transportu lipidů podílejí chylomikronové zbytky, které přenášejí cholesterol ze střeva do jater. Chylomikronové zbytky také vznikají po odevzdání TAG do cílové tkáně, kterou dopravila chylomikronové částice. Současně s odstraněním TAG se chylomikron zbavuje i apoC-II, je dále nerozpoznatelný pro LPL a stává se tak chylomikronovým zbytkem, na jehož povrchu je stále přítomný apoE, který je klíčový pro identifikaci hepatocyty a následnou endocytózu a degradaci (Cooper, 1997).

1.4.1 Lipolýza

Během období, kdy je tělo organismu vystaveno nedostatečnému příjmu potravy nebo na něj jsou kladeny vysoké energetické nároky (během hladovění, zvýšené fyzické aktivity, období hibernace u některých savců), mění organismus metabolické procesy pro zajištění energie potřebné pro přežití. V těchto momentech dochází k lipolýze a mobilizaci lipidových zásob z tukového tělesa. V adipocytech se na rozštěpení TAG na FFAs a glycerol podílí tři lipázy – adipose triglyceride lipase (ATGL), hormon sensitive lipase (HSL) a monoacylglycerol lipase (MAGL) (Soeters *et al.*, 2012). Aktivita lipáz je regulována cAMP-dependentní proteinovou kinázou A (PKA), která je zodpovědná za jejich fosforylaci. Lipázy musí překonat vysoce hydrofobní prostředí, k čemuž jim slouží proteiny navázané na povrchu lipidových kapek (Lafontan and Langin, 2009). Proteinový obal lipidových kapek je tvořen perilipiny. V procesu lipolýzy hraje zásadní roli protein perilipin A, který je fosforylovaný pomocí PKA a jeho aktivní forma se dostává na povrch lipidových kapek, kde tvoří vazebné místo pro lipázy a tím umožňuje lipolýzu (Brasaemle *et al.*, 2009). Během obezity, kdy dochází k hypertrofii adipocytů, se zmenšuje povrch, se kterým by lipázy mohly reagovat a je tak omezená jejich funkce (Karpe, Dickmann and Frayn, 2011).

Vedle PKA je lipolýza regulovaná inzulinem a katecholaminy. Inzulin blokuje aktivitu HSL, kdy reguluje nejen její transkripci ale také post-transkripční fosforylaci. Zároveň inzulin nepřímo kontroluje expresi lipázy regulací aktivity růstového hormonu (GH) (Lan *et al.*, 2019). GH přímo stimuluje lipolýzu a je sekretován v případě hladovění, naopak po přijetí potravy dochází k inhibici jeho uvolňování. Katecholaminy jsou zodpovědné za produkci cAMP, která aktivuje PKA a dojde k fosforylaci perilipinu a HSL. Aktivované perilipiny vedle umožnění lipolýzy, uvolňují protein comparative gene identification 58 (CGI-58), který se váže na ATGL a aktivuje enzymy zodpovědné za hydrolyzu TAG (Lafontan and Langin, 2009).

Samotná lipolýza dá vzniknout třem molekulám FFAs a jedné molekule glycerolu. FFAs jsou dopraveny do hepatocytů, svalových a srdečních buněk (Lafontan and Langin, 2009). Vzniklý glycerol je transportován do jater, kde slouží jako prekurzor pro syntézu TAG a fosfolipidů (Rotondo *et al.*, 2017).

Ačkoli byla role makrofágů doposud zmíněna jen okrajově, hrají v biologii mobilizace tuku klíčovou roli a jejich infiltrace tukové tkáně, jater i arteriální stěny je charakteristickým průvodním jevem s obezitou spojených patologií, proto se jejich vlivu budu věnovat detailněji v následující kapitole.

1.5 Role makrofágů v játrech a tukové tkáni

Makrofágy jsou fagocytující imunitní buňky, které hrají nezastupitelnou roli v detekci a eliminaci patogenu a rozvoji imunitní odpovědi. Současně makrofágy plní úlohu v likvidaci starých nebo poškozených buněk a tím přispívají k udržení homeostáze v dané tkáni a brání tak rozvoji zánětu (Mosser, Hamidzadeh and Goncalves, 2021). Pro rozpoznání bakterií a jiných mikroorganismů slouží řada receptorů na povrchu makrofágů, klíčové z nich jsou Toll-like receptory (TLRs), které specificky rozpoznávají části patogenu (sacharidy, DNA, RNA nebo extracelulární proteiny) (Vural, Shi and Kehrl, 2015). Makrofágy jsou buňky s výraznou heterogenitou, což lze pozorovat na jejich morfologii nebo na typu patogenu, který jsou schopné rozpoznat a na úrovni zánětlivých cytokinů, které produkují (Mosser, Hamidzadeh and Goncalves, 2021). Variabilita makrofágů je také závislá na jejich vývoji a na tom z jakých prekurzorů se makrofágy diferencují. Tyto prekurzory mohou pocházet z embryonální hematopoetické tkáně nebo z kostní dřeně (Ginhoux and Jung, 2014).

Na základě rozpoznávaného stimulu dojde k aktivaci makrofágů, podle které lze makrofágy rozdělit na M1, které jsou aktivovaná klasickou cestou a M2 aktivované alternativě. M1 makrofágy jsou aktivované přítomností patogenu (například bakterií), na který makrofágy reagují expresí transkripčních faktorů jako jsou interferon-regulační faktor (IRF5), jaderný faktor kappa B (NF- κ B), aktivační protein 1 (AP-1) a STAT1 (Liu *et al.*, 2014). Aktivací exprese zmíněných faktorů dochází k sekreci pro-zánětlivých cytokinů (INF γ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 a TNF α), které jsou klíčové pro vyvolání imunitní odpovědi (Mosser and Edwards, 2008). Správná regulace produkce cytokinů je zásadní pro udržování homeostáze a jejich nerovnováha může vést k cytokinové bouři, která má za následek rozvoj

patogenetických stavů a sepse (Wynn and Vannella, 2016). Vedle produkce cytokinů se zvýší i produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíkatých radikálů (RNS) (Mosser and Edwards, 2008). Alternativně aktivované M2 makrofágy se uplatňují během hojících procesů a inhibují aktivitu M1 makrofágů. M2 makrofágy se vyznačují proti-zánětlivou reakcí, která je charakteristická přítomností cytokinů IL-4 a IL-13. Vlivem působení proti-zánětlivých cytokinů může dojít k rozvoji fibrózy tkáně, která negativně ovlivňuje její funkci (Hill, Reid Bolus and Hasty, 2014). V aktivaci makrofágů alternativní cestou na M2 makrofágy se uplatňuje hormon adiponektin sekretovaný tukovou tkání. Adiponektin je zásadní pro udržení inzulínové senzitivity a jeho aktivita je inhibována přítomností pro-zánětlivých cytokinů, jejichž výskyt je typický v obézní tukové tkáni (Bruun *et al.*, 2003; Engeli *et al.*, 2003).

Vedle své imunitní funkce hrají makrofágy klíčovou roli v rozvoji inzulínové rezistence v odpovědi na nadbytečné množství lipidů v tkáni. Nejčastěji jde o tkáň jater, kde jsou rezidentní makrofágy označovány jako Kupfferovy buňky a o tukovou tkáň, kde jsou pojmenovány jako adipose tissue macrophages (ATMs) (Choe *et al.*, 2016). ATMs mají svou úlohu i v neobézní tukové tkáni, kdy jsou zodpovědné za odstranění umírajících nebo mrtvých buněk pomocí efferocytózy, vyrovnávání hladiny lipidů a angiogenezi (Schipper *et al.*, 2012). Biologickou a funkční blízkost makrofágů a adipocytů v tukové tkáni lze ukázat na schopnosti preadipocytů (progenitory budoucích adipocytů) diferencovat na makrofágy a naopak, kdy jsou makrofágy schopné diferenciaci v preadipocyty (Charrière *et al.*, 2003; Chazenbalk *et al.*, 2011).

Obézní tuková tkáň se vyznačuje zvětšením objemu adipocytů, které se stávají hypertrofickými a dále nerovnováhou mezi M1 a M2 makrofágy. Zvětšování velikosti adipocytů vede k infiltraci M1 makrofágů a omezení angiogeneze a rozvoji hypoxie v dané tkáni. Hypertrofické adipocyty jsou následkem adaptace na nadbytek lipidů (Muir *et al.*, 2016). Hypertrofické adipocyty vykazují sníženou inzulínovou senzitivitu vlivem zvýšené syntézy a snížené degradace extracelulární matrix (ECM), která se váže na receptory adipocytů (integriny) a tvoří tak fyzickou bariéru pro inzulín. Inzulín za normálních podmínek inhibuje lipolýzu a v případě snížení inzulínové senzitivity tedy dochází ke zvýšení aktivity lipolytických enzymů, během které jsou uvolňovány FFAs (Williams, Kang and Wasserman, 2015). Na uvolněné FFAs reagují makrofágy migrací do tukové tkáně, kde kolem hypertrofických adipocytů začínají vytvářet charakteristické útvary nazývané jako crown-like structures (CLS), které obklopují adipocyty ve snaze zabránit lipotoxicitě (Cinti *et*

al., 2005). Makrofágy na svém povrchu exprimují scavenger receptor CD36, který slouží k zachytávání FFAs (Y. M. Park, 2014). Během zachytávání lipidů získávají makrofágy charakteristický fenotyp („foam cells“). Uvnitř makrofágů jsou pozorovatelné specializované organely – multilamelární tělíska, která vznikají po natrávení lipidů lysozomy (Schmitz and Müller, 1991). Akumulací FFAs uvnitř makrofágů dochází k jejich metabolické aktivaci na M1 makrofágy a k expresi pro-zánětlivých cytokinů, které jsou zodpovědné za rozvoj inzulinové rezistence, chronického zánětu a hypoxie. Tyto stavy jsou typické pro souhrn onemocnění označovaných jako metabolický syndrom (jde například o obezitu, T2DM, aterosklerózu nebo ztuhnutí jater) (Cancello *et al.*, 2006). Obezita je asociovaná s akumulací ceramidů v tukové tkáni, kde přispívají k rozvoji inzulinové rezistence a jsou tak významnými hráči při vývoji onemocnění T2DM (Turpin-Nolan and Brüning, 2020).

1.6 Inzulinová rezistence

Inzulinová rezistence je stav narušení normální hladiny glukózy v krvi. Inzulin je zodpovědný za celou řadu klíčových procesů v těle organismu (růst, proliferace buněk, metabolismus atd.) (Rahman *et al.*, 2021). Role inzulinu je zásadní pro absorpci a metabolismus glukózy v tkáních. Signální dráha inzulinu je závislá na navázání molekuly inzulinu na podjednotku inzulinového receptoru v membráně buněk (Wilcox, 2005). Po navázání inzulinu dojde k autofosforylaci inzulinového receptoru za vzniku tyrosinových zbytků, které jsou zodpovědné za fosforylaci (aktivaci) substrátu inzulinového receptoru (IRS). Na aktivní IRS se váže fosfatidyl inositol 3 kináza (PI3K) a dochází k fosforylaci fosfatidyl inositol -4,5- bisfosfát (PIP2) na fosfatidyl inositol -3,4,5- trifosfát (PIP3). Po fosforylaci určitého množství PIP3 jsou rekrutovány proteiny (PDK1 a AKT) k plazmatické membráně, kde je AKT aktivován pomocí PDK1 (Niba *et al.*, 2013). Aktivní AKT v hepatocytech inhibuje glykogen syntetázu 3 (GSK3), která by jinak aktivovala glykogenovou syntetázu (GS) (Beaulieu, 2012). AKT se podílí na aktivaci mTORC1 dráhy přes aktivaci C1 proteinu, který aktivuje kaskádu zodpovědnou za inhibici IRS (Mackenzie and Elliott, 2014). Zároveň vazbou inzulinu na inzulinový receptor dojde k translokaci glukózového transportéru 4 (GLUT4) do plazmatické membrány, kde je zodpovědný za přenos glukózy do buňky. Proces translokace GLUT4 je inhibován proteinem AS160, který je inaktivován aktivní formou AKT (Zeng *et al.*, 2000). V případě narušení schopnosti

inzulinu vázat se na svůj receptor v membráně je snížena schopnost absorpce glukózy a tím spojené glykolytické funkce buňky (Huang and Czech, 2007).

Mnoho vnějších i vnitřních faktorů může ovlivnit odpověď buňky na inzulin. Charakteristickým regulátorem inzulinové senzitivity je buněčný metabolismus, kdy je známo, že akumulace řady metabolitů může ovlivnit schopnost buněk aktivovat inzulinový receptor a inhibovat signalizační kaskádu. Jedním z těchto faktorů je akumulace ceramidu, jako produktu katabolismu tuků lipofagií a detoxifikace peroxidovaných lipidů (Summers, 2006).

1.6.1 Role ceramidů v rozvoji onemocnění

Ceramidy jsou složeny z molekuly sfingosinu a mastných kyselin a tvoří součást buněčných membrán eukaryot. Ceramidy se řadí do skupiny sfingolipidů a v buňce se podílí na regulaci diferenciaci, proliferaci a apoptózy (Pagadala *et al.*, 2012).

Ceramidy mohou vznikat několika různými způsoby. *De novo* se tvoří syntézou v ER, což zahrnuje ceramid syntetázy (CerS) a serin palmitoyl-transferázy (SPT), která katalyzuje reakci. Další možná syntéza ceramidů probíhá ze sfingosinu za přítomnosti zásadité (ACER) a kyselé (AC) ceramidázy (Hannun and Obeid, 2011). Jako třetí varianta vzniku ceramidu je reakce sfingomyelinu katalyzovaná buď kyselou nebo neutrální sfingomyelinázou (SMase). SMase hydrolyzuje sfingomyelin za vzniku ceramidu a fosfocholinu. Aktivita SMase je indukovaná přítomností pro-zánětlivých cytokinů (hlavně TNF α), Fas ligandů nebo oxidativním stresem (Kim *et al.*, 1991; Brenner *et al.*, 1998). Aktivní SMase tak reguluje množství ceramidů a tím vznik snížené inzulinové senzitivity. Vedle rozvoje inzulinové rezistence ceramidy svou přítomností narušují permeabilitu vnější mitochondriální membrány a tím negativně ovlivňují produkci ROS, která vede ke zvýšené aktivitě lipolýzy (Roszczyc-Owsiejczuk and Zabielski, 2021).

Negativní vliv ceramidů na inzulinovou senzitivitu zahrnuje jejich schopnost aktivace fosfatázy 2A (PP2A) a proteinové kinázy C (PKC), které inhibují AKT/PKB (Chavez *et al.*, 2003). Inhibicí těchto proteinů dojde k aktivaci proteinu AS160, který blokuje translokaci GLUT4 do membrány a nedojde tak k příjmu glukózy buňkou (Summers, 2006). Současně ceramidy aktivují serin/threoninové c-Jun K-terminální kinázu (JNK) a inhibitor κ B-kinase β (I κ K β), které jsou zodpovědné za aktivaci transkripčních faktorů Jun a NF κ B pro expresi genů pro inzulinovou rezistenci (Summers, 2006). Snížené množství inzulinu způsobí

zvýšení lipolýzy, což je spojeno se zvýšeným rizikem lipotoxicity a tvorbou CLS makrofágy, které svou aktivací přispívají k šíření rezistence v dané tkáni (Chavez *et al.*, 2003).

Dysfunkce mitochondrií jako následek nadbytečného množství ceramidů může vést k poškození β -oxidace, což je jeden z faktorů způsobujících další navýšení množství ceramidů (Dobbins *et al.*, 2001). Ceramidy v mitochondriích inhibují aktivitu AKT/PKB a aktivují pro-apoptotický protein BAX, který se podílí na zvýšené permeabilitě mitochondriálních membrán, čímž je narušen elektron transportní řetězec za vzniku zvýšeného množství ROS (Di Paola, Cocco and Lorusso, 2000).

Množství ceramidu je možné redukovat aktivací tzv. záchranné dráhy, která je katalyzovaná enzymy označovanými jako ceramidázy (CDase). Reakce probíhá v lysozomech za vzniku sfingosinu a FFAs, které jsou, na rozdíl od ceramidu, schopné opustit lysosom (Riboni *et al.*, 1998). Vzniklý sfingosin je využitý pro další syntézu ceramidu a/nebo sfingosine-1-fosfátu (Kitatani, Idkowiak-Baldys and Hannun, 2008).

Nárůst koncentrace ceramidů je asociován s rozvojem mnoha patologických stavů jako jsou například T2DM, NAFLD, kardiovaskulární a neurodegenerativní onemocnění (Alzheimerova nemoc, demence) (Wang and Bieberich, 2018; Gomez-Muñoz *et al.*, 2016). Na rozvoji neurodegenerativních onemocnění se zásadně podílejí lysozomální proteiny – saposiny, které jsou zodpovědné za aktivaci enzymů degradující lysozomální lipidy (O'Brien and Kishimoto, 1991). Při poškození funkce saposinů dochází k akumulaci sfingolipidů v lysozomech, což vede k jejich dysfunkci a poškození lipidové homeostáze (Schulze and Sandhoff, 2011).

1.7 Lipofuscin

Se vzrůstajícím věkem klesá autofagická a lysozomální aktivita v buňce, což může vést k akumulaci nedegradovatelného pigmentu uvnitř buněk (De Biase *et al.*, 2017). Tento pigment je označován jako lipofuscin a byl dlouho považován pouze za vedlejší produkt oxidace, který nemá významný vliv na buněčnou aktivitu. V posledních letech se ale začíná ukazovat, že právě lipofuscin je klíčový v rozvoji patologických onemocnění (D'Andrea *et al.*, 2002).

Lipofuscin je tvořen z buněčného materiálu, který byl vystaven intralysozomální degradaci – například autofagii (Terman and Brunk, 1998). Velký výskyt lipofuscinu lze pozorovat v postmitotických buňkách, neuronech, kardiálních myocytech, Sertoliho buňkách

a buňkách sítnice (Del Roso *et al.*, 1991). Charakter a struktura lipofuscinových komplexů je velmi odlišná mezi tkáněmi a ukazuje na časovou heterogenitu ve složení oxidovaných proteinů (30-70%), lipidů (20-50%), kationtů kovů (Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Al^{3+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}) (2%) a cukerných zbytků (Benavides *et al.*, 2002; Double *et al.*, 2008; Moreno-García *et al.*, 2018).

Z důvodu polymerického charakteru nemůže být lipofuscin zdegradován procesem autofagie ani zlikvidován exocytózou. Granule lipofuscinu jsou buňkou hromaděny v lysozomech v podobě ceroidového pigmentu. Zvýšená přítomnost ceroidů uvnitř lysozomů negativně ovlivňuje funkci buněk (Ballabio and Gieselmann, 2009).

Poruchy autofagie jsou spjaty s výskytem mnoha patologických onemocnění. Přispívají ke vzniku tumorů, podílí se na rozvoji vývojových defektů a v neposlední řadě jsou zodpovědné za tvorbu proteinových agregátů (amyloid prekurzor protein (APP)), které mají za následek vznik neurodegenerace (De Biase *et al.*, 2017). Za rozvoj neurodegenerativních onemocnění je zodpovědné hromadění lipofuscinových granul uvnitř neuronů, které snižují jejich schopnost autofagie, zvyšují produkci ROS a poškození mitochondrií (Ulf T. Brunk and Terman, 2002). Zvýšené množství lipofuscinu vede k zabránění průniku lysozomálních enzymů do autofagozómu a dochází tak ke snížené degradativní aktivitě lysozomů. Neschopnost lysozomů hydrolyzovat autofagický materiál může nevratně vést ke snížené funkci nebo smrti neuronů (De Biase *et al.*, 2017).

Pro léčbu zmíněných onemocnění a poruch včetně rozvoje inzulinové rezistence, obezity, T2DM, kardiovaskulárních onemocnění, NAFLD či neurodegenerativních onemocnění dosud nebyl nalezen vhodný způsob léčby. *Drosophila melanogaster* představuje nástroje pro studium a pochopení těchto onemocnění. Zavedení drosophily jako nového modelu pro detailnější porozumění procesů spojených s metabolickým syndromem a neurodegenerativními poruchami by mohlo pomoci s odhalením možných cílů pro budoucí terapii. Nicméně, proces přeměny tukové tkáně u drosophily není dostatečně prostudovaný. Ovšem, vzhledem k podobnostem, které vidíme v metamorfující tukové tkáni drosophily a v obézní tukové tkáni savců, si zaslouží zvýšenou pozornost.

1.8 *Drosophila melanogaster* jako modelový organismus

V současné době je drosophila využívána pro studium mnoha lidských onemocnění, včetně neurodegenerativních poruch jako jsou Alzheimerova nebo Parkinsonova nemoc

(Prübing, Voigt and Schulz, 2013). Nicméně, v posledních letech se objevuje stále více studií ukazující na podobnost mezi *Drosophila* a savci v kontextu přeměny tukové tkáně a onemocnění s ní spojené. Zmíněné podobnosti jsou ukázány například u much krmených stravou bohatou na lipidy nebo cukry, kdy tyto jedinci vykazují zvýšené ukládání tuku, redukci inzulínové senzitivity, hyperglykémii a zkrácení délky života (Woodcock *et al.*, 2015). Ukazuje se také, že u much krmených nadbytkem cukrů došlo k upregulování exprese genů zodpovědných za lipogenezi, glukoneogenezi a beta-oxidaci (Palanker Musselman *et al.*, 2011). To představuje *Drosophila* jako možný alternativní model pro studium molekulárních mechanismů rozvoje inzulínové rezistence a potenciálních terapeutických nástrojů (Morris *et al.*, 2012).

Zmíněné narušení metabolické homeostázy lze pozorovat také v metamorfující tukové tkáni. Larvální tuková tkáň během své přeměny podstupuje morfologické změny připomínající procesy doprovázející vznik obézní tukové tkáně savců (Nelliot, Bond and Hoshizaki, 2006). Tyto morfologické změny jsou opět doprovázeny zvětšením objemu adipocytů a také infiltrací makrofágů do tukové tkáně (Nelliot, Bond and Hoshizaki, 2006; Aguila *et al.*, 2007). Přítomnost makrofágů okolo metamorfující larválních adipocytů ovšem nebyla do této doby dostatečně prostudovaná. Nicméně, můžeme předpokládat, že právě makrofágy budou hrát klíčovou roli ve snižování inzulínové senzitivity a tím i v iniciaci procesů spojených s metamorfózou.

V neposlední řadě *Drosophila melanogaster* představuje systém, ve kterém je podstatná část genů a genových rodin podílejících se na mobilizaci a transportu lipidů, lipolýze, aktivaci autofágie a metabolismu ceramidů konzervovaná mezi *Drosophila* a člověkem (Reiter *et al.*, 2001; Musselman and Kühnlein, 2018). I z tohoto důvodu se *Drosophila* jeví jako možný nástroj pro studium těchto procesů relevantní i pro savčí systémy.

Navíc je *Drosophila melanogaster* široce využívaný modelový organismus, který umožňuje snadnou manipulaci genetické informace za použití rozličných genetických konstruktů. Vedle toho poskytuje velké množství transgenních linií, díky kterým je možné použití metod regulující expresi genů našeho zájmu. Mezi tyto metody patří například RNA interference (RNAi) a tkáňově specifický driver Gal4 (Fire *et al.*, 1998; Brand and Perrimon, 1993). Tato genetická manipulace může být navíc časově specifická díky proteinu Gal80, který se za určité teploty váže na Gal4 a negativně reguluje jeho transkripci (Han and Kodadek, 2000). Systém UAS Gal4Gal80^{TS} nám tak poskytuje možnost regulovat expresi

genů v určité tkáni v určitém čase *in vivo* (Han and Kodadek, 2000; Suster *et al.*, 2004). Tyto genetické nástroje by mohly být využity v kontextu výzkumu larvální tukové tkáně například k regulaci ekdyzonové signalizační kaskády a jejího vlivu na apoptotické a autofagické procesy. Regulace autofagických genů by mohla být využita pro studium přítomnosti lipofuscinových granulí, jejichž funkce a degradace doposud nebyly u *Drosophila* řádně popsány. Nabízí se také možnost regulace transkripce lipolytických genů a genů zapojených v mobilizaci a transportu lipidových zásob, které jsou zřejmě zásadní pro správný průběh metamorfózy (Bi *et al.*, 2012; Arrese and Soulagés, 2010a).

1.9 Mobilizace lipidů a lipolýza u *Drosophila melanogaster*

Proces lipolýzy u *Drosophila* je aktivován v době, kdy je vyžadováno uvolnění většího množství energie ve formě lipidů. V regulaci lipolytických enzymů hrají zásadní roli lipidové kapky, které jsou obalené fosfolipidy sloužící jako bariéra pro lipázy (Brasaemle, 2007).

Drosophila pro mobilizaci lipidů využívá specializované lipoproteiny, které jsou označovány jako lipophoriny (Lpp). Lipophorin je produkován ve formě inaktivního Apoliphorinu II/I a jeho schopnost přepravy lipidů je katalyzována přítomností lipidového transportního proteinu (Ltp) (Palm *et al.*, 2012). Lipidy jsou transportovány v lipoproteinech ve formě DAG, TAG a cholesteryl esterů ze střeva do hemolymfy odkud se dostávají k tukovému tělesu, kde jsou uloženy ve formě TAG nebo jsou využity ke generování energie (Jouni, Zamora and Wells, 2002). Transport lipidů umožňuje přítomnost mikrosomálního triglyceridového transportního proteinu (Mtp), který je zodpovědný za jejich vazbu na Ltp (Palm *et al.*, 2012).

Mobilizace zásob energie tukového tělesa je regulována hormonálně pomocí adipokinetického hormonu (Akh), který je sekretován endokrinní žlázou corpora cardiaca (Gade, Hoffmann and Spring, 1997) a steroidním hormonem 20-hydroxyecdysone (ekdyzonem), který je produkován prothorakální a prstencovou žlázou a jeho syntéza je regulována inzulinovou signalizací (Shingleton, 2005). K mobilizaci tukových zásob dochází z mnoha důvodů – poskytnutí energie svalům pro létání nebo pro transport lipidů k reprodukčním orgánům, kde jsou lipidy využívány pro zrání ovárií a spermií. Dále je mobilizace lipidů zásadní pro syntézu vosků během zrání kutikuly a jako nutriční podpora vitálních funkcí (Wat *et al.*, 2020; Kühnlein, 2012).

Mezi nejvýznamnější lipázy u hmyzu patří Brummer lipáza (Bmm) – homolog k savčí ATGL a hormon senzitivní lipáza (Hsl) (Grönke *et al.*, 2005). Pro uvolnění tukových zásob musí Bmm nebo Hsl katalyzovat hydrolyzu molekul triglyceridu, který je uložen v adipocytech ve formě lipidových kapek (Arrese, Patel and Soulages, 2006). Za aktivaci exprese genů kódujících lipázu Bmm je zodpovědná vazba ekdyzonu na ekdyzonový receptor (EcR), který spouští ekdyzonovou signalizaci vedoucí k iniciaci lipolýzy a dalších procesů nutných pro úspěšné prodělání metamorfózy (Grönke *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010).

1.10 Inzulinová rezistence u *Drosophila melanogaster*

Dráha inzulinové signalizace je evolučně konzervovaná mezi drosophilou a obratlovci a hraje klíčovou roli v regulaci vývoje, růstu a metabolismu drosophily (Goberdhan and Wilson, 2003). Pro řízení inzulinové signalizace drosophily slouží insulin-like molekuly označované jako DILPs. DILPs se vážou na inzulinový receptor (InR) na povrchu buněčné membrány (Semaniuk *et al.*, 2021). Po vazbě je aktivován pomocí fosforylace Dp110 protein (homolog k savčí PI3K), jeho aktivace může být přímá nebo přes protein Chico (savčí IRS1/2). Aktivace Dp110 je regulována fosfatázou PTEN. Protein Dp110 fosforyluje PIP3, čímž se aktivují kinázy Akt a Pdk1. Aktivní Akt je zodpovědný za absorpci glukózy buňkou přes glukózový transportér (GLUT) (Alfa and Kim, 2016).

Na rozvoji inzulinové rezistence se podílí mnoho signalizačních kaskád, mezi ně patří například dráha Target of rapamycin (TOR) a Jun-N-terminální kináza (JNK). TOR inhibuje vznik proteinu Chico a JNK zabraňuje reakci mezi Dp110 a Akt a reguluje tak její aktivaci (Semaniuk *et al.*, 2021; Karpac *et al.*, 2009). Významnou roli hraje Akh, který se váže na svůj receptor v membráně buňky (AkhR) a touto vazbou aktivuje Pak, která blokuje akumulaci lipidů a aktivuje lipolýzu lipidových kapek. Narušení této dráhy vede k rozvoji obezity, která je charakteristická nadměrnou akumulací lipidů. Nashromážděné lipidy spouští aktivaci PKC (proteinová kináza C), která inhibuje aktivaci Akt za vzniku inzulinové rezistence (Alfa and Kim, 2016). Jako další molekula podílející se na zhoršení inzulinové senzitivity je například ImpL2 (ekdyson indukibilní gen L2/Imaginal morphogenesis protein-Late 2), který interaguje s inzulinem a tím znemožňuje jeho vazbu na receptor (Okamoto *et al.*, 2013). Tukové těleso je dále zodpovědné za sekreci faktorů Unpaired2 (Upd2) a Insulin-like peptid 6 (Ilp6). Upd2 má podobnou funkci jako savčí hormon Leptin a jejich produkce

je přímo úměrná množství tuku v tukové tkáni (Rajan and Perrimon, 2012). Přítomnost Upd2 a Ilp6 působí na produkci DILPs v mozku a tím regulují aktivitu inzulínového receptoru (Alfa and Kim, 2016).

Dosavadní studie o ukládání a mobilizaci triglyceridů u holometabolního hmyzu ukazují na podobnost těchto mechanismů mezi hmyzem a savci. Tento fakt naznačuje možnost využití zástupců holometabolního hmyzu jako modelových organismů a jejich použití pro studium regulačních mechanismů lipidového metabolismu.

1.11 Role tukového tělesa u *Drosophila melanogaster*

Tukové těleso hmyzu v sobě spojuje funkci obou centrálních metabolických orgánů savců, tukové tkáně a jater. Pro hmyz představuje tukové těleso místo pro ukládání glykogenu, lipidů a proteinů (Vilmos, 1998; Hotamisligil, 2006). Tukovým tělesem jsou sekretovány transportní proteiny, které jsou označovány jako lipophoriny a jsou zodpovědné za přenos lipidů. Tukové těleso také produkuje glykolipid vitelogenin, který je klíčový pro maturaci vajíčka (Kambysellis, 1977). Vedle své metabolické funkce se tuková tkáň podílí na zprostředkování imunitní odpovědi sekrecí antibiokriniálních peptidů (AMPs), udržování homeostáze a syntéze hormonů zodpovědných za řízení metamorfózy a lipolýzy (Tapadia and Verma, 2012; Azeez, Meintjes and Chamunorwa, 2014).

Základní buňky, které tvoří tukovou tkáň, jsou adipocyty. Adipocyty jsou charakteristické přítomností mnoha lipidových kapek. Lipidové kapky jsou z převážné většiny tvořeny triglyceridy a po přijetí potravy vyplňují tukové kapky většinu intracelulárního prostoru adipocytů. Kromě lipidových kapek je cytosol adipocytů bohatý na proteinové granule a glykogen (Brooks, 1985).

Lipidové kapky netvoří pouze pasivní rezervoár lipidů, ale jde o dynamické organelly hrající významnou roli v tukovém a energetickém metabolismu buňky (Olofsson *et al.*, 2009). Povrch lipidových kapek je tvořen fosfolipidovou membránou, ve které jsou uloženy specifické proteiny označovány jako perilipiny (Bickel, Tansey and Welte, 2009). Lipidy uložené v lipidových kapkách jsou využívány v době, kdy moucha nepřijímá potravu (například v období kuklení). Během metamorfózy jsou na jedince kladeny vysoké energetické nároky, pro překonání několika zásadních procesů vývoje (formování imaginární tělesné konstituce). Tuková tkáň musí být schopna poskytnout dostatečné množství energie v případě potřeby (Arrese and Soulages, 2010a). V průběhu larválního stádia proto larva

přijímá velké množství potravy k akumulaci energie, která je využita v době metamorfózy a u čerstvě vylíhnutého dospělého (Mirth and Riddiford, 2007). Množství uložených nutričních zásob v larvě je klíčové pro život dospělého, kdy v případě nízkých zásob dochází ke snížení fertility (Briegel, 1990). Naopak pokud jsou nutriční zásoby dostatečné, dospělci mají větší pravděpodobnost úspěšného rozmnožení se. Tento fakt souvisí s vývojem vajíček a spermií, který zahrnuje výraznou mobilizaci energetických rezerv uvolněných právě z tukového tělesa do ovárií a testes (Arrese and Soulages, 2010a; Wat *et al.*, 2020).

1.12 Význam a regulace přeměny tukové tkáně u *Drosophila melanogaster*

Holometabolní hmyz má časově rozdělené období růstu a akumulace látek od reprodukce. Tyto stádia prodělává hmyz v naprosto odlišné podobě – larva a moucha. Strategie nahromadění dostatku živin pro prodělání metamorfózy je klíčová pro vývoj v dospělého. To vede ke zvýšeným příjmům potravy v období larvy, čímž dochází k akumulaci energetických zásob, které jsou primárně ukládány do larválního tukového tělesa. Lipidy naakumulované larvou musí být přeneseny mezi jednotlivými stádii a slouží jako zdroj energie během metamorfózy a post-metamorfoického vývoje (Nelliot, Bond and Hoshizaki, 2006).

Na začátku metamorfózy tvoří larvální tukové těleso celistvou vrstvu v těle larvy. V průběhu metamorfózy dochází k morfologickým změnám tukového tělesa, které jsou doprovázeny iniciací mechanismů ovlivňující například inzulinovou senzitivitu a aktivací mobilizace lipidových zásob (Zheng, Yang a Xi, 2016). Proces morfologických změn larválního tukového tělesa je řízen juvenilním hormonem a ekdysonem. Během morfologických změn dochází k rozpadu larválního tělesa na individuální larvální adipocyty, které mění svůj původně dlaždicovitý tvar a stávají se cirkulárními (Dai *et al.*, 2017). Změna tvaru adipocytů je podmíněna aktivací EcR a je klíčová pro ztrátu integrinů (membránových receptorů) (Dai *et al.*, 2017).

V metamorfující tukové tkáni dochází k apoptóze larválních adipocytů, za jejichž odstraňování jsou zodpovědné makrofágy. Makrofágy likvidují mrtvé buňky procesem označovaným jako efferocytóza. V případě narušení procesu efferocytózy, například vlivem přítomnosti pro-zánětlivých cytokinů, dochází k rozvoji nekrózy (Gheibi Hayat *et al.*, 2019). Vedle apoptózy podstupují larvální adipocyty proces autofagie. Autofagii larvální adipocyty podstupují jako odpověď na nepříznivé podmínky, například během období hladovění

(Tracy and Baehrecke, 2013). Autofagie larválních adipocytů je řízena insulinovou signální kaskádou, insulin-like growth faktory a přítomností ekdyzonu (Colombani *et al.*, 2005). Aktivovaný EcR zodpovědný za ztrátu integrinů reguluje iniciaci autofagie, která je za normálních podmínek blokována přítomností integrinů v membráně adipocytů (D'Avino and Thummel, 2000). Aktivovaný proces autofagie inhibuje další průběh apoptózy v tkáni (Tracy and Baehrecke, 2013). Ekdyzon se také podílí na inhibici akumulace lipidů v tukovém tělese a současně indukuje mobilizaci lipidů, které jsou zásadním zdrojem energie pro úspěšné prodělání metamorfózy (Thummel, 1996).

Zásadní roli v iniciaci autofagických procesů v buňce hraje také mTORC1, který je aktivován nebo blokován za účelem udržení buněčné homeostáze. Aktivita mTORC1 je řízena na základě environmentálních podmínek, jako jsou nutriční a růstové faktory, stres a metabolické procesy (Guertin and Sabatini, 2007). Aktivita mTORC1 je regulována přes PI3K signální dráhu, se kterou tak tvoří regulátory autofagie. mTORC1 v období hladovění inhibuje buněčný katabolismus aktivací autofagické dráhy, naopak za normálních nutričních podmínek potlačuje Atg1 komplex, který je zodpovědný za iniciaci autofagie a zároveň podporuje buněčný růst stimulací biosyntetických drah (podílí se na syntéze proteinů, lipidů a nukleotidů) (Ravikumar *et al.*, 2010). Vedle zmíněných funkcí se mTORC1 významně podílí na kontrole lipidového metabolismu a lipolýze, kromě toho se účastní syntézy, oxidace, transportu a ukládání lipidů (Ricoult and Manning, 2013).

Během autofagických procesů se uvnitř lysozomů hromadí nezdegradovatelné lipidové granule. Jak už bylo zmíněno v samostatné kapitole o lipofuscinu – nashromáždění lipofuscinových granulí snižuje schopnost lysozomů trávit další autofagozomy a dochází tak k narušení lipidové homeostáze, která je charakteristická vznikem hypertrofických adipocytů a snížením inzulínové senzitivity v metamorfující tukové tkáni (Azeez, Meintjes and Chamunorwa, 2014). Vlivem snížené inzulínové senzitivity dochází ke zvyšování lipolytické aktivity uvnitř hypertrofických larválních adipocytů, ze kterých jsou uvolňovány lipidy. Ve snaze zabránit lipotoxicitě je larvální tukové těleso infiltrováno makrofágy (Valenza *et al.*, 2018).

1.12.1 Role makrofágů v larvální tukové tkáni

Imunitní systém drosophily je mimo jiné ovlivněn přítomností ekdyzonu. Ekdyzon na začátku metamorfózy aktivuje imunitní buňky hmyzu včetně makrofágů, čímž dojde ke

zvýšení jejich pohyblivosti, aktivaci imunitní odpovědi a efferocytóze (Regan *et al.*, 2013). Vliv steroidních hormonů (pohlavní hormony, kortikosteroidy) na aktivaci imunitních buněk (monocytů) je znám u savců. Nicméně přesný mechanismus vlivu hormonální signalizace na imunitní odpověď u drosophily není dostatečně prostudovaný (Regan *et al.*, 2013). Vedle své imunitní funkce hrají makrofágy zásadní roli v udržení homeostáze a zároveň stimulují buněčnou odpověď okolních buněk na měnící se podmínky. Tyto procesy jsou řízeny molekulárními dráhami, které jsou evolučně konzervované mezi obratlovci a drosophilou (Ratheesh, Belyaeva and Siekhaus, 2015).

Charakterizace makrofágů tukové tkáně (ATMs) u drosophily však nebyla do této doby dostatečně provedena, a proto se musíme v následující části spokojit s částečným odkazováním na doposud nepublikovaná data našeho výzkumného týmu.

Lipidy unikající z larválních adipocytů během zvýšené aktivity lipolytických enzymů jsou zachytávány scavenger receptorem označovaným jako Croquemort (Crq), který je umístěn v membráně makrofágů (Franc *et al.*, 1996). Crq je homolog pro savčí scavenger receptor CD36 a hraje zásadní roli při fagocytóze mikroorganismů a v procesu efferocytózy (Ratheesh, Belyaeva and Siekhaus, 2015).

Lipidy uvnitř makrofágů jsou zodpovědné za aktivaci JAK-STAT signální kaskády, která se podílí na pro-zánětlivému fenotypu makrofágů a rozšíření inzulinové rezistence (Woodcock *et al.*, 2015). Kromě tohoto cytokinu, produkují infiltrující makrofágy také ImpL2, který je antagonistou pro insulin/Insulin-like growth factor (IGF) (Morgantini *et al.*, 2019).

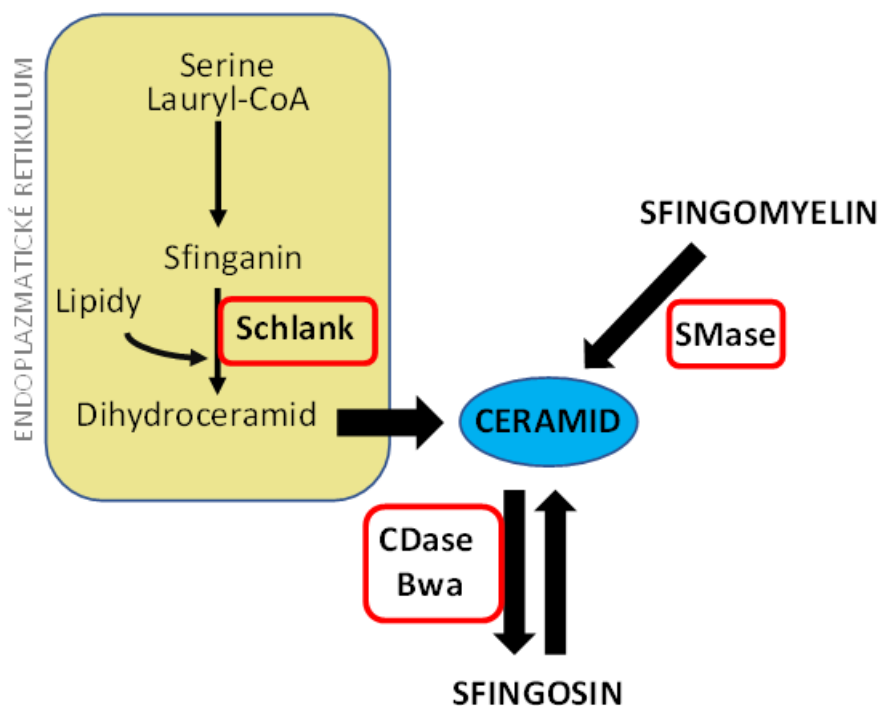
Ačkoliv zatím pro taková tvrzení nemáme dostatek důkazů, domníváme se, že pro-zánětlivé cytokiny sekretované aktivovanými makrofágy jsou zodpovědné za snižování inzulinové senzitivity adipocytů. Makrofágy se navíc pravděpodobně podílejí na zprostředkování velkého množství nutričně bohatých látek, které jsou klíčové pro vývoj a správnou funkci imaginárních tkání. Tyto tkáně současně nejsou vystaveny parakrinním efektům způsobující inzulinovou rezistenci a mohou mít aktivovanou inzulinovou signalizační kaskádu, která je zásadní v post-metamorfickém vývoji (Bajgar, Krejčová, unpublished).

Ačkoliv se jedná o poměrně odlišný proces, můžeme vidět až zarážející počet podobností s ATMs a jejich rolí v obézní tukové tkáni savců. Proto by tento přirozeně se vyskytující biologický proces mohl sloužit jako zajímavý model pro studium onemocnění související s rozvojem obezity.

1.13 Ceramidový a sfingosinový metabolismus u *Drosophila melanogaster*

Jak už bylo zmíněno v kapitole o roli ceramidů, ceramidy mohou vznikat *de novo* v ER. Tato syntéza je u drosophily katalyzovaná přítomností ceramidových syntetáz, které jsou kódované genem *schlank* (Kraut, 2011). Celá reakce vzniku ceramidu *de novo* je závislá na přítomnosti serinu a lauryl-CoA, jejichž reakce je katalyzovaná serin-palmitoyl transferázou za vzniku sfinganinu. Sfinganin je acetylován za přítomnosti FFAs a enzymu Schlank na dihydroceramid, ze kterého desaturací (enzym Des1) vzniká ceramid (Siddique *et al.*, 2015; Kraut, 2011). Vedle vzniku ceramidu *schlank* pozitivně reguluje syntézu FFAs, je zodpovědný za ukládání lipidů v podobě TAG do tukového tělesa a blokuje expresi triglycerolových lipáz (Bauer *et al.*, 2009). *Schlank* je tedy pro drosophilu klíčový v regulaci lipogeneze a lipolýzy. Další možností vzniku ceramidů je aktivace exprese genu *SMase*, která kóduje enzym neutrální sfingomyelinázu katalyzující hydrolýzu sfingomyelinu za vzniku ceramidu a fosfocholinu (Kraut, 2011).

Degradace ceramidu je katalyzovaná enzymy, které se označují jako ceramidázy. Ceramid je hydrolyzován za vzniku sfingosinu, který je následně fosforylován na sfingosin 1-fosfát. Ceramidázy jsou klíčovými enzymy, které snižují škodlivý efekt ceramidů a regulují úroveň ceramidu/sfingosinu/sfingosin 1-fosfátu v buňce (Yang *et al.*, 2010). Ceramidázy se dělí podle optimálního pH pro jejich enzymatickou funkci na kyselé, neutrální a zásadité. U drosophily je známá neutrální ceramidáza kódovaná genem *CDase* a zásaditá, kterou kóduje gen *bwa* (*brainwashing*) (Acharya and Acharya, 2005).



Obrázek 1: Schéma syntézy ceramidu a sfingosinu a zapojení klíčových enzymů.

Míra exprese genů *CDase* a *SMase* je snížena v době, kdy jsou mouchy krmeny stravou bohatou na cukry. Oproti tomu, v době nadměrného příjmu lipidů je míra jejich exprese zvýšená (Kraut, 2011; Yang *et al.*, 2010). Oba geny jsou tak potenciálními hráči v regulaci syntézy FFAs a jsou součástí metabolické odpovědi na zvýšené množství glukózy a mastných kyselin (Kraut, 2011).

Jak bylo zmíněno v kapitole o ceramidech u savců, hromadění sfingolipidů v lysozomech je regulováno aktivací saposinů, které jsou klíčové pro iniciaci proteinů zodpovědných za degradaci ceramidu. Saposiny jsou u drosophily kódované genem *saposin-related (sap-r)*, který je zásadní v rozvoji poškození funkce lysozomů (Hindle *et al.*, 2017).

Studie o metabolismu ceramidů u *Drosophila melanogaster* ukazují na konzervovanost drah mezi savci a drosophilou. *Drosophila melanogaster* by tak mohla v budoucnu tvořit nástroj pro studium onemocnění spojených s lipidovým metabolismem a usnadnit hledání nástrojů pro jejich možnou terapii.

Cílem této práce je charakterizovat morfológickou přeměnu tukové tkáně v průběhu metamorfózy a post-metamorfického vývoje u *Drosophila melanogaster*. Morfológická analýza je podpořena zmapováním změn relativní míry exprese genů zapojených v mobilizaci lipidů, transportu lipidů, lipidovém a ceramidovém metabolismu. K porozumění procesů spojených s přeměnou tukového tělesa má práce přispívá naplněním následujících cílů.

2 Cíle práce

Cílem této práce je detailně charakterizovat proces přeměny tukové tkáně u *Drosophila melanogaster* během metamorfózy a časného post-metamorfického vývoje se zaměřením na morfologické změny v larválním tukových buňkách. Pro splnění vytyčených cílů jsme se rozhodli:

- Zmapovat změnu velikosti larválních adipocytů.
- Popsat změny ve velikosti a počtu lipofuscinových granulí a lipidových kapek.
- Popsat změny míry exprese vybraných genů zahrnutých v mobilizaci lipidových zásob, lipolýze a ceramidovém metabolismu.

3 Materiály a metody

3.1 Práce s *Drosophilou*

Mouchy byly chovány ve skleněných vialkách s vatovým uzávěrem. Byly krmeny stravou z kukuřičné mouky s 5 % glukosy (Tab. 1) a byly udržovány v prostředí s přirozeným střídáním světla a tmy, při teplotě 25 °C a 60% vlhkosti. Bylo dbáno na to, aby v jedné vialce nebylo velké množství jedinců, kterým by tak byly zhoršeny podmínky pro život.

Tabulka 1: Dieta s 5% glukosy.

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

3.2 Parafinové řezy

Pro zhotovení parafinových řezů byly vybírány jedinci ve třech časových obdobích ve stádiu kukly (bílá prepupa, P 8 a P 15) a třech ve stádiu dospělce (0 hpe, 24 hpe a 48 hpe). Z dospělců byly vždy vybírány samice. Před fixací byly dospělé mouchy uspány pomocí CO₂ a smočeny v 70% ethanolu.

3.2.1 Příprava kukel

Pro metodu parafinových řezů se pupy musely upravit, pro zajištění jejich správného nafilování. Kukly byly upravovány ve 4% PFA. Bílým prepupám byla odstřižena část kutikuly v oblasti larválních úst, aby se k tkáni fixáž dostala v dostatečném množství. Kuklám ve stádiích P 8 a P 15 byl odstraněn kutikulární obal, tak aby nedošlo k poškození tkáně.

3.2.2 Fixace tkání

K fixaci tkání byla použita Bouinova fixáž (BHS), která se skládá z kyseliny pikrové (0,9%), formaldehydu (9%), kyseliny octové (5%) a vody (Bultitude *et al.*, 2011). K fixáži byl přidán HgCl_2 v poměru 10BHS:1 HgCl_2 .

Před fixací byly mouchy ponořeny do 70% EtOH a následně byly dány připravené směsi BHS a HgCl_2 . Po 15 minutách v této směsi byly dospělým mouchám odstraněny nohy, křídla a sosák. Do kukel i dospělců byly wolframovou jehlou udělány díry (2x do oblasti thoraxu, 4x do abdomenu). Bílá prepupa se nepropíchlá, aby se zabránilo vytečení jejího obsahu.

Po tomto procesu byly vzorky ponořené ve směsi BHS a HgCl_2 nechány 24 hodin při teplotě 4 °C. Proces fixace byl dokončen opakovaným promýváním vzorků v 70% EtOH, dokud tekutina uvnitř mikrozkuvek (Eppendorf) nebyla zcela bez známek Bouinovy fixáže. Vzorky byly ponořeny do 70% EtOH po dobu dalších 24 hodin.

3.2.3 Odvodňovací řada

Vzorky byly alespoň 2x promyty čerstvým 70% EtOH a poté dehydrovány odvodňovací řadou (Tab.2). Tento proces byl dělán na laboratorním rotátoru.

Tabulka 2: Odvodňovací řada.

96% etanol	20 minut
96% etanol	20 minut
100% etanol	20 minut
100% etanol	20 minut
Chloroform	15 minut
Chloroform	15 minut

Během dehydratačního procesu byl roztaven parafin, který se uložil do rozehřáté pícky. Při promývání vzorků chloroformem, byly připraveny plastové zalévací komůrky, do každé z nich se dala kapka chloroformu, aby se zabránilo vyschnutí vzorku při přenášení z mikroskopu do zalévací formičky.

3.2.4 Zalití vzorků do parafinu

Po přenesení vzorku z mikroskopu do zalévací komůrky byla z pícky vyjmutá skleněná kádinka s připraveným parafinem, který měl teplotu 56-58 °C. Za pomoci kapátka byly vzorky jednotlivě rozmístěny do formiček s připravenou kapkou chloroformu. Po přenesení všech vzorků se postupně odstranil zbytek chloroformu z formičky a ihned se její obsah vyplnil parafinem, tak aby se zabránilo vyschnutí vzorků. Zalité komůrky se vzorky byly na 24 hodin dány do pícky o nastavené teplotě 60 °C.

Další den se plastové formičky postupně vyjmuty z pícky a nažhavenou jehlou byly vzorky v nich orientovány na bok, aby byly co nejvíce uprostřed dna komůrky. Během manipulace s jehlou se muselo dbát zvýšené opatrnosti, aby nedošlo k poškození vzorků.

Po zatuhnutí parafinu se obsah formiček opatrně vyloupne a přitaví se na dřevěný podstavec, který bude sloužit pro uchycení vzorku během krájení v rotačním mikrotomu.

3.2.5 Krájení vzorků

Pro zhotovení řezů byl použit rotační mikrotom Leica RM2165. Pro všechny vzorky byla nastavena šířka řezu 7 μm.

Před zahájením krájení byla k aparátu mikrotomu připevněna nová čistá žiletka. Příprava řezů byla dělána metodou na vodní hladinu, z toho důvodu byla do misky pod žiletkou připravena destilovaná voda, která sahala po okraj nádoby. Vedle přípravy samotného mikrotomu bylo potřeba připravit si dvě plotýnky (Slides Warmer XH-2002), které byly nastavené na 45 °C.

Vzorky upevněné na dřevěném nosiči byly pevně zachyceny do držáku na mikrotomu. Na připravené podložní sklíčko s dostatečným množstvím destilované vody bylo pokládáno 4-5 pásů řezů o délce asi 4 cm. Podložní sklíčko s řezy bylo položeno na připravenou teplou plotýnku. Asi po minutě se pásy řezů na sklíčko začaly vlivem tepla roztahovat, v tu chvíli bylo sklíčko sundáno z plotny a byl odstraněn zbytek vody okolo řezů.

Po odstranění zbytkové vody byla sklíčka pokládala na druhou připravenou plotýnku (taky o teplotě 45 °C), na které byly vzorky ponechány po dobu 48 hodin.

3.2.6 Malloryho trichrom barvení

K odstranění parafinu byly vzorky promývány v xylenu (PENTA). Tento krok je nezbytný pro následné provedení Malloryho barvení. Tato metoda barvení tkání obsahuje kyselý fuchsin, anilinovou modř a oranž G (Mallory, 1900).

Mallory barvení bylo prováděno podle protokolu (Tab. 3), ve kterém jsou zahrnuty i kroky odparafinování a odvodnění vzorků. Chemikálie potřebné k této metodě byly předem připraveny ve skleněných kyvetách. Sklíčka se do kyvet pokládala zešikma, tak aby se zabránilo příliš těsnému kontaktu a nalepení vzorků na sebe.

Po ukončení procesu samotného barvení, byly vzorky montovány do kanadského balzámu a přikryty krycím sklíčkem. Po zaschnutí kanadského balzámu byly vzorky použity pro mikroskopickou analýzu.

Tabulka 3: Malloryho trichrom barvení.

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

3.3 Příprava vzorků pro TEM

Příprava tkání pro metodu TEM zahrnovala nastřížení kutikuly u bílých prepup a odstranění kutikuly u kukel P 8 a indiánských kukel. Dospělcům byla odstraněna hlava a thorax, abdomen byl opatrně třikrát propíchnut wolframovou jehlou. Úprava tkání probíhala v PBS. Vypitvané tkáně byly dány do fixačního média, kterým byl 2,5% glutaraldehyd v 0,2M pufovaném fosfátovém roztoku (PBS). Ve fixačním médiu byly tkáně ponechány po dobu jednoho týdne za teploty 4 °C.

Pro následující kroky byla veškerá práce prováděna v laboratoři elektronové mikroskopie. Po fixaci bylo nutné vymýt zbytky fixačního média ze vzorků pomocí vypíracího roztoku, který obsahuje 0,1M pufr a 4 % glukózy. Vzorky byly promývány za použití třepačky (MR-1 Biosan), ve které byly 3x po dobu 15 minut. Po sundání z třepačky se vzorky ponořily do roztoku, který obsahoval vypírací pufr a 4% OsO₄ v poměru 1:1. V této směsi se vzorky nechaly po dobu 2 hodin (Podlahová, Š., 2019).

Další částí bylo odvodnění vzorků za pomoci vzestupné acetonové řady a prosycování vzorků směsí pryskyřice (EPON medium) a 100% acetonu v měnících se poměrech (Tab.4).

Po 24 hodinách bylo nutné vzorky naorientovat v zalévacích silikonových formičkách. Každý vzorek měl přidělené své číslo, aby nedošlo k záměně. Naorientované tkáně se na 24 hodin uložily do termostatu s nastavenou teplotou 60 °C. Tento krok je nutný k polymerizaci pryskyřice. Připravené vzorky v pryskyřici byly nakrájeny ultramikrotomem na polotenkové řezy.

Tabulka 4: Odvodnění a prosycování vzorků.

30% aceton	15 minut
50% aceton	15 minut
70% aceton	15 minut
80% aceton	15 minut

90% aceton	15 minut
95% aceton	15 minut
100% aceton	15 minut
Pryskyřice + aceton 1:2	1 hodina
Pryskyřice + aceton 1:1	1 hodina
Pryskyřice + aceton 2:1	1 hodina
Čistá pryskyřice	24 hodin

3.3.1 Příprava skleněného nože

Před samotným krájením bylo potřeba připravit si skleněné nože, které byly připraveny lámáním skleněné tyče na stroji „knife maker“. Pod binokulární lupou byl kontrolován zlom řezů, který tvořil ostří nožů. Na správném zhotovení zlomů závisela kvalita řezů. Vytvořený nůž měl trojúhelníkový tvar a klín s úhlem 45°. V dalším kroku se nůž oblepil speciální páskou, která byla připevněna pomocí laku nebo vosku do tvaru malé prohlubně, do které byla nalita destilovaná voda, na jejíž hladinu se vyplavovaly vytvořené řezy (Podlahová, Š., 2019).

3.3.2 Trimování

Metoda trimování zahrnuje ruční úpravu pryskyřice, ve které jsou zalité vzorky. Pryskyřici bylo třeba ručně seřezat do tvaru pyramidy, aby se zmenšila plocha řezu. Z několika připravených vzorků se použily pro krájení maximálně dva.

K odstranění pryskyřice bylo prováděno ručně za použití žiletky. Ke zvýšení přesnosti byla pryskyřice odstraňována pod mikroskopem ultramikrotomu Leica EM UC6. Cílem této úpravy bylo vytvoření bločku, který při pohledu shora připomínal pravidelný lichoběžník. Bylo potřeba, aby strana směřující k noži měla delší základnu a zamezilo se tak nestabilitě při krájení.

3.3.3 Krájení a barvení polotenkých řezů

Na začátku krájení bylo nutné seřadit si mikrotom a naorientovat bloček se vzorkem správně k noži. Nůž, který je součástí mikrotomu, byl opatrně přiblížen k bločku. Do prohlubně vzniklé v noži byla nalita destilovaná voda v takovém množství, aby hrana nože nebyla suchá. Zároveň bylo nutné dbát na to, aby voda z vaničky nepřetékala za řeznou hranu nože. Správná hladina vody je nezbytná pro zamezení shrnování řezů za hranu nože. Stolek s nožem byl přibližován k bločku, dokud byl viditelný stín na jeho přední straně. Úpravou pozice nože a bločku se zarovnal stín, tak aby byl rovný.

Vzorky byly nakrájeny na ultramikrotomu Leica EM UC6 rychlostí 2 mm/s o šířce 500 nm (poloténkové řezy). Vedle mikrotomu bylo připravené podložní sklíčko s kapkou 10% acetonu. Nakrájené vzorky byly nabrány jehlou a přeneseny do připravené kapky acetonu. Na jedno sklíčko se dávalo průměrně 15 kusů. Sklíčko s řezy bylo přeneseno na plotýnku (Slides Warmer XH-2002) s nastavenou teplotou 45 °C, na které řezy nechaly uschnout.

Zaschlé řezy byly pokapány přefiltrovaným roztokem 1% toluinové modře (Sigma) v 1% tetraboritanu sodném (Sigma). Po nanesení na vzorek se podložní sklíčko umístilo na připravenou plotýnku o teplotě 45 °C po dobu 1 minuty. Následně byl vzorek promyt destilovanou vodou a umístěn zpět na plotýnku k vysušení.

3.3.4 Příprava trvalých preparátů

Pro přípravu trvalých preparátů bylo potřeba k vysušeným nabarveným řezům přidat kapku pryskyřice a přiložit na ně krycí sklíčko. Takto připravené vzorky bylo potřeba dát na plotýnku o teplotě 45 °C, aby se pryskyřice natáhla přes celou plochu krycího sklíčka. Sklíčka na plotýnce byla ponechána po dobu 24 hodin, aby pryskyřice dostatečně zatvrdla.

3.4 Příprava tkání pro qPCR

Mouchy byly vybírány v 5 časových obdobích. V období kukly v časech bílá prepupa, P 8 a indiánská pupa a dospělci v časech 0 a 24 hodin po vylíhnutí. Bílá prepupa byla nastříhnutá na jednom konci a její obsah byl odebrán sestříženou pipetou do připravené mikrozkrumavky se 100 µl TRIzol Reagentu. Pupy P 8, P 15 a dospělci byly připevněny jehličkami na pitvací mističku se Sylgardem (ELCHEMCo) ventrální stranou nahoru. Abdomen byl otevřen a okrajovými částmi připevněn jehličkami. Z obsahu abdomenu byly odstraněny střeva, ovaria a další orgány, tak aby nedošlo k poškození tukového tělesa.

Sestříženou pipetou bylo tukové těleso přemístěno do mikrozkušavky s připraveným 100 μ l TRIzol Reagentem. Na jeden vzorek bylo připraveno 5 jedinců. Takto připravený vzorek byl použit k následné izolaci RNA.

3.5 Izolace RNA

Vzorky v mikrozkušavkách byly homogenizovány pomocí drtítka, které bylo ošetřené DEPC H₂O. Ke zhomogenizovaným tkáním bylo přidáno 1000 μ l TRIzol Reagentu a 200 μ l chloroformu. Všechny vzorky byly postupně promíchány pomocí vortexu (po dobu 20-30 sekund) a ponechány 10 minut za pokojové teploty. Dále byly vzorky odstředěny na centrifuze (15 minut, 4 °C, 14 000 RPM). Po odstředění se oddělily 2 viditelné fáze. Vodná fáze (supernatant) byla odsátá do nových mikrozkušavek, které byly umístěny na led. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno 2 μ l glykogenu pro zviditelnění peletu a 500 μ l 100% isopropanolu. Takto připravené vzorky byly ponechány na ledu po dobu 10 minut. Následně se vzorky centrifugovaly (10 minut, 4 °C, 14 000 RPM), supernatant byl odstraněn a ke vzniklému peletu bylo přidáno 500 μ l 75% EtOH (96% EtOH v DEPC H₂O). Vzorky byly opět centrifugovány (5 minut, 4 °C, 14 000 RPM), potom se opatrně odstranil supernatant a samotný pelet se opět centrifugoval (1 minuta, 4 °C, 14 000 RPM). Po centrifugaci došlo k odstranění zbytku ethanolu, a aby bylo jeho odstranění kompletní nechaly se otevřené mikrozkušavky po dobu asi 3 minut v pokojové teplotě. Izolovaná RNA byla rozpuštěna v 30-50 μ l DEPC H₂O. Koncentrace a čistota získané RNA byla vyhodnocena na *NanoDrop* spektrofotometru (UVS-99 ACTGene).

3.6 Reverzní transkripce

Ke každému vzorku bylo přidáno 1 μ l 50 μ M oligo(dT)₂₀ primeru (5' - d(TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT)-3', KR), 4 μ l 20 μ M dNTPs a 2 μ l DEPC H₂O. Tato směs se krátce centrifugovala na Eppendorf's MiniSpin a následně se umístila na termoblok o teplotě 65 °C po dobu 5 minut. Po vyndání z termobloku byly mikrozkušavky přeneseny na led, kde byly po dobu 1 minuty. Po sundání z ledu byly vzorky opět krátce centrifugovány. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 1 μ l 0,1M DTT, 4 μ l 5x FS III bufferu a 1 μ l SS III reverzní transkriptázy (vše od Invitrogen). Následně byly vzorky inkubovány za teploty 50 °C po dobu 50 minut. Nakonec byly vzorky inkubovány po dobu 15 minut za teploty 75 °C.

3.7 qPCR

Ke každému vzorku z reverzní transkripce bylo přidáno 200 µl dH₂O. Poté byly do každé mikrokumavky přimíchány 3 µl směsi, která obsahovala 1000 µl TP 2x SYBR MasterMix (Top-Bio), 25 µl 20 µM forward primeru (KRD), 25 µl 20 µM reverzního primeru (KRD) a 400 µl PCR ultra H₂O (Top-Bio). Vzorky byly měřeny v tripletech na 96 jamkové destičce (Bio-Rad), která byla pokryta fólií Microseal® 'C' Film (Bio-Rad) a polytetrafluoroethylenovou krycí podložkou (Bio-Rad) za použití CFX 1000 Touch Real-Time Cycler (Bio-Rad). Byl použit následující qPCR protokol:

95 °C 3 minuty

94 °C 15 sekund denaturace

54 °C 30 sekund zchlazení

72 °C 40 sekund prodloužení

Fluorescenční detekce

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

Data získaná z qPCR byla analyzována za použití double delta Ct analysis. Genová exprese všech analyzovaných genů byla vztažena ke genové expresi housekeeping genu *rp L32* (*rp49*) za použití následující sekvence primerů:

Tabulka 5: Použité sekvence primerů.

<i>Rp49</i>	Forward	5' AAGCTGTCGCACAAATGGCG3'
	Reverse	5' GCACGTTGTGCACCAGGAAC3'
<i>Mtp</i>	Forward	5' ACTTGGACTTCTACAGCGGC 3'
	Reverse	5' TCTGTGAAGGAGGCTTTCAAT 3'
<i>Hsl</i>	Forward	5' CTAGTGGAGACTGGTCGGGA 3'
	Reverse	5' TTCTGTTGCCAGCGCATTTC 3'

<i>Bmm</i>	Forward Reverse	5' ATTTGCAATCACTCCCCCGT 3' 5' GGCCGTGGAGCTAAAAGTCT 3'
<i>ApoLTP</i>	Forward Reverse	5' AGCGAAACAAAAAGCTGCGA 3' 5' AAGGAGTCCTGCAAATGTGA 3'
<i>ApoLP P</i>	Forward Reverse	5' TAATAGCGCCGGCCATCAAT 3' 5' TGCTTGGCTTACCCAATTCT 3'
<i>Sap-r</i>	Forward Reverse	5' AGTTCCTTTGCGTTGCAGTG 3' 5' CAAAGTTTGCGGCTCGTGAA 3'
<i>nSMase</i>	Forward Reverse	5' TTCCCTTGACACCGATCTGC 3' 5' TACGGACCACGCATGAAACA 3'
<i>Bwa</i>	Forward Reverse	5' TCTGGTCGGAGTTATCCCGT 3' 5' TCCGCCAATGAAAATGCTGC 3'
<i>Schlank</i>	Forward Reverse	5' AAAATTCGAGCCATGCACCG 3' 5' GGGTATGTTGCCCCCGTTTA 3'
<i>CDase</i>	Forward Reverse	5' AAGCGCCAGCTTGAGGTTAT 3' 5' CGTAGGGATACTTTCCGCCC 3'

3.8 Invertovaný mikroskop

Pro zhotovení fotografií parafinových řezů byl použit invertovaný mikroskop (Olympus IX71). Pořízené fotografie byly použity ke zmapování velikosti larválních adipocytů a velikosti a počtu lipofuscinových granul uvnitř larválních adipocytů. Fotografie byly analyzovány v programu Fiji.

3.9 Thunder mikroskop

Pro zhotovení fotek polotenkých řezů, které byly připraveny za účelem pozorování lipidových kapek, byl použit Thunder mikroskop (Leica DM6B). Vyfocené vzorky byly dále analyzovány za použití Fiji softwaru.

3.10 Transmisní elektronový mikroskop

Vzorky pro transmisní elektronový mikroskop byly připravovány servisním oddělením v Laboratoři elektronové mikroskopie. Před zhotovením ultratenkých řezů byly vzorky nafixovány v 2,5% glutaraldehydu a následovala odvodňovací a prosycovací řada popsána v kapitole 3.3. Příprava vzorků pro TEM. Vzorky byly po odvodnění a prosycení nakontrastovány pomocí uracyl acetátu (0,3M v 50% metanolu) a pouhlikovány. Následovalo krájení na diamantovém noži, které bylo provedeno technickou pracovnící Laboratoře mikroskopie a histologie.

K analýze ultratenkých řezů byl použit transmisí elektronový mikroskop JEM-1400 JEOL. Pořízené fotografie byly využity ke zdokumentování procesu fúzování lipofuscinových granulí.

3.11 ImageJ (Fiji)

Pro analýzu fotografií parafinových a polotenkých řezů byl použit program ImageJ (Fiji), ve kterém byla měřena velikost larválních adipocytů a lipofuscinových granulí pomocí předem nastaveného měřítka. Objekty byly vždy měřeny přes střed, tak aby měřená vzdálenost byla co největší. Larvální tukové buňky byly vždy měřeny pouze pokud bylo viditelné jádro. Veškeré měření bylo prováděno ručně.

Počítání lipofuscinových granulí bylo děláno jednotlivě po adipocytech. Granule byly počítány pouze u adipocytů, které měly jasně viditelné jádro. Do výsledků byly zahrnuty pouze granule, které byly zřetelně ohraničeny. Sumarizace lipofuscinových granulí byla prováděna ručně.

Obdobným způsobem bylo prováděno počítání a měření lipidových kapek. K analýze byly využity pouze jasně ohraničené kapky v buňkách s viditelným jádrem. Lipidové kapky byly měřeny přes pomyslný střed.

3.12 Graphpad Prism

Statistická data mé magisterské práce byla zpracována pomocí programu Graphpad Prism 7.03. Signifikance pro velikost larválních adipocytů, počet a velikost lipofuscinových granulí a počet a velikost lipidových kapek byla stanovena pomocí Two-way ANOVY a Tukey's multiple comparison testu podle následujícího postupu: hladina významnosti $p \leq 0,05$ jedna hvězdička (*), $p \leq 0,01$ dvě hvězdičky (**), $p \leq 0,001$ tři hvězdičky (***). Pro vyhodnocení signifikance měny exprese genů byla použita statistická metoda Two-way ANOVA a Sidak's multiple comparison test podle následujícího postupu: hladina významnosti $p \leq 0,05$ jedna hvězdička (*), $p \leq 0,01$ dvě hvězdičky (**), $p \leq 0,001$ tři hvězdičky (***).

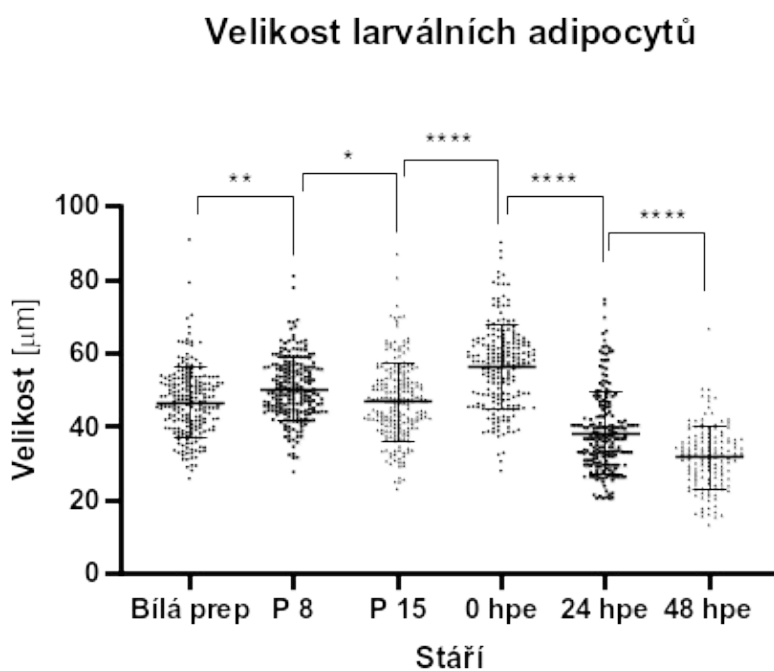
4 Výsledky

Tato práce si klade za cíl zmapovat změny adipocytů na úrovni jejich morfologie i genové exprese genů zapojených v metabolismu lipidů. Jako první krok jsme proto zvolili zmapování velikosti larválních adipocytů v 6 časových obdobích.

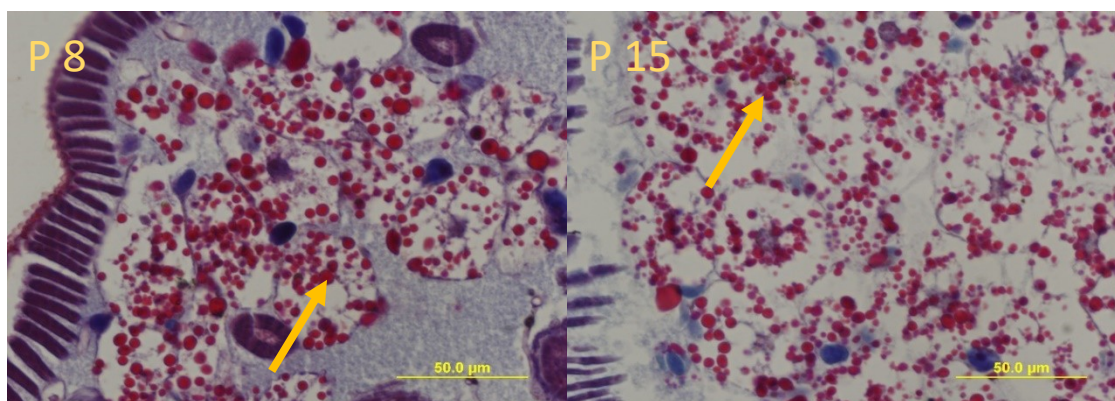
4.1 Zmapování velikosti larválních adipocytů

Z výsledků měření velikosti larválních adipocytů můžeme říct, že zatímco během období kukly P8 se velikost adipocytů postupně zvětšuje z průměrných 46 μm na 50 μm . U kukly P 15 vidíme zmenšení průměrné velikosti adipocytů na 46 μm . Po vykuknutí dochází k signifikantnímu nárůstu larválních adipocytů u dospělého starého 0 hpe (průměrná velikost 56 μm). Následuje výrazný pokles u dospělce starých 24 hpe, u kterých se průměrná velikost pohybuje okolo 38 μm a u dospělého starého 48 hpe dále klesá na průměrných 31 μm (Obr.2).

Pro analýzu velikosti larválních adipocytů byly zhotoveny a využity parafinové sagitální řezy obarvené Malloryho trichrom barvením. Během pozorování larválních adipocytů jsme si všimli přítomnosti lipofuscinových granulí, které jsou viditelné uvnitř larválních adipocytů (Obr. 3). Další krok mé práce měl tedy vést ke zmapování počtu a velikosti lipofuscinových granulí, pro detailnější porozumění morfologických procesů, které se odehrávají v tukovém tělese během metamorfózy a post-metamorfoického vývoji drosophily.



Obrázek 2: Velikost larválních adipocytů. Graf znázorňuje změnu velikosti larválních adipocytů (osa Y) v šesti časových obdobích udávající stáří mouchy (osa X). V každém časovém období bylo změřeno 200 buněk, kromě času 48 hpe, kdy je množství larválních adipocytů omezené. V období bílé prepupy jsou výsledky signifikantně odlišné od velikosti adipocytů v období P 8 ($p = 0,0055$). V kukle P 15 se velikost larválních adipocytů zvětšuje ($p = 0,0193$). Nejvýraznější nárůst pozorujeme v dospělci 0 hpe na hladině významnosti $p < 0,0001$. V dospělcích 24 hpe a 48 hpe se velikost buněk snižuje ($p < 0,0001$). Svislé přímkové značky zaznamenávají směrodatnou odchylku. K posouzení signifikancí byla použita Two-way ANOVA (Tukey's multiple comparison test).



Obrázek 3: Znárodnění lipofuscinových granulí uvnitř larválních adipocytů na parafinových řezech obarvených Malloryho trichrom barvením. Obrázky ukazují larvální tukovou tkáň s larválními adipocyty v kuklách P 8 a P 15. Žluté šipky ukazují na lipofuscinové granule uvnitř buněk.

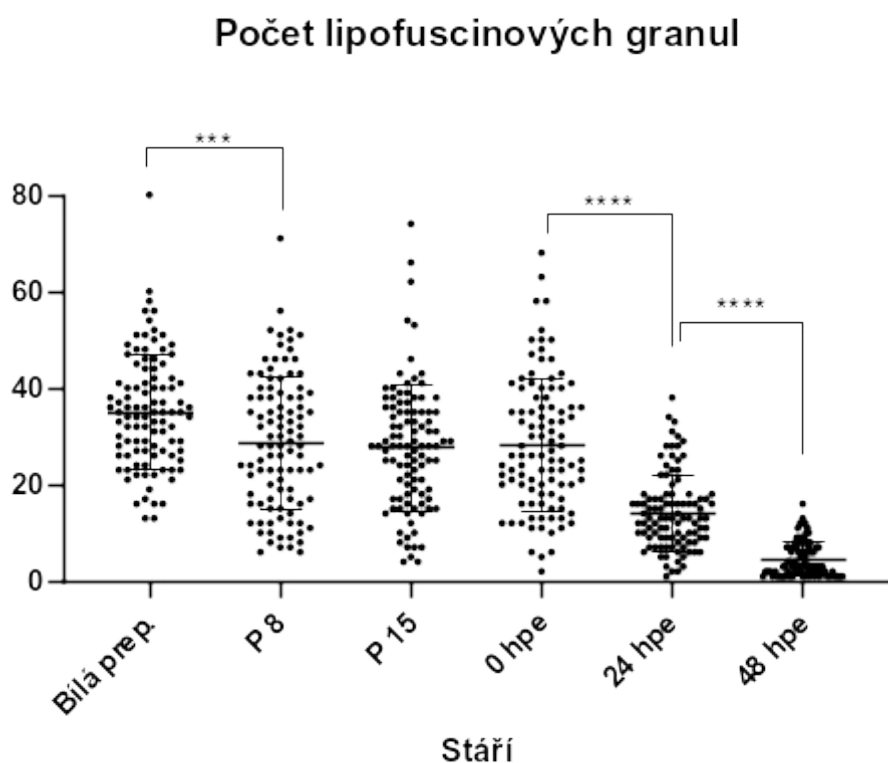
4.2 Analýza počtu a velikosti lipofuscinových granul

Dalším krokem pro porozumění změn, které probíhají během metamorfózy, jsme zvolili zmapování počtu a velikosti lipofuscinových granulí uvnitř larválních adipocytů. Tato analýza byla prováděna na sagitálních parafinových řezech, které byly obarveny Malloryho trichrom barvením.

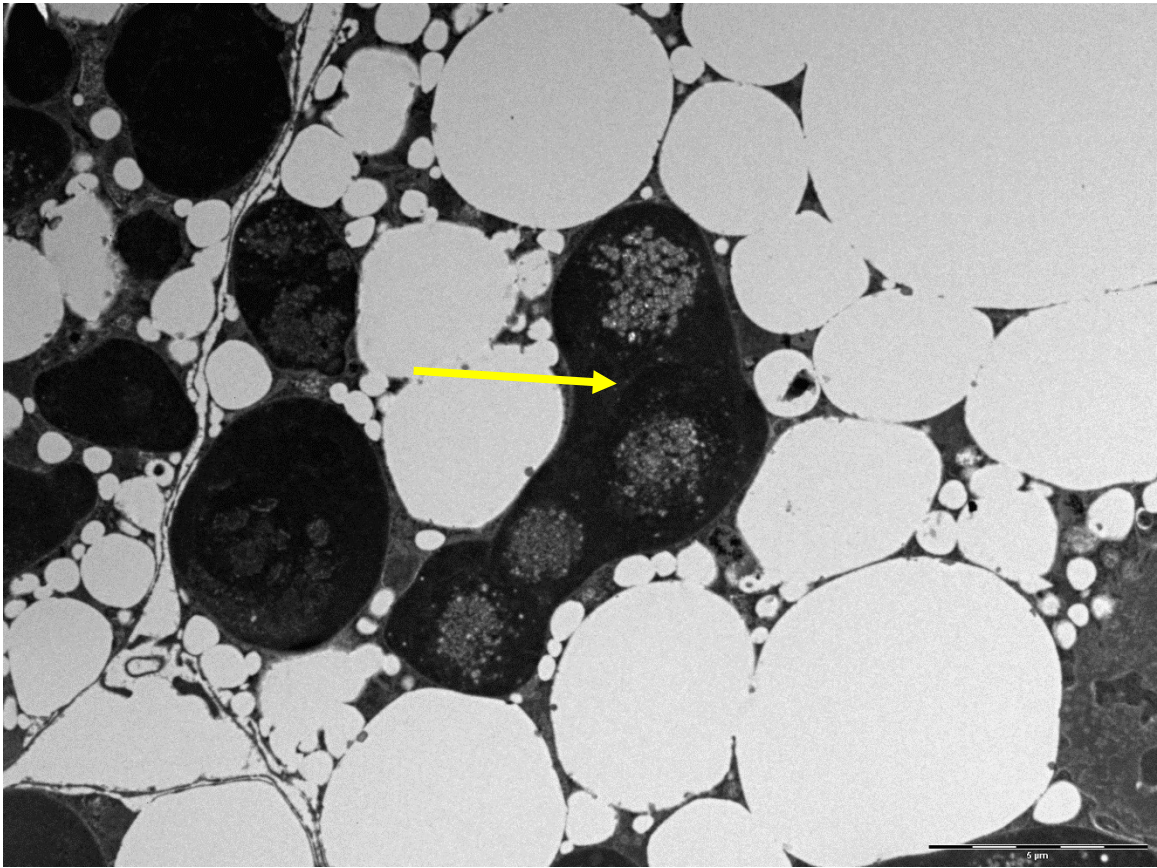
Pro počítání a měření velikosti lipofuscinových granulí byly vybírání jedinci ze šesti časových období (bílá prepupa, P 8, P 15, 0 hpe, 24 hpe, 48 hpe). Z výsledků počtu lipofuscinových granulí můžeme usuzovat, že se výrazně snižuje mezi bílou prepupou a pupou P 8. Naopak mezi kuklami P 8, P 15 a 0 hpe nejsou žádné změny v množství granul. Rozdíl pozorujeme až v post-metamorfickém vývoji v časech 0 hpe, 24 hpe a 48 hpe, kdy se počet granulí výrazně snižuje (Obr. 4). Charakterizace množství granulí byla prováděna na 100 larválních adipocytech, kromě dospělého starého 48 hodin, který obsahuje omezené

množství larválních buněk. Pro období 48 hpe byly granule počítány pouze v 87 adipocytech.

Analýza počtu lipofuscinových granulí je doplněna o snímek z transmisního elektronového mikroskopu, na které, je zachyceno fúzování jednotlivých granulí uvnitř larválního adipocytu (Obr. 5). Toto pozorování nás vedlo k následné analýze změny velikosti lipofuscinových granulí.



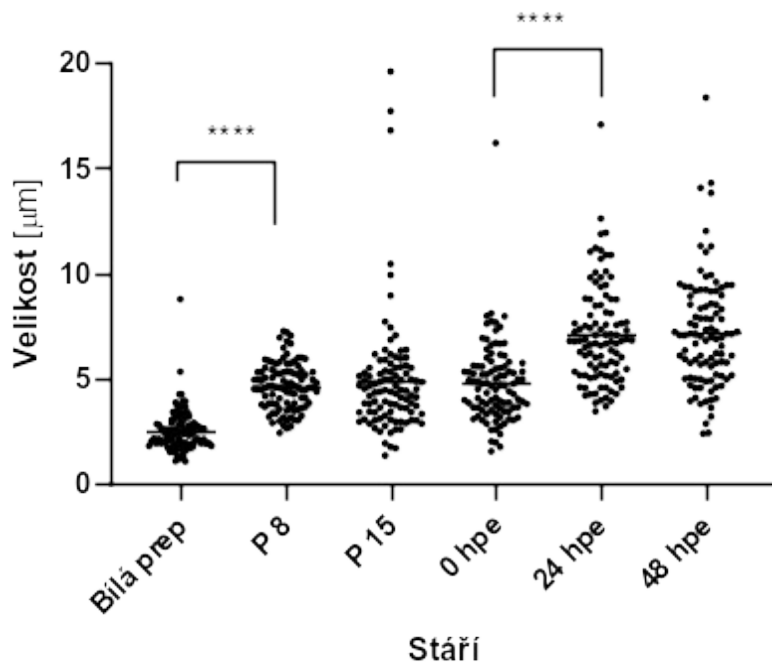
Obrázek 4: Počet lipofuscinových granulí. Graf ukazuje postupné snižování množství lipofuscinových granulí v čase. Signifikantní změny v množství lipofuscinu jsou patrné mezi bílou prepupou a kuklou P 8 ($p = 0,0006$). Další signifikantní rozdíly pozorujeme v období dospělosti v časech 24 hpe a 48 hpe ($p < 0,0001$). Svislé přímkové čáry reprezentují směrodatnou odchylku. K posouzení signifikancí byla použita Two-way ANOVA (Tukey's multiple comparison test).



Obrázek 5: Snímek z transmisního elektronového mikroskopu zachycující fúzující lipofuscinové granule uvnitř larválního adipocytu. Snímek byl pořízen z jedince ve vývojovém stádiu P8. Měřítka znázorňuje velikost 1 μm . Žlutá šipka ukazuje na jedno z fúzních míst granulí.

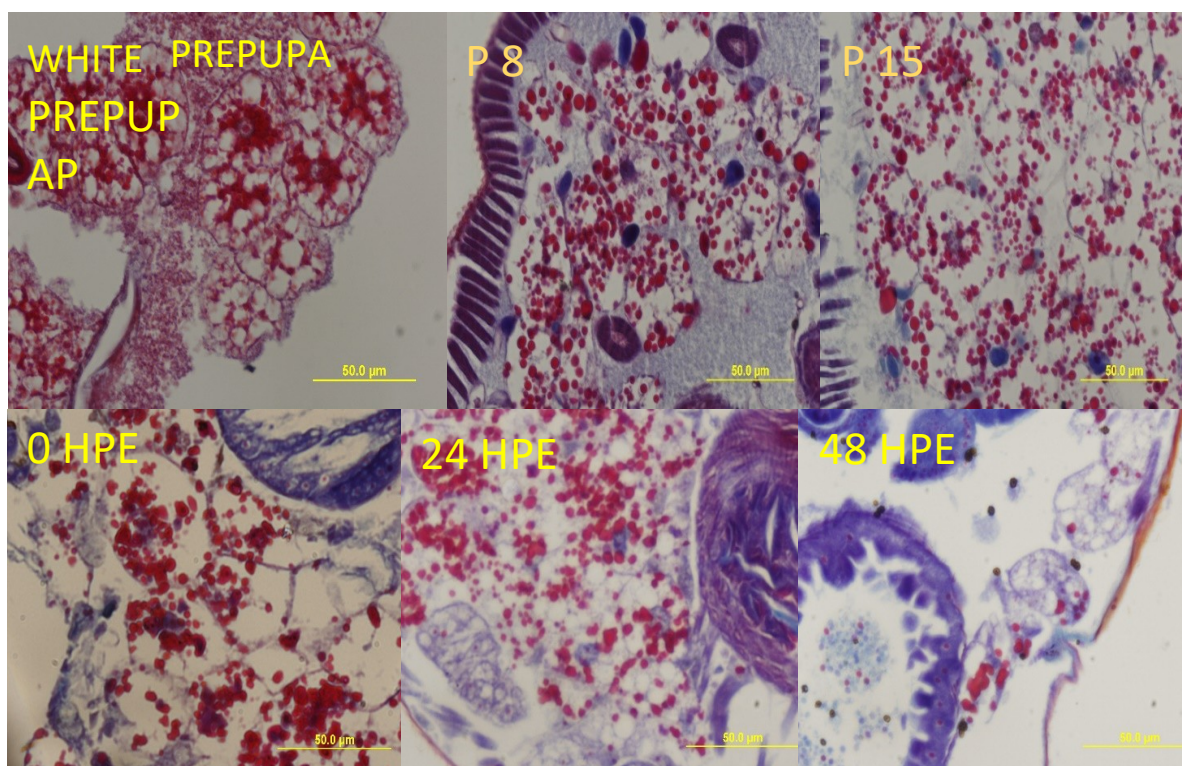
Během kvantifikace lipofuscinových granulí jsme si všimli změny jejich velikosti. Proto jsme zmapování množství granulí rozšířili o charakterizaci jejich velikosti. Výsledky ukazují na signifikantní zvětšení lipofuscinu v období kukly P 8. Velikost zůstává neměnná v kukle P 15 i u čerstvě vylíhnutého dospělce. Další výrazné zvýšení velikosti granulí můžeme pozorovat mezi vývojovým stádiem P 15 a dospělcem 24 hpe. Mezi časy 24 hpe a 48 hpe se velikost lipofuscinu nemění (Obr. 6). Měření bylo prováděno na 100 larválních adipocytech v každém časovém období.

Velikost lipofuscinových granul



Obrázek 6: Velikost lipofuscinových granulí uvnitř larválních adipocytů. Tento graf ukazuje výrazné zvětšení lipofuscinu v kukle P 8 a v dospělci 24 hpe ($p < 0,0001$). V obdobích kukel P 8, P 15 a dospělci starém 0 hpe je velikost granul neměnná. Svislé přímkové reprezentují směrodatnou odchylku. K posouzení signifikancí byla použita Two-way ANOVA (Tukey's multiple comparison test).

Detailnější změna velikosti lipofuscinu během vývoje je zdokumentována na obrázku 7. Na fotografiích si lze všimnout, že v období bílé prepupy jsou lipofuscinové granule reprezentovány pouze jako drobné červené tečky, shromažďující se především okolo buněčného jádra. V kuklách P 8 a P 15 a v čerstvě vylíhnuté mouše jsou granule rozptýleny po celé buňce a mají variabilní velikost, zatímco v období dospělce starého 24 hpe můžeme vidět větší množství granulí, které jsou rozmístěny po celé ploše buňky.

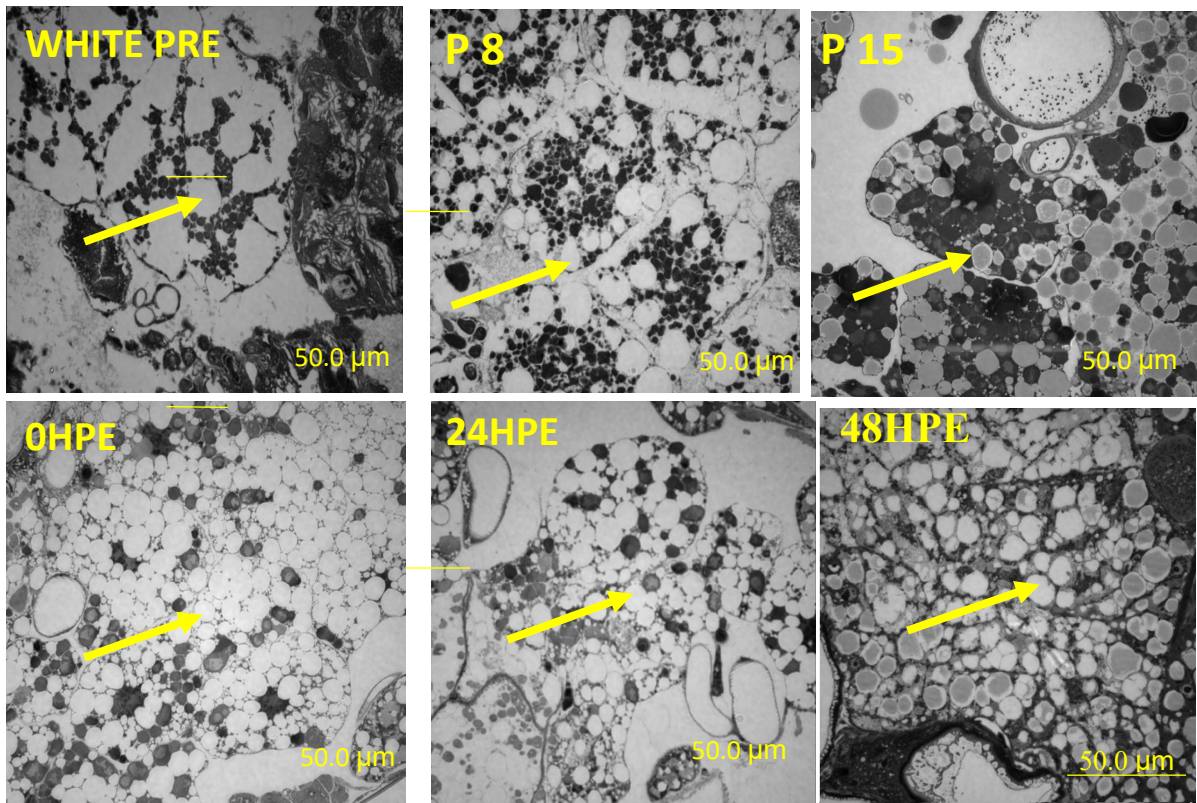


Obrázek 7: Změna velikosti lipofuscinových granulí v průběhu metamorfózy a post-metamorfického vývoje. Na fotografiích jsou zobrazeny sagitální parafinové řezy obarvené Malloryho trichrom barvením. Obrázek ukazuje lipofuscinové granule uvnitř larválních adipocytů. Měřítko ukazuje velikost 50µm.

Přestože Malloryho trichrom barvení nám poskytlo cenné informace o velikosti adipocytů a počtu a velikosti lipofuscinových granulí, z důvodu strukturálního barvení tkáně nebylo možné posoudit velikost lipidových kapek v těchto tkáních. V další části jsme se proto rozhodli zhotovit polotenské řezy, které byly obarveny toluidinovou modří. Tento krok měl zajistit vizualizaci místa lipidových kapek, které jsou sice odmyty v procesu přípravy polotenských řezů, nicméně zůstanou zachovány jejich membrány, které nám umožnily jejich charakterizaci.

4.3 Analýza počtu a velikosti lipidových kapek

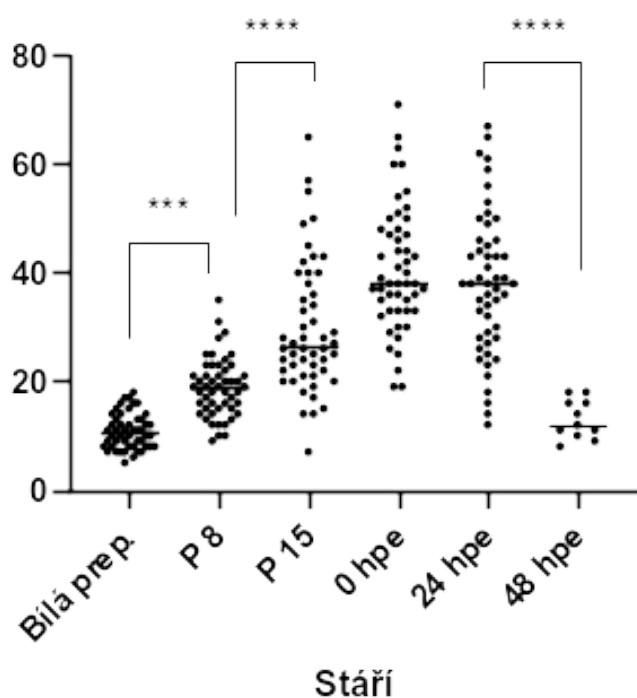
Pro další rozšíření dosavadních dat o změnách morfologie tukové tkáně během metamorfózy drosophily, jsme zhotovili polotenské řezy obarvené toluidinovou modří, které měly posloužit ke zmapování variability lipidových kapek uvnitř larválních adipocytů v průběhu vývoje tukového tělesa (Obr 8). Stejně jako u lipofuscinových granulí jsme se zaměřili na změnu jejich velikosti a počtu.



Obrázek 8: Polotenké řezy obarvené toludinovou modří. Na fotkách jsou zobrazeny lipidové kapky v průběhu metamorfózy a post-metamorfického vývoje. Žluté šipky ukazují na lipidové kapky uvnitř larválních adipocytů.

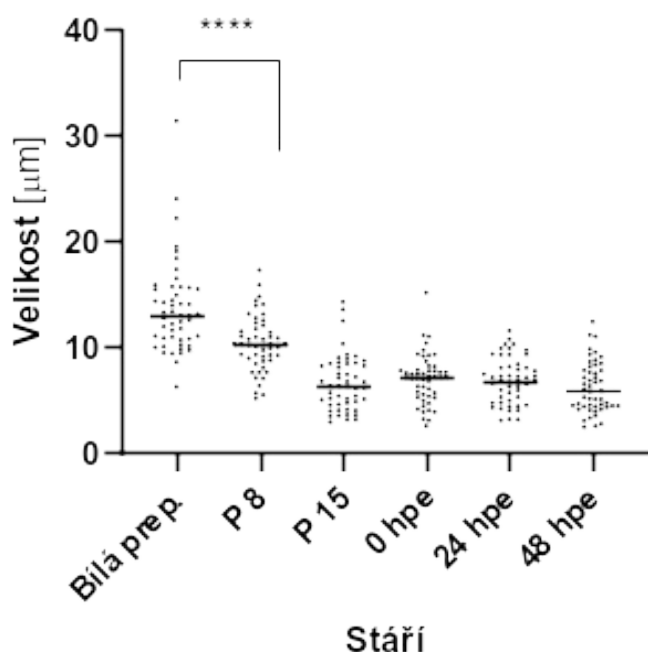
Pro počítání a měření velikosti lipidových kapek byly vybíráni jedinci ze šesti časových období (bílá prepupa, kukla P 8, kukla P 15 a dospělci 0 hpe, 24 hpe, 48 hpe). Jde o stejná časová období jako u analýzy lipofuscinových granulí. Z výsledků vidíme, že počet lipidových kapek se významně zvyšuje v kukle P 8 i P 15. Mezi dospělci 0 hpe a 24 hpe se množství lipidových kapek nemění. Jejich počet výrazně klesá u 48 hpe starého dospělého (Obr. 9). Velikost lipidových kapek se významně snižuje pouze v kukle P 8 (Obr. 10).

Počet lipidových kapek



Obrázek 9: Počet lipidových kapek uvnitř larválních adipocytů. V grafu je patrné signifikantní navýšení počtu lipidových kapek v kukle P 8 ($p = 0,0007$) a v kukle P 15 ($p < 0,0001$). V čerstvě vylíhnutém dospělci a dospělci starém 24 hodin se množství kapek nemění. K výraznému snížení jejich počtu dochází v dospělci starém 48 hodin ($p < 0,0001$). Svislé přímký charakterizují směrodatnou odchylku. K výpočtu signifikancí byla použita Two-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons tests).

Velikost lipidových kapek



Obrázek 10: Velikost lipidových kapek v larválních adipocytech. Z grafu vidíme, že velikost kapek se signifikantně snižuje u kukly P 8 ($p < 0,0001$). V dalších měřeních časech se jejich velikost výrazně nemění. Svislé přímkky charakterizují směrodatnou odchylku. K výpočtu signifikancí byla použita Two-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons tests).

4.4 Genová exprese vybraných genů

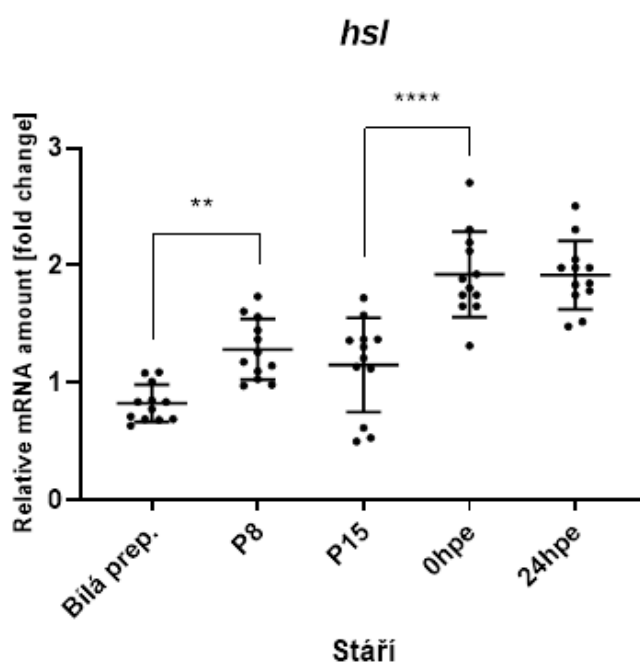
Analyzované geny jsme vybrali na základě předpovědi probíhajících biologických procesů jako jsou lipolýza, transport lipidů a s tím spojená produkce lipoproteinů, syntéza a degradace ceramidu. Míra genové exprese byla analyzována v pěti časových obdobích (bílá prepupa, pupa P 8, pupa P 15 a dospělci v časech 0 hpe a 24 hpe). Zaměřili jsme se na expresi genů zodpovědných za lipolýzu (*hsl*, *bmm*), genů zapojených v mobilizaci lipidových zásob (*apoLTP*, *apoLPP*, *mtp*) ceramidového (*sap-r*, *nSMase*, *schlank*) a sfingomyelinového metabolismu (*bwa CDase*). Míra exprese vybraných genů byla měřena za pomoci metody kvantitativní qPCR.

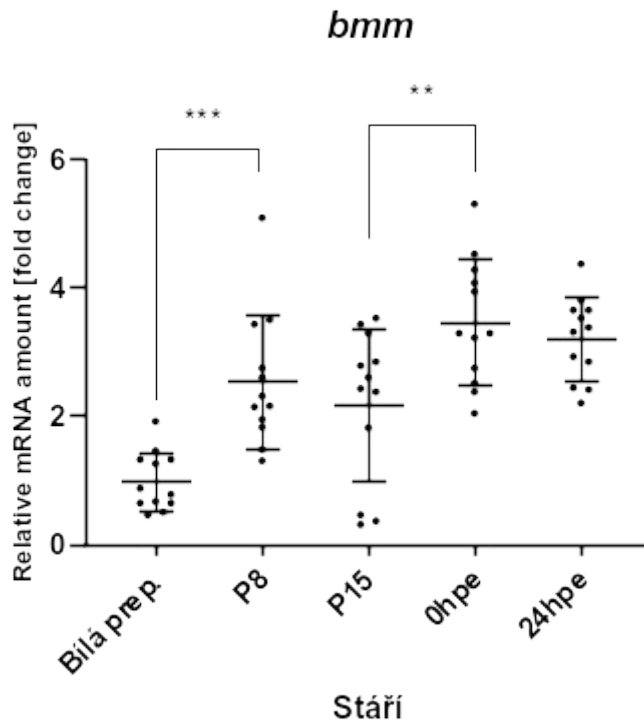
4.4.1 Genová exprese lipolytických genů - *hsl*, *bmm*

Získané výsledky z morfoloické analýzy velikosti larválních adipocytů a změny ve velikosti lipidových kapek nás vedly k otázce, zda budou naše pozorování korelovat s mírou exprese genů, které jsou zodpovědné za lipolýzu. Předpokládali jsme, že kukly a čerstvě vylíhnuté mouchy, které nepřijímají po vykuklení několik hodin potravu, budou mít zvýšenou míru exprese těchto genů.

Pro oba analyzované geny (*hsl*, *bmm*) platí, že míra jejich exprese je signifikantně zvýšena v kukle P 8. V kukle P 15 zůstává neměnná, dále narůstá v čerstvě vylíhnutém dospělci a přetrvává do dospělce starého 24 hodin (Obr. 11 A, B).

A



B

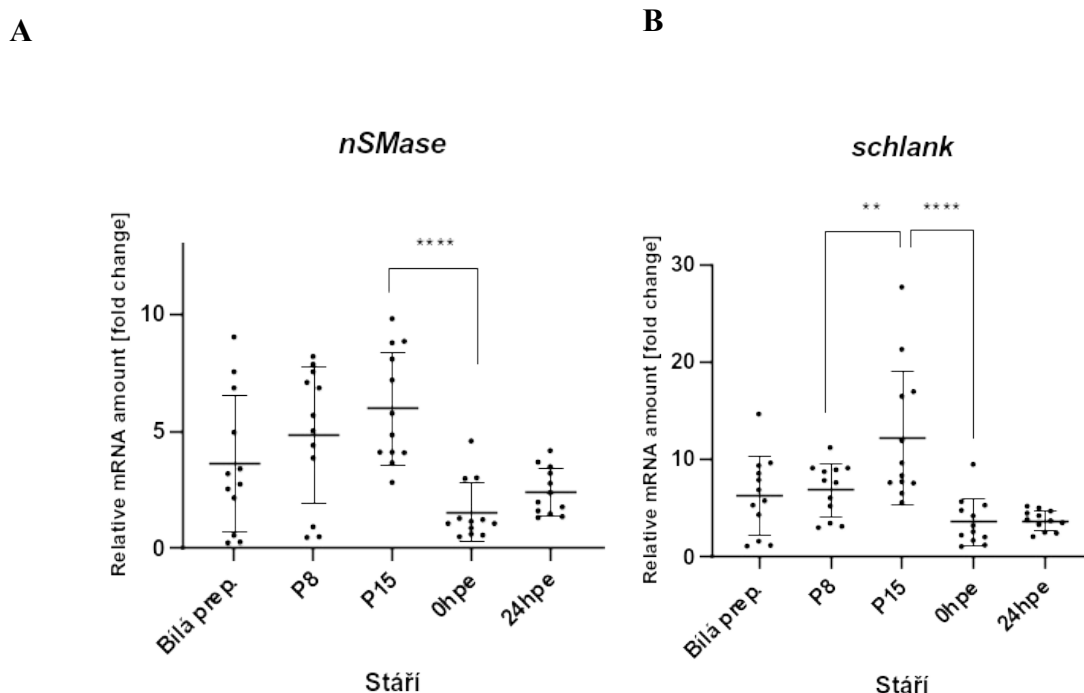
Obrázek 11 A, B: Míra exprese genů *hsl* a *bmm*. U genu *hsl* (A) je zvýšená změna exprese signifikantní mezi bílou prepupou a kuklou P 8 na hladině významnosti $p = 0,0041$ a mezi kuklou P 15 a dospělcem 0 hpe ($p < 0,001$). Exprese genu *bmm* (B) je signifikantně odlišná ve stejných časových obdobích, a to v období kukly P 8 ($p = 0,0004$) a v dospělci 0 hpe ($p = 0,0054$). Vodorovné přímký znázorňují směrodatnou odchylku. Pro výpočet p hodnoty byla použita Two-Way ANOVA (Tuckey's multiple comparisons test).

Výsledky míry genové exprese genů lipidového metabolismu ukazují na výrazné zvýšení exprese po zakuklení a vykuklení mouchy. Z předchozích výsledků víme, že v těchto časech dochází současně ke snížení velikosti larválních adipocytů.

4.4.2 Genová exprese genů syntézy ceramidu – *nSMase*, *schlank*

Jako další krok jsme zvolili zmapování míry exprese genů ceramidového metabolismu. K tomuto kroku nás vedla otázka, zda se bude exprese daných genů lišit v závislosti na nutričním podmínkách, kterým je moucha během vývoje vystavena. Zároveň tato část může sloužit jako podpora dosavadních výsledků z morfologické analýzy tukového tělesa.

Výsledky analýzy exprese genů, které jsou zodpovědné za syntézu ceramidu (*nSMase*, *schlank*), ukazují, že nejvyšší míra exprese je v kukle P 15. Míra exprese genu *nSMase* se v období kukly postupně zvyšuje, maxima dosahuje v kukle P 15 a výrazně klesá u dospělce 0 hpe. Mezi dospělci 0 hpe a 24 hpe jsou výsledky neměnné. Podobný trend můžeme vidět i u genu *schlank*, kde je navíc signifikantní navýšení míry exprese v kukle P 15 (Obr. 12 A, B).



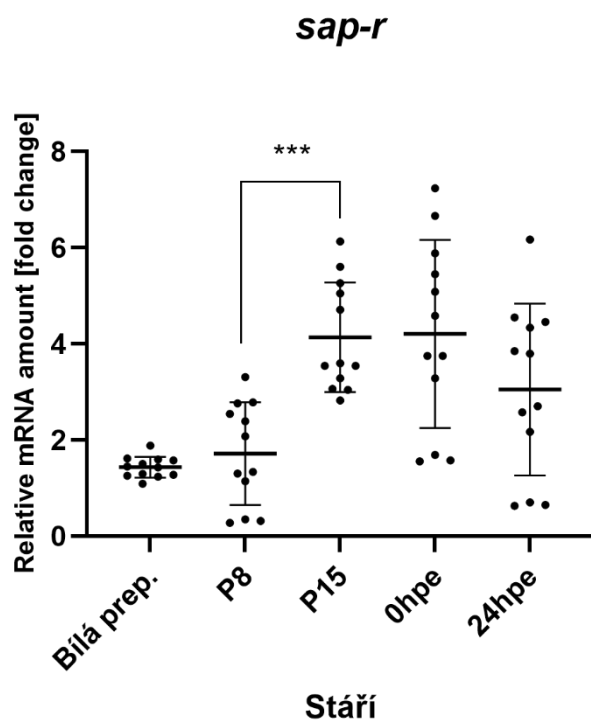
Obrázek 12 A, B: Míra exprese genů *nSMase* a *schlank*. U genu *nSMase* (A) vidíme signifikantní pokles míry genové exprese u dospělce 0 hpe ($p < 0,0001$). Genová exprese genu *schlank* (B) se zvyšuje v kukle P 15 ($p = 0,0079$) a u dospělce 0 hpe pozorujeme výrazné snížení množství exprese ($p < 0,0001$). Vodorovné přímký znázorňují směrodatnou odchylku. Pro výpočet p hodnoty byla použita Two-Way ANOVA (Tuckey's multiple comparisons test).

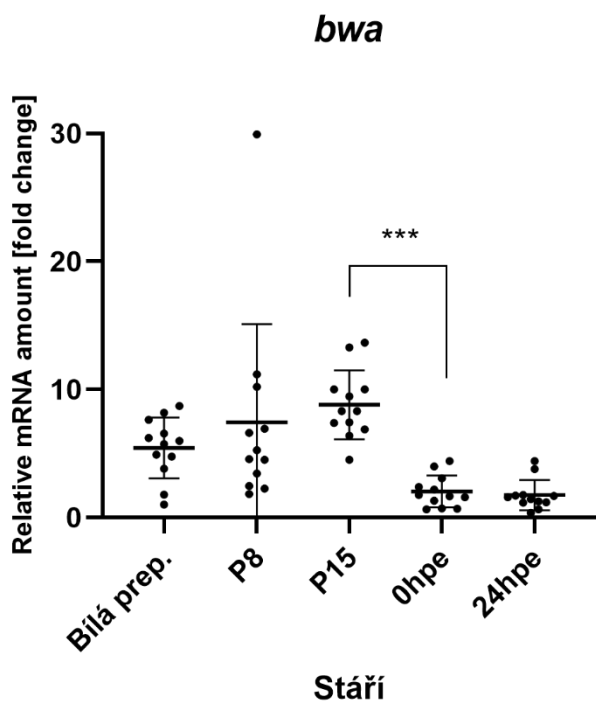
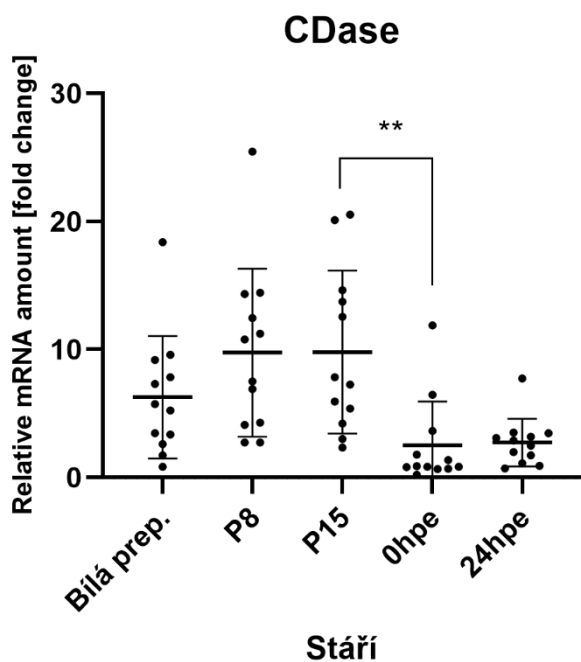
4.4.3 Genová exprese genů zodpovědných za degradaci ceramidu - *sap-r*, *bwa*, *CDase*

Dosavadní získaná data nás vedla k otázce, zda bude docházet během vývoje drosophily vedle syntézy ceramidu také k jeho degradaci, jako přirozené odpovědi na hromadící se sfingolipidy uvnitř adipocytů. Pro tuto analýzu jsme zvolili geny - *sap-r*, *bwa* a *CDase*. Míra genové exprese u genu *sap-r* se výrazně zvyšuje v kukle P 15. V období

dospělce zůstává neměnná. Geny *bwa* a *CDase* mají podobný trend, kdy pozorujeme signifikantní snížení genové exprese v čerstvě vylíhnutém dospělci. V dospělci starém 24 hpe se míra genové exprese nemění (Obr. 13 A, B, C).

A



B**C**

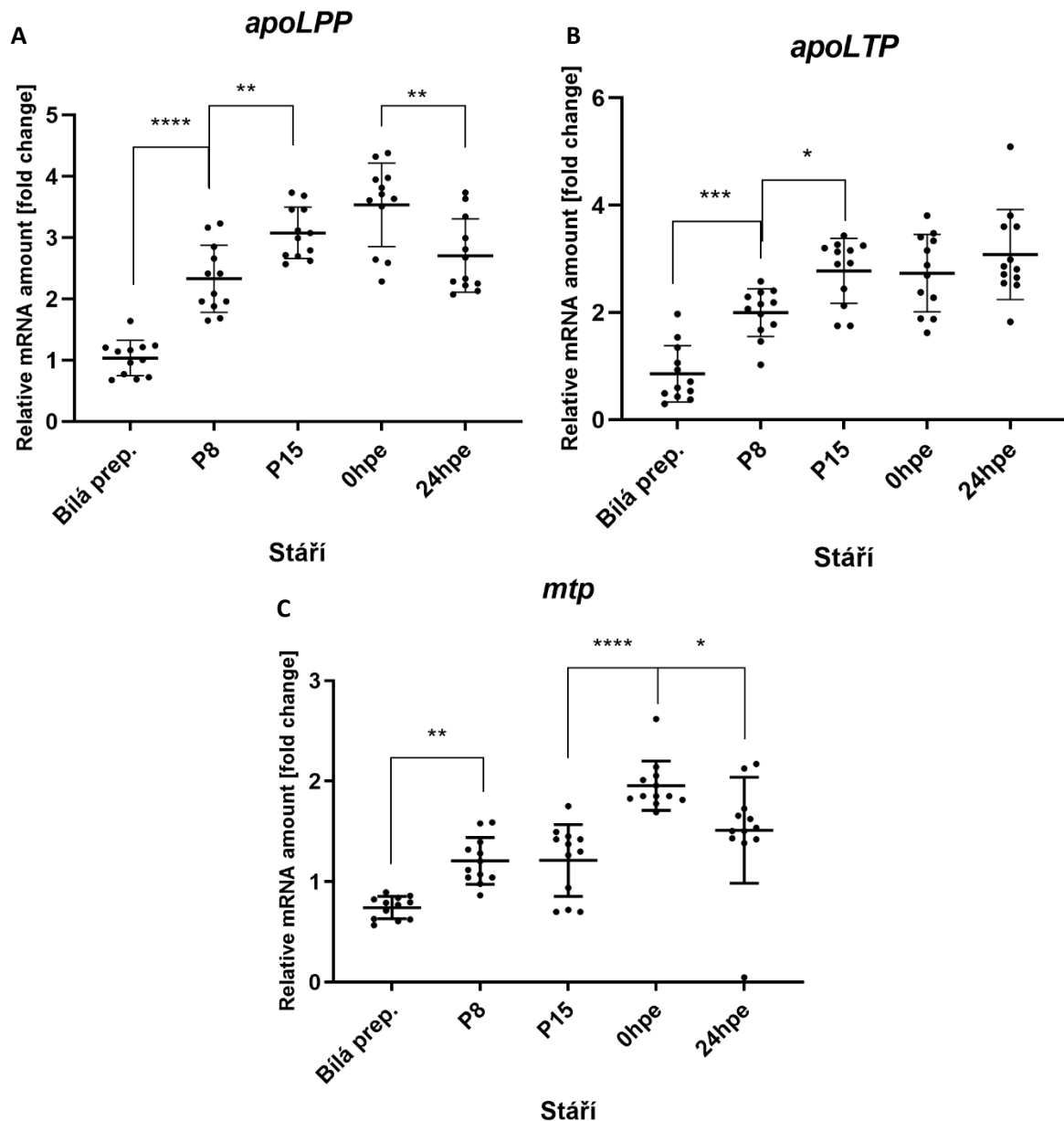
Obrázek 13 A, B, C: Míra exprese genů *sap-r*, *bwa* a *CDase*. Množství exprese genu *sap-r* (A) je signifikantně zvýšeno v kukle P 15 ($p = 0,0002$). U genů *bwa* (B) a *CDase* (C) vidíme pokles exprese u dospělce starého 0 hpe, pro gen *bwa* na hladině významnosti $p = 0,0002$, pro *CDase* $p = 0,0027$.

Vodorovné přímký znázorňují směrodatnou odchylku. Pro výpočet p hodnoty byla použita Two-Way ANOVA (Tuckey's multiple comparisons test).

4.4.4 Genová exprese genů *apoLTP*, *apoLPP*, *mtp*

Na základě dosavadního pozorování fenotypových změn v průběhu metamorfózy, jsme se rozhodli zmapovat změnu genové exprese genů zodpovědných za tvorbu lipoproteinů a transport lipidů v těle drosophily. Mezi tyto geny patří *apoLTP* (*apolipoprotein lipid transfer particle*), *apoLPP* (*apolipophorin*) a *mtp* (*microsomal triacylglycerol transfer protein*).

U genů *apoLPP* (A) a *apoLTP* (B) pozorujeme postupný nárůst míry exprese po dobu metamorfózy. Mezi kuklou P 15 a dospělcem 0 hpe zůstává míra exprese stejná. U genu *apoLPP* můžeme vidět pokles v dospělci starém 24 hpe. Míra genové exprese *apoLPP* výrazně klesá mezi dospělci 0 hpe a 24 hpe. U genu *mtp* (C) vidíme markantní vzrůst míry exprese v kukle P 8, která v zůstává neměnná v kukle P 15 a narůstá v čerstvě vylíhnutém dospělci. Mezi dospělci 0 hpe a 24 hpe vidíme pokles exprese (Obr. 14 A, B, C).



Obrázek 14 A, B, C: Genová exprese genů *apoLPP* (A), *apoLTP* (B) a *mtp* (C). U genu *apoLPP* (A) pozorujeme signifikantní zvýšení míry exprese v kukle P 8 ($p < 0,0001$) a kukle P 15 ($p = 0,0052$). Mezi dospělci 0hpe a 24hpe je míra exprese snížena ($p = 0,0015$). Množství exprese genu *apoLTP* (B) se v kukle P 8 ($p = 0,0003$) a kukle P 15 ($p = 0,0327$). Gen *mtp* (C) má zvýšenou míru exprese v kukle P 8 ($p = 0,0065$) a v dospělci 0hpe ($p < 0,0001$). Expresse genu *mtp* signifikantně klesá u dospělce starého 24 hpe ($p = 0,0110$). Vodorovné přímkové znázorňují směrodatnou odchylku. Pro výpočet p hodnoty byla použita Two-Way ANOVA (Tuckey's multiple comparisons test).

5 Diskuse

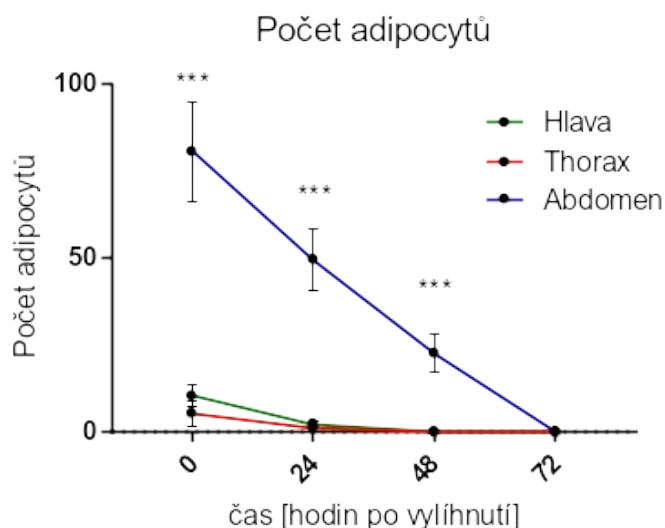
Výsledky této práce popisují morfologické změny larvální tukové tkáně v průběhu metamorfózy a post-metamorfického vývoje drosophily a analýzu exprese genů zapojených v lipidovém a ceramidovém metabolismu. Výše uvedená data charakterizují biologické procesy, které nejsou dostatečně prostudované, proto v diskusi částečně odkazují na práce založené na studiu savčích modelů nebo doposud nepublikovaná data našeho výzkumného týmu.

5.1 Změna velikosti larválních adipocytů

Během pozorování změn v tukovém tělese v průběhu metamorfózy a post-metamorfického vývoje jsme ukázali variabilitu velikosti larválních adipocytů, kdy se jejich velikost liší ve všech analyzovaných obdobích, maxima dosahují v čase 0 hpe a poté se jejich průměr zmenšuje. Tuto variabilitu ve velikosti si lze vysvětlit tím, že obsah adipocytů je závislý na množství a velikosti lipidových kapek, které zaujímají většinu obsahu adipocytů (Butterworth, Bodenstein and King, 1965). Vlivem velkého množství autofagických událostí, které jsou typické pro metamorfující tukové těleso dochází ke zvětšování objemu adipocytů, ve kterých se hromadí vedlejší produkty autofagie, jako jsou například lipofuscinové granule (Kurz, Terman and Brunk, 2007). Domníváme se proto, že velikost larválních adipocytů může být do jisté míry ovlivněna přítomností lipofuscinu.

V průběhu metamorfózy procházejí larvální adipocyty výraznou morfologickou proměnou, které je nutná pro výdej energetických zásob. Nejdříve musí dojít k rozpadu larválního tukového tělesa na jednotlivé adipocyty vlivem narušení bazální membrány (BM) (Jia *et al.*, 2015). Larvální adipocyty se v průběhu metamorfického vývoje zvětšují a stávají se pravděpodobně hypertrofickými. Zároveň adipocyty přizpůsobují svůj tvar měnící se ECM, která je narušena působením ekdyzonu (Bond *et al.*, 2011). ECM se přestává vázat na integriny v membráně adipocytů a tím se v nich aktivuje proces autofagie (Lock and Debnath, 2008).

V pozdějších stádiích metamorfózy se naopak velikost adipocytů rapidně zmenšuje. Pokud porovnání dáme do kontextu s jejich měnícím se počtem (Obr. 15), vidíme (Danielová, 2019), že rychlost jejich ubývání koreluje s jejich klesající velikostí.



Obrázek 15: Počet adipocytů v průběhu post-metamorfoického vývoje. Tento graf podporuje tvrzení o vyčerpání larválních lipidových zásob během prvních dvou až tří dní života dospělé drosophily (Danielová, 2019).

Tato data ukazují na skutečnost, že velké množství lipidových zásob je zcela vyčerpáno během dvou až tří dní post-metamorfoického vývoje, což vyžaduje aktivaci a zapojení mnoha enzymů. Energie získaná z lipidů je využívána pro další klíčové procesy, jako je například maturace pohlavních orgánů, zrání pohlavních buněk nebo formování dospělého tukového tělesa (DiAngelo and Birnbaum, 2009, Wat *et al.*, 2020).

5.2 Změna velikosti a počtu lipofuscinových granulí

Jak již bylo zmíněno - lipofuscinové granule představují pozůstatek po autofagickém procesu, který je považován za nedegradovatelný materiál (Terman and Brunk, 2004). V našich výsledcích ovšem ukazujeme, že během post-metamorfoického vývoje dochází k výraznému snižování množství granulí, které nakonec vymizí úplně. Výskyt lipofuscinu je také typický pro senescentní buňky, u kterých jeho akumulace vyústí v poškození funkce mitochondrií a tím přispívá k produkci ROS (Terman and Brunk, 2004). Zvýšená produkce ROS má za následek zvýšenou intenzitu vzniku lipofuscinu a tím dochází ke zpětnovazební smyčce ve vztahu lipofuscinu a ROS (Ulf, Brunk and Terman, 2002). Nadměrná akumulace lipofuscinu je hojně studovaný příznak rozvoje neurodegenerativních onemocnění (Moreno-García *et al.*, 2018). Pro drosophilu existuje pouze malé množství studií, které by odkrývaly

procesy vzniku a akumulace lipofuscinu (Butterworth, Emerson and Rasch, 1988). Nicméně, o jeho degradaci se toho příliš neví. Naše výsledky ukazují na zásadní snížení počtu lipofuscinových granulí v průběhu post-metamorfického vývoje u drosophily. Tento fakt si lze vysvětlit tím, že buňky se lipofuscinu mohou zbavovat, nebo dochází k přednostnímu odstranění těch buněk, které obsahují větší množství granulí. Zajímavá je skutečnost, že jde o ubývání velkého množství granulí v relativně krátkém čase. Možnou odpověď na degradaci lipofuscinových granulí by mohly poskytnout makrofágy tvořící CLS kolem larválních adipocytů. Makrofágy by mohly lipofuscin přijímat ve formě celých granulí, popřípadě natrávený adipocylem nebo prostřednictvím exocytózy, kdy makrofágy produkují degradabilní enzymy dovnitř CLS (Haka *et al.*, 2016). I přes velké snahy našeho výzkumného týmu žádná z těchto teorií nebyla doposud potvrzena.

Analýza velikosti lipofuscinových granulí ukázala postupné zvětšování, tedy opačný trend než u počtu granulí. Tento výsledek ukazuje na možné fúzování lipofuscinu, které je známé například v endotheliu koronárních tepen lidí (Joris *et al.*, 1998).

5.3 Počet a velikost lipidových kapek

Z výsledků charakterizace počtu lipidových kapek vidíme, že se jejich množství zvyšuje v průběhu metamorfózy a během prvních dvou dnů post-metamorfického vývoje výrazně klesá. To ukazuje na možnou mobilizaci lipidových zásob, které jsou využívány pro ostatní orgány a tkáně, které jsou klíčové v post-metamorfickém vývoji (Aguila *et al.*, 2007). To lze ukázat na výsledcích změny velikosti lipidových kapek, kde vidíme pouze signifikantní pokles u kukly P 8. Tento výsledek ukazuje na snižování velikosti lipidových kapek pravděpodobně za účelem zvětšení své plochy, čímž se stávají přístupnější lipolytickým enzymům (Paar *et al.*, 2012). Adipocyty se pravděpodobně stávají inzulin rezistentními, což podporuje další průběh lipolýzy jinak negativně regulovanou přítomností inzulinu, který je zodpovědný za jejich fosforylaci nebo blokování exprese lipolytických genů (Kitamura *et al.*, 1999; Czech *et al.*, 2013).

Tvrzení o mobilizaci lipidových zásob v průběhu metamorfózy a post-metamorfického vývoje je podpořeno výsledky z analýzy genové exprese genů zapojených v mobilizaci lipidů.

5.4 Exprese genů

Výsledky exprese genů zapojených v mobilizaci lipidových zásob můžeme rozdělit na geny kódující lipolytické enzymy (*hsl*, *bmm*) a geny kódující transportní proteiny (*mtp*, *apoLPP*, *apoLTP*). U *hsl* a *bmm* vidíme zvyšování míry exprese v kukle P 8 a dospělci 0 hpe, což koreluje s předchozími výsledky velikosti lipidových kapek a podporuje tak tvrzení o působení lipáz za účelem mobilizace lipidových zásob. Exprese genů *mtp*, *apoLPP* a *apoLTP* doplňují výsledky o mobilizaci lipidů a ukazují, že larvální tukové zásoby jsou transportovány do metamorfujících tkání a orgánů po celou dobu kuklení. Dalo by se předpokládat, že kromě lipolýzy se na mobilizaci lipidů podílí také lipofagie (Singh and Cuervo, 2012).

Během metamorfózy se ve velkém množství mobilizují také aminokyseliny a cukry (Arrese and Soulages, 2010b). Dalo by se předpokládat, že tato schopnost mobilizace širokého spektra látek by mohla vést i k možnému zpracování lipofuscinových granulí. Velké množství z těchto procesů se odehrává přímo v adipocytech, ale je pravděpodobné, že některé z nich budou pravděpodobně regulovány makrofágy.

Výsledky exprese genů ceramidového a sfingosinového metabolismu ukazují na postupné zvyšování míry exprese v průběhu metamorfózy a výrazné snížení během post-metamorfického vývoje. Přítomnost ceramidu si můžeme vysvětlit jako následek přítomnosti volných lipidů, které unikají během lipolýzy a jsou zodpovědné za aktivaci SMase syntetizující ceramid. Další možné vysvětlení by mohla být přítomnost autofagických procesů membránových organel, kdy se sfingolipidy tvořící membrány začnou hromadit v podobě ceramidu uvnitř buňky. Přítomnost ceramidů má za následek snížení inzulínové senzitivity, čímž přispívá k aktivaci lipolytických enzymů (Chaurasia and Summers, 2015). Exprese genů kódující enzymy zodpovědné za hydrolýzu ceramidu je zvýšená ve stejných časech jako exprese pro enzymy syntézy ceramidu. Jde pravděpodobně o přirozený proces obrany buňky před akumulací ceramidu, který se podílí na snižování její životaschopnosti.

Tento projekt tvoří základní pozorování v nepříliš prostudovaném fyziologickém procesu přeměny tukové tkáně drosophily. Do budoucna by bylo zajímavé zaměřit se na tyto procesy v patogenezi obezity a s obezitou spojenými onemocněními, jako jsou NAFLD, diabetes mellitus typu 2, ateroskleróza a další. Právě v těchto procesech hraje zásadní roli ceramidový a lipidový metabolismus stejně tak jako produkce lipoproteinů. Nепublikované

výsledky našeho výzkumného týmu ukazují, že exprese některých z genů zodpovědných za mobilizaci lipidů a metabolismus ceramidů je silně zvýšená i v makrofázích infiltrující tukové těleso, což naznačuje jejich úlohu v procesu přeměny tukové tkáně. Nicméně tato teorie musí být v budoucnu dostatečně prostudována.

Pro další možné experimenty k porozumění procesů přeměny tukové tkáně by mohly být využity tkáňově specifický Gal4 driveru pro tukovou tkáň založený na promotorové sekvenci genu *larval serum protein 2 (lsp2)*, popřípadě genů unikátních svou expresí pro makrofágy (*crq* a další). Kromě toho by mohla být využita kombinace Gal4 driveru s časově specifickým driverem Gal80 pro gen *fat body (fb)* v tukovém tělese v kombinaci s RNAi pro vypínání funkce genů našeho zájmu. Právě pro vyhodnocení fenotypických změn těchto genetických zásahů by mohla být využita data o změně morfologie tukové tkáně, které jsou ukázána v této práci.

6 Závěr

V praktické části mé práce bylo použito několik metodických přístupů, které posloužily ke zmapování velikosti larválních adipocytů, počtu a velikosti lipofuscinových granulí a lipidových kapek. Pro lepší porozumění procesů zapojených do přeměny tukové tkáně během metamorfózy a post-metamorfického vývoje u *Drosophila melanogaster*, byla změřena relativní míra exprese genů zapojených v lipidovém a ceramidovém metabolismu. Získané výsledky ukazují, že tato práce dala základ dalšímu studiu této problematiky. Teprve v budoucnu se ukáže, zda je *Drosophila melanogaster* vhodný model pro studium přeměny tukové tkáně. Zatím se zdá, že v metamorfující tukové tkáni, která není dostatečně prostudovaná probíhá řada velmi zajímavých procesů, které by mohly být relevantní pro pochopení některých lidských onemocnění.

7 Seznam literary

Acharya, U. and Acharya, J. K. (2005) 'Enzymes of Sphingolipid metabolism in *Drosophila melanogaster*', *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(2), pp. 128–142. doi: 10.1007/s00018-004-4254-1.

Aguila, J. R. *et al.* (2007) 'The role of larval fat cells in adult *Drosophila melanogaster*', *Journal of Experimental Biology*, 210(6), pp. 956–963. doi: 10.1242/jeb.001586.

Alamri, Z. Z. (2018) 'The role of liver in metabolism: an updated review with physiological emphasis', *International Journal of Basic & Clinical Pharmacology*, 7(11), p. 2271. doi: 10.18203/2319-2003.ijbcp20184211.

Alfa, R. W. and Kim, S. K. (2016) 'Using *Drosophila* to discover mechanisms underlying type 2 diabetes', *Disease Models & Mechanisms*, 9(4), pp. 365–376. doi: 10.1242/dmm.023887.

Arrese, E. L., Patel, R. T. and Soulages, J. L. (2006) 'The main triglyceride-lipase from the insect fat body is an active phospholipase A1: identification and characterization', *Journal of Lipid Research*, 47(12), pp. 2656–2667. doi: 10.1194/jlr.M600161-JLR200.

Arrese, E. L. and Soulages, J. L. (2010a) 'Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation', *Annual Review of Entomology*, 55(1), pp. 207–225. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085356.

Arrese, E. L. and Soulages, J. L. (2010b) 'Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation', *Annual Review of Entomology*, 55(1), pp. 207–225. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085356.

Azeez, O. I., Meintjes, R. and Chamunorwa, J. P. (2014) 'Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: the nexus', *Lipids in Health and Disease*, 13(1), p. 71. doi: 10.1186/1476-511X-13-71.

Ballabio, A. and Gieselmann, V. (2009) 'Lysosomal disorders: From storage to cellular damage', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1793(4), pp. 684–696. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.12.001.

Ballinger, M. A. and Andrews, M. T. (2018) 'Nature's fat-burning machine: brown adipose tissue in a hibernating mammal', *Journal of Experimental Biology*. Edited by R. K. Suarez

and H. H. Hoppeler, 221(Suppl_1). doi: 10.1242/jeb.162586.

Bauer, R. *et al.* (2009) 'Schlank, a member of the ceramide synthase family controls growth and body fat in *Drosophila*', *The EMBO Journal*, 28(23), pp. 3706–3716. doi: 10.1038/emboj.2009.305.

Beaulieu, J.-M. (2012) 'A role for Akt and glycogen synthase kinase-3 as integrators of dopamine and serotonin neurotransmission in mental health', *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 37(1), pp. 7–16. doi: 10.1503/jpn.110011.

Benavides, S. H. *et al.* (2002) 'Sequential histochemical studies of neuronal lipofuscin in human cerebral cortex from the first to the ninth decade of life', *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 34(3), pp. 219–231. doi: 10.1016/S0167-4943(01)00223-0.

Bi, J. *et al.* (2012) 'Opposite and redundant roles of the two *Drosophila* perilipins in lipid mobilization', *Journal of Cell Science*, 125(15), pp. 3568–3577. doi: 10.1242/jcs.101329.

De Biase, D. *et al.* (2017) 'Amyloid precursor protein, lipofuscin accumulation and expression of autophagy markers in aged bovine brain', *BMC Veterinary Research*, 13(1), p. 102. doi: 10.1186/s12917-017-1028-1.

Bickel, P. E., Tansey, J. T. and Welte, M. A. (2009) 'PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), pp. 419–440. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.04.002.

Birsoy, K., Festuccia, W. T. and Laplante, M. (2013) 'A comparative perspective on lipid storage in animals', *Journal of Cell Science*, 126(7), pp. 1541–1552. doi: 10.1242/jcs.104992.

Bobryshev, Y. V. *et al.* (2016) 'Macrophages and Their Role in Atherosclerosis: Pathophysiology and Transcriptome Analysis', *BioMed Research International*, 2016, pp. 1–13. doi: 10.1155/2016/9582430.

Bond, N. D. *et al.* (2011) 'BFTZ-F1 and Matrix metalloproteinase 2 are required for fat-body remodeling in *Drosophila*', *Developmental Biology*, 360(2), pp. 286–296. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.09.015.

Brand, A. H. and Perrimon, N. (1993) 'Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.', *Development (Cambridge, England)*, 118(2),

pp. 401–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8223268>.

Brasaemle, D. L. (2007) ‘Thematic review series: Adipocyte Biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis’, *Journal of Lipid Research*, 48(12), pp. 2547–2559. doi: 10.1194/jlr.R700014-JLR200.

Brasaemle, D. L. *et al.* (2009) ‘Perilipin A and the control of triacylglycerol metabolism’, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 326(1–2), pp. 15–21. doi: 10.1007/s11010-008-9998-8.

Brenner, B. *et al.* (1998) ‘Fas/CD95/Apo-I activates the acidic sphingomyelinase via Caspases’, *Cell Death & Differentiation*, 5(1), pp. 29–37. doi: 10.1038/sj.cdd.4400307.

Briegel, H. (1990) ‘Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*’, *Journal of Insect Physiology*, 36(3), pp. 165–172. doi: 10.1016/0022-1910(90)90118-Y.

Brooks, G. T. (1985) ‘Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology’, *Insect Biochemistry*, 15(5), pp. i–xiv. doi: 10.1016/0020-1790(85)90131-3.

Brunk, Ulf T and Terman, A. (2002) ‘Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function’ 12 Guest Editor: Rajindar S. Sohal 2This article is part of a series of reviews on “Oxidative Stress and Aging.” The full list of papers may be found on the homepage of the’, *Free Radical Biology and Medicine*, 33(5), pp. 611–619. doi: 10.1016/S0891-5849(02)00959-0.

Brunk, Ulf T. and Terman, A. (2002) ‘The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging’, *European Journal of Biochemistry*, 269(8), pp. 1996–2002. doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02869.x.

Bruun, J. M. *et al.* (2003) ‘Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans’, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 285(3), pp. E527–E533. doi: 10.1152/ajpendo.00110.2003.

Bultitude, M. F. *et al.* (2011) ‘IMPROVING THE INTERPRETATION OF URETEROSCOPIC BIOPSIES: USE OF BOUIN’S FIXATIVE’, *BJU International*, 108(9), pp. 1373–1375. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10641.x.

Butterworth, F. M., Bodenstein, D. and King, R. C. (1965) ‘Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*. I. An experimental study of larval fat body’, *Journal of Experimental Zoology*,

158(2), pp. 141–153. doi: 10.1002/jez.1401580203.

Butterworth, F. M., Emerson, L. and Rasch, E. M. (1988) ‘Maturation and degeneration of the fat body in the *Drosophila* larva and pupa as revealed by morphometric analysis.’, *Tissue & cell*, 20(2), pp. 255–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3136556>.

Canello, R. *et al.* (2006) ‘Increased Infiltration of Macrophages in Omental Adipose Tissue Is Associated With Marked Hepatic Lesions in Morbid Human Obesity’, *Diabetes*, 55(6), pp. 1554–1561. doi: 10.2337/db06-0133.

Charrière, G. *et al.* (2003) ‘Preadipocyte Conversion to Macrophage’, *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), pp. 9850–9855. doi: 10.1074/jbc.M210811200.

Chaurasia, B. and Summers, S. A. (2015) ‘Ceramide – Lipotoxic Inducers of Metabolic Disorders’, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(10), pp. 538–550. doi: 10.1016/j.tem.2015.07.006.

Chavez, J. A. *et al.* (2003) ‘A Role for Ceramide, but Not Diacylglycerol, in the Antagonism of Insulin Signal Transduction by Saturated Fatty Acids’, *Journal of Biological Chemistry*, 278(12), pp. 10297–10303. doi: 10.1074/jbc.M212307200.

Chazenbalk, G. *et al.* (2011) ‘Novel Pathway of Adipogenesis through Cross-Talk between Adipose Tissue Macrophages, Adipose Stem Cells and Adipocytes: Evidence of Cell Plasticity’, *PLoS ONE*. Edited by S. Orsulic, 6(3), p. e17834. doi: 10.1371/journal.pone.0017834.

Choe, S. S. *et al.* (2016) ‘Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders’, *Frontiers in Endocrinology*, 7. doi: 10.3389/fendo.2016.00030.

Cinti, S. *et al.* (2005) ‘Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans’, *Journal of Lipid Research*, 46(11), pp. 2347–2355. doi: 10.1194/jlr.M500294-JLR200.

Colombani, J. *et al.* (2005) ‘Antagonistic Actions of Ecdysone and Insulins Determine Final Size in *Drosophila*’, *Science*, 310(5748), pp. 667–670. doi: 10.1126/science.1119432.

Cooper, A. D. (1997) ‘Hepatic uptake of chylomicron remnants.’, *Journal of lipid research*, 38(11), pp. 2173–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9392416>.

Czech, M. P. *et al.* (2013) ‘Insulin signalling mechanisms for triacylglycerol storage’,

Diabetologia, 56(5), pp. 949–964. doi: 10.1007/s00125-013-2869-1.

D'Andrea, M. R. *et al.* (2002) 'Lipofuscin and A β 42 exhibit distinct distribution patterns in normal and Alzheimer's disease brains', *Neuroscience Letters*, 323(1), pp. 45–49. doi: 10.1016/S0304-3940(01)02444-2.

D'Avino, P. P. and Thummel, C. S. (2000) 'The Ecdysone Regulatory Pathway Controls Wing Morphogenesis and Integrin Expression during *Drosophila* Metamorphosis', *Developmental Biology*, 220(2), pp. 211–224. doi: 10.1006/dbio.2000.9650.

Dai, J. *et al.* (2017) 'Inter-adipocyte Adhesion and Signaling by Collagen IV Intercellular Concentrations in *Drosophila*', *Current Biology*, 27(18), pp. 2729–2740.e4. doi: 10.1016/j.cub.2017.08.002.

Danielová, A. (2019), Přeměna tukové tkáně a její ovlivnění vysokotučnou dietou v prvních dnech života dospělce *Drosophila melanogaster*

DiAngelo, J. R. and Birnbaum, M. J. (2009) 'Regulation of Fat Cell Mass by Insulin in *Drosophila melanogaster*', *Molecular and Cellular Biology*, 29(24), pp. 6341–6352. doi: 10.1128/MCB.00675-09.

Dobbins, R. L. *et al.* (2001) 'Prolonged Inhibition of Muscle Carnitine Palmitoyltransferase-1 Promotes Intramyocellular Lipid Accumulation and Insulin Resistance in Rats', *Diabetes*, 50(1), pp. 123–130. doi: 10.2337/diabetes.50.1.123.

Double, K. L. *et al.* (2008) 'The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(11), pp. 1669–1682. doi: 10.1007/s00018-008-7581-9.

Engeli, S. *et al.* (2003) 'Association Between Adiponectin and Mediators of Inflammation in Obese Women', *Diabetes*, 52(4), pp. 942–947. doi: 10.2337/diabetes.52.4.942.

Fire, A. *et al.* (1998) 'Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*', *Nature*, 391(6669), pp. 806–811. doi: 10.1038/35888.

Franc, N. C. *et al.* (1996) 'Croquemort, A Novel *Drosophila* Hemocyte/Macrophage Receptor that Recognizes Apoptotic Cells', *Immunity*, 4(5), pp. 431–443. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80410-0.

Gade, G., Hoffmann, K. H. and Spring, J. H. (1997) 'Hormonal regulation in insects: facts,

- gaps, and future directions’, *Physiological Reviews*, 77(4), pp. 963–1032. doi: 10.1152/physrev.1997.77.4.963.
- Gheibi Hayat, S. M. *et al.* (2019) ‘Efferocytosis: molecular mechanisms and pathophysiological perspectives’, *Immunology and Cell Biology*, 97(2), pp. 124–133. doi: 10.1111/imcb.12206.
- Gibbons, G. F. *et al.* (2004) ‘Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein’, *Biochemical Society Transactions*, 32(1), pp. 59–64. doi: 10.1042/bst0320059.
- Ginhoux, F. and Jung, S. (2014) ‘Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis’, *Nature Reviews Immunology*, 14(6), pp. 392–404. doi: 10.1038/nri3671.
- Goberdhan, D. C. I. and Wilson, C. (2003) ‘The functions of insulin signaling: size isn’t everything, even in *Drosophila*’, *Differentiation*, 71(7), pp. 375–397. doi: 10.1046/j.1432-0436.2003.7107001.x.
- GOFMAN, J. W. *et al.* (1950) ‘Blood Lipids and Human Atherosclerosis’, *Circulation*, 2(2), pp. 161–178. doi: 10.1161/01.CIR.2.2.161.
- Goldberg, I. J. *et al.* (1990) ‘Lipoprotein ApoC-II activation of lipoprotein lipase. Modulation by apolipoprotein A-IV.’, *The Journal of biological chemistry*, 265(8), pp. 4266–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2307668>.
- Gomez-Muñoz, A. *et al.* (2016) ‘Control of inflammatory responses by ceramide, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate’, *Progress in Lipid Research*, 61, pp. 51–62. doi: 10.1016/j.plipres.2015.09.002.
- Grant, D. M. (1991) ‘Detoxification Pathways in the Liver’, in *Journal of Inherited Metabolic Disease*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 421–430. doi: 10.1007/978-94-011-9749-6_2.
- Grefhorst, A. *et al.* (2021) ‘The Role of Lipophagy in the Development and Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease’, *Frontiers in Endocrinology*, 11. doi: 10.3389/fendo.2020.601627.
- Grönke, S. *et al.* (2005) ‘Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*’, *Cell Metabolism*, 1(5), pp. 323–330. doi: 10.1016/j.cmet.2005.04.003.
- Guerre-Millo, M. (2002) ‘Adipose tissue hormones’, *Journal of Endocrinological*

Investigation, 25(10), pp. 855–861. doi: 10.1007/BF03344048.

Guertin, D. A. and Sabatini, D. M. (2007) ‘Defining the Role of mTOR in Cancer’, *Cancer Cell*, 12(1), pp. 9–22. doi: 10.1016/j.ccr.2007.05.008.

Haka, A. S. *et al.* (2016) ‘Exocytosis of macrophage lysosomes leads to digestion of apoptotic adipocytes and foam cell formation’, *Journal of Lipid Research*, 57(6), pp. 980–992. doi: 10.1194/jlr.M064089.

Halberg, N. *et al.* (2009) ‘Hypoxia-Inducible Factor 1 α Induces Fibrosis and Insulin Resistance in White Adipose Tissue’, *Molecular and Cellular Biology*, 29(16), pp. 4467–4483. doi: 10.1128/MCB.00192-09.

Han, Y. and Kodadek, T. (2000) ‘Peptides Selected to Bind the Gal80 Repressor Are Potent Transcriptional Activation Domains in Yeast’, *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), pp. 14979–14984. doi: 10.1074/jbc.275.20.14979.

Hannun, Y. A. and Obeid, L. M. (2011) ‘Many Ceramides’, *Journal of Biological Chemistry*, 286(32), pp. 27855–27862. doi: 10.1074/jbc.R111.254359.

Heid, H. *et al.* (2014) ‘On the Formation of Lipid Droplets in Human Adipocytes: The Organization of the Perilipin–Vimentin Cortex’, *PLoS ONE*. Edited by J. Langowski, 9(2), p. e90386. doi: 10.1371/journal.pone.0090386.

Heyens, L. J. M. *et al.* (2021) ‘Liver Fibrosis in Non-alcoholic Fatty Liver Disease: From Liver Biopsy to Non-invasive Biomarkers in Diagnosis and Treatment’, *Frontiers in Medicine*, 8. doi: 10.3389/fmed.2021.615978.

Hill, A. A., Reid Bolus, W. and Hasty, A. H. (2014) ‘A decade of progress in adipose tissue macrophage biology’, *Immunological Reviews*, 262(1), pp. 134–152. doi: 10.1111/imr.12216.

Hindle, S. J. *et al.* (2017) ‘A saposin deficiency model in *Drosophila*: Lysosomal storage, progressive neurodegeneration and sensory physiological decline’, *Neurobiology of Disease*, 98, pp. 77–87. doi: 10.1016/j.nbd.2016.11.012.

Hirosumi, J. *et al.* (2002) ‘A central role for JNK in obesity and insulin resistance’, *Nature*, 420(6913), pp. 333–336. doi: 10.1038/nature01137.

Horton, J. D., Cuthbert, J. A. and Spady, D. K. (1993) ‘Dietary fatty acids regulate hepatic

- low density lipoprotein (LDL) transport by altering LDL receptor protein and mRNA levels.', *Journal of Clinical Investigation*, 92(2), pp. 743–749. doi: 10.1172/JCI116645.
- Hotamisligil, G. S. (2006) 'Inflammation and metabolic disorders', *Nature*, 444(7121), pp. 860–867. doi: 10.1038/nature05485.
- Huang, S. and Czech, M. P. (2007) 'The GLUT4 Glucose Transporter', *Cell Metabolism*, 5(4), pp. 237–252. doi: 10.1016/j.cmet.2007.03.006.
- Ivanova, E. A. *et al.* (2017) 'Small Dense Low-Density Lipoprotein as Biomarker for Atherosclerotic Diseases', *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, pp. 1–10. doi: 10.1155/2017/1273042.
- Jernås, M. *et al.* (2006) 'Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression', *The FASEB Journal*, 20(9), pp. 1540–1542. doi: 10.1096/fj.05-5678fje.
- Jia, Q. *et al.* (2015) 'Mmp1 and Mmp2 cooperatively induce Drosophila fat body cell dissociation with distinct roles', *Scientific Reports*, 4(1), p. 7535. doi: 10.1038/srep07535.
- Jong, M. C., Hofker, M. H. and Havekes, L. M. (1999) 'Role of ApoCs in Lipoprotein Metabolism', *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 19(3), pp. 472–484. doi: 10.1161/01.ATV.19.3.472.
- Joris, I. *et al.* (1998) 'Lipofuscin and Lipid Oxidation in Human Coronary Endothelium', *Cardiovascular Pathology*, 7(2), pp. 75–85. doi: 10.1016/S1054-8807(97)00076-8.
- Jouni, Z. E., Zamora, J. and Wells, M. A. (2002) 'Absorption and tissue distribution of cholesterol in *Manduca sexta*', *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 49(3), pp. 167–175. doi: 10.1002/arch.10017.
- Kambysellis, M. P. (1977) 'Genetic and Hormonal Regulation of Vitellogenesis in *Drosophila*', *American Zoologist*, 17(3), pp. 535–549. doi: 10.1093/icb/17.3.535.
- Karpac, J. *et al.* (2009) 'JNK signaling in insulin-producing cells is required for adaptive responses to stress in *Drosophila*', *Aging Cell*, 8(3), pp. 288–295. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00476.x.
- Karpe, F., Dickmann, J. R. and Frayn, K. N. (2011) 'Fatty Acids, Obesity, and Insulin Resistance: Time for a Reevaluation', *Diabetes*, 60(10), pp. 2441–2449. doi: 10.2337/db11-

0425.

Kim, M. Y. *et al.* (1991) 'Identification of sphingomyelin turnover as an effector mechanism for the action of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon. Specific role in cell differentiation.', *The Journal of biological chemistry*, 266(1), pp. 484–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1845977>.

Kitamura, T. *et al.* (1999) 'Insulin-Induced Phosphorylation and Activation of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase 3B by the Serine-Threonine Kinase Akt', *Molecular and Cellular Biology*, 19(9), pp. 6286–6296. doi: 10.1128/MCB.19.9.6286.

Kitatani, K., Idkowiak-Baldys, J. and Hannun, Y. A. (2008) 'The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling', *Cellular Signalling*, 20(6), pp. 1010–1018. doi: 10.1016/j.cellsig.2007.12.006.

Klok, M. D., Jakobsdottir, S. and Drent, M. L. (2007) 'The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review', *Obesity Reviews*, 8(1), pp. 21–34. doi: 10.1111/j.1467-789X.2006.00270.x.

Kraut, R. (2011) 'Roles of sphingolipids in Drosophila development and disease', *Journal of Neurochemistry*, 116(5), pp. 764–778. doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.07022.x.

Kühnlein, R. P. (2012) 'Lipid droplet-based storage fat metabolism in Drosophila', *Journal of Lipid Research*, 53(8), pp. 1430–1436. doi: 10.1194/jlr.R024299.

Kurz, T., Terman, A. and Brunk, U. T. (2007) 'Autophagy, ageing and apoptosis: The role of oxidative stress and lysosomal iron', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(2), pp. 220–230. doi: 10.1016/j.abb.2007.01.013.

Lafontan, M. and Langin, D. (2009) 'Lipolysis and lipid mobilization in human adipose tissue', *Progress in Lipid Research*, 48(5), pp. 275–297. doi: 10.1016/j.plipres.2009.05.001.

Lan, Y.-L. *et al.* (2019) 'Update on the synergistic effect of HSL and insulin in the treatment of metabolic disorders', *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, 10, p. 204201881987730. doi: 10.1177/2042018819877300.

Lebeau, P. F. *et al.* (2019) 'Diet-induced hepatic steatosis abrogates cell-surface LDLR by inducing de novo PCSK9 expression in mice', *Journal of Biological Chemistry*, 294(23), pp. 9037–9047. doi: 10.1074/jbc.RA119.008094.

- Leren, T. P. (2014) 'Sorting an LDL receptor with bound PCSK9 to intracellular degradation', *Atherosclerosis*, 237(1), pp. 76–81. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.08.038.
- Lim, S. and Jang, H. C. (2008) 'Clinical Implication of Adiponectin', *Korean Diabetes Journal*, 32(2), p. 85. doi: 10.4093/kdj.2008.32.2.85.
- Liu, Y.-C. *et al.* (2014) 'Macrophage Polarization in Inflammatory Diseases', *International Journal of Biological Sciences*, 10(5), pp. 520–529. doi: 10.7150/ijbs.8879.
- Mackenzie, R. and Elliott, B. (2014) 'Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes', *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*, p. 55. doi: 10.2147/DMSO.S48260.
- Mallory, F. B. (1900) 'A CONTRIBUTION TO STAINING METHODS', *Journal of Experimental Medicine*, 5(1), pp. 15–20. doi: 10.1084/jem.5.1.15.
- van Marken Lichtenbelt, W. (2012) 'Brown adipose tissue and the regulation of nonshivering thermogenesis', *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 15(6), pp. 547–552. doi: 10.1097/MCO.0b013e3283599184.
- Marques, P. E. *et al.* (2019) 'Multimerization and Retention of the Scavenger Receptor SR-B1 in the Plasma Membrane', *Developmental Cell*, 50(3), pp. 283-295.e5. doi: 10.1016/j.devcel.2019.05.026.
- Mead, J., Irvine, S. and Ramji, D. (2002) 'Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease', *Journal of Molecular Medicine*, 80(12), pp. 753–769. doi: 10.1007/s00109-002-0384-9.
- Mirth, C. K. and Riddiford, L. M. (2007) 'Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects', *BioEssays*, 29(4), pp. 344–355. doi: 10.1002/bies.20552.
- Mitra, V. and Metcalf, J. (2009) 'Metabolic functions of the liver', *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 10(7), pp. 334–335. doi: 10.1016/j.mpaic.2009.03.011.
- Moreno-García, A. *et al.* (2018) 'An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration', *Frontiers in Neuroscience*, 12. doi: 10.3389/fnins.2018.00464.
- Morgantini, C. *et al.* (2019) 'Liver macrophages regulate systemic metabolism through non-inflammatory factors', *Nature Metabolism*, 1(4), pp. 445–459. doi: 10.1038/s42255-019-0044-9.

- Morris, S. N. S. *et al.* (2012) ‘Development of diet-induced insulin resistance in adult *Drosophila melanogaster*’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1822(8), pp. 1230–1237. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.04.012.
- Mosser, D. M. and Edwards, J. P. (2008) ‘Exploring the full spectrum of macrophage activation’, *Nature Reviews Immunology*, 8(12), pp. 958–969. doi: 10.1038/nri2448.
- Mosser, D. M., Hamidzadeh, K. and Goncalves, R. (2021) ‘Macrophages and the maintenance of homeostasis’, *Cellular & Molecular Immunology*, 18(3), pp. 579–587. doi: 10.1038/s41423-020-00541-3.
- Muir, L. A. *et al.* (2016) ‘Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity’, *Obesity*, 24(3), pp. 597–605. doi: 10.1002/oby.21377.
- Musselman, L. P. and Kühnlein, R. P. (2018) ‘*Drosophila* as a model to study obesity and metabolic disease’, *Journal of Experimental Biology*. Edited by R. K. Suarez and H. H. Hoppeler, 221(Suppl_1). doi: 10.1242/jeb.163881.
- Nelliot, A., Bond, N. and Hoshizaki, D. K. (2006) ‘Fat-body remodeling in *Drosophila melanogaster*’, *genesis*, 44(8), pp. 396–400. doi: 10.1002/dvg.20229.
- Nguyen, P. *et al.* (2008) ‘Liver lipid metabolism’, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92(3), pp. 272–283. doi: 10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x.
- Niba, E. T. E. *et al.* (2013) ‘Crosstalk between PI3 Kinase/PDK1/Akt/Rac1 and Ras/Raf/MEK/ERK Pathways Downstream PDGF Receptor’, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 31(6), pp. 905–913. doi: 10.1159/000350108.
- O’Brien, J. S. and Kishimoto, Y. (1991) ‘Saposin proteins: structure, function, and role in human lysosomal storage disorders’, *The FASEB Journal*, 5(3), pp. 301–308. doi: 10.1096/fasebj.5.3.2001789.
- Oi, K. *et al.* (1999) ‘Role of hepatic lipase in intermediate-density lipoprotein and small, dense low-density lipoprotein formation in hemodialysis patients’, *Kidney International*, 56, pp. S227–S228. doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.07159.x.
- Okamoto, N. *et al.* (2013) ‘A secreted decoy of InR antagonizes insulin/IGF signaling to restrict body growth in *Drosophila*’, *Genes & Development*, 27(1), pp. 87–97. doi: 10.1101/gad.204479.112.

- Olofsson, S.-O. *et al.* (2009) ‘Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids’, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), pp. 448–458. doi: 10.1016/j.bbalip.2008.08.001.
- Paar, M. *et al.* (2012) ‘Remodeling of Lipid Droplets during Lipolysis and Growth in Adipocytes’, *Journal of Biological Chemistry*, 287(14), pp. 11164–11173. doi: 10.1074/jbc.M111.316794.
- Pagadala, M. *et al.* (2012) ‘Role of ceramides in nonalcoholic fatty liver disease’, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(8), pp. 365–371. doi: 10.1016/j.tem.2012.04.005.
- Palanker Musselman, L. *et al.* (2011) ‘A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*’, *Disease Models & Mechanisms*, 4(6), pp. 842–849. doi: 10.1242/dmm.007948.
- Palm, W. *et al.* (2012) ‘Lipoproteins in *Drosophila melanogaster*—Assembly, Function, and Influence on Tissue Lipid Composition’, *PLoS Genetics*. Edited by R. P. Kühnlein, 8(7), p. e1002828. doi: 10.1371/journal.pgen.1002828.
- Di Paola, M., Cocco, T. and Lorusso, M. (2000) ‘Ceramide Interaction with the Respiratory Chain of Heart Mitochondria’, *Biochemistry*, 39(22), pp. 6660–6668. doi: 10.1021/bi9924415.
- Park, A. (2014) ‘Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells’, *World Journal of Stem Cells*, 6(1), p. 33. doi: 10.4252/wjsc.v6.i1.33.
- Park, Y. M. (2014) ‘CD36, a scavenger receptor implicated in atherosclerosis’, *Experimental & Molecular Medicine*, 46(6), pp. e99–e99. doi: 10.1038/emm.2014.38.
- Podlahová, Š. (2019), Vliv adipokinetického hormonu na působení jedu z vosičky, *Habrobracon hebetor*, ve svalové tkáni octomilky, *Drosophila melanogaster*
- Polyzos, S. A., Perakakis, N. and Mantzoros, C. S. (2019) ‘Fatty liver in lipodystrophy: A review with a focus on therapeutic perspectives of adiponectin and/or leptin replacement’, *Metabolism*, 96, pp. 66–82. doi: 10.1016/j.metabol.2019.05.001.
- Prüßing, K., Voigt, A. and Schulz, J. B. (2013) ‘*Drosophila melanogaster* as a model organism for Alzheimer’s disease’, *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), p. 35. doi: 10.1186/1750-1326-8-35.

- Rahman, M. S. *et al.* (2021) 'Role of Insulin in Health and Disease: An Update', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), p. 6403. doi: 10.3390/ijms22126403.
- Rajan, A. and Perrimon, N. (2012) 'Drosophila Cytokine Unpaired 2 Regulates Physiological Homeostasis by Remotely Controlling Insulin Secretion', *Cell*, 151(1), pp. 123–137. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.019.
- Ratheesh, A., Belyaeva, V. and Siekhaus, D. E. (2015) 'Drosophila immune cell migration and adhesion during embryonic development and larval immune responses', *Current Opinion in Cell Biology*, 36, pp. 71–79. doi: 10.1016/j.ceb.2015.07.003.
- Ravikumar, B. *et al.* (2010) 'Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology', *Physiological Reviews*, 90(4), pp. 1383–1435. doi: 10.1152/physrev.00030.2009.
- Regan, J. C. *et al.* (2013) 'Steroid Hormone Signaling Is Essential to Regulate Innate Immune Cells and Fight Bacterial Infection in Drosophila', *PLoS Pathogens*. Edited by D. S. Schneider, 9(10), p. e1003720. doi: 10.1371/journal.ppat.1003720.
- Reiter, L. T. *et al.* (2001) 'A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In Drosophila melanogaster', *Genome Research*, 11(6), pp. 1114–1125. doi: 10.1101/gr.169101.
- Riboni, L. *et al.* (1998) 'Metabolic Fate of Exogenous Sphingosine in Neuroblastoma Neuro2A Cells: Dose-dependence and Biological Effectsa', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 845(1 SPHINGOLIPIDS), pp. 46–56. doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09661.x.
- Ricoult, S. J. H. and Manning, B. D. (2013) 'The multifaceted role of mTORC1 in the control of lipid metabolism', *EMBO reports*, 14(3), pp. 242–251. doi: 10.1038/embor.2013.5.
- Del Roso, A. *et al.* (1991) 'Transmural differences of lipofuscin pigment accumulation in the left ventricle of rat heart during growth and aging.', *Aging (Milan, Italy)*, 3(1), pp. 19–23. doi: 10.1007/BF03323968.
- Roszczyc-Owsiejczuk, K. and Zabielski, P. (2021) 'Sphingolipids as a Culprit of Mitochondrial Dysfunction in Insulin Resistance and Type 2 Diabetes', *Frontiers in Endocrinology*, 12. doi: 10.3389/fendo.2021.635175.

- Rotondo, F. *et al.* (2017) 'Glycerol is synthesized and secreted by adipocytes to dispose of excess glucose, via glycerogenesis and increased acyl-glycerol turnover', *Scientific Reports*, 7(1), p. 8983. doi: 10.1038/s41598-017-09450-4.
- Saely, C. H., Geiger, K. and Drexel, H. (2012) 'Brown versus White Adipose Tissue: A Mini-Review', *Gerontology*, 58(1), pp. 15–23. doi: 10.1159/000321319.
- Sanchez-Gurmaches, J., Hung, C.-M. and Guertin, D. A. (2016) 'Emerging Complexities in Adipocyte Origins and Identity', *Trends in Cell Biology*, 26(5), pp. 313–326. doi: 10.1016/j.tcb.2016.01.004.
- Scheja, L. and Heeren, J. (2019) 'The endocrine function of adipose tissues in health and cardiometabolic disease', *Nature Reviews Endocrinology*, 15(9), pp. 507–524. doi: 10.1038/s41574-019-0230-6.
- Schipper, H. S. *et al.* (2012) 'Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism', *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(8), pp. 407–415. doi: 10.1016/j.tem.2012.05.011.
- Schmitz, G. and Müller, G. (1991) 'Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids.', *Journal of Lipid Research*, 32(10), pp. 1539–1570. doi: 10.1016/S0022-2275(20)41642-6.
- Schulze, H. and Sandhoff, K. (2011) 'Lysosomal Lipid Storage Diseases', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(6), pp. a004804–a004804. doi: 10.1101/cshperspect.a004804.
- Semaniuk, U. *et al.* (2021) 'Drosophila insulin-like peptides: from expression to functions – a review', *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 169(2), pp. 195–208. doi: 10.1111/eea.12981.
- Shelness, G. S. and Sellers, J. A. (2001) 'Very-low-density lipoprotein assembly and secretion', *Current Opinion in Lipidology*, 12(2), pp. 151–157. doi: 10.1097/00041433-200104000-00008.
- Shingleton, A. W. (2005) 'Body-Size Regulation: Combining Genetics and Physiology', *Current Biology*, 15(20), pp. R825–R827. doi: 10.1016/j.cub.2005.10.006.
- Siddique, M. M. *et al.* (2015) 'Dihydroceramides: From Bit Players to Lead Actors', *Journal of Biological Chemistry*, 290(25), pp. 15371–15379. doi: 10.1074/jbc.R115.653204.

- Singh, R. and Cuervo, A. M. (2012) 'Lipophagy: Connecting Autophagy and Lipid Metabolism', *International Journal of Cell Biology*, 2012, pp. 1–12. doi: 10.1155/2012/282041.
- Slawik, M. and Vidal-Puig, A. J. (2006) 'Lipotoxicity, overnutrition and energy metabolism in aging', *Ageing Research Reviews*, 5(2), pp. 144–164. doi: 10.1016/j.arr.2006.03.004.
- Soeters, M. R. *et al.* (2012) 'Adaptive reciprocity of lipid and glucose metabolism in human short-term starvation', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 303(12), pp. E1397–E1407. doi: 10.1152/ajpendo.00397.2012.
- Spector, A. A. (1984) 'Plasma lipid transport.', *Clinical physiology and biochemistry*, 2(2–3), pp. 123–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6386279>.
- Summers, S. (2006) 'Ceramide in insulin resistance and lipotoxicity', *Progress in Lipid Research*, 45(1), pp. 42–72. doi: 10.1016/j.plipres.2005.11.002.
- Suster, M. L. *et al.* (2004) 'Refining GAL4-driven transgene expression in *Drosophila* with a GAL80 enhancer-trap', *genesis*, 39(4), pp. 240–245. doi: 10.1002/gene.20051.
- Swift, L. L. *et al.* (2003) 'Subcellular localization of microsomal triglyceride transfer protein', *Journal of Lipid Research*, 44(10), pp. 1841–1849. doi: 10.1194/jlr.M300276-JLR200.
- Tanoli, T. *et al.* (2004) 'Fatty liver in familial hypobetalipoproteinemia', *Journal of Lipid Research*, 45(5), pp. 941–947. doi: 10.1194/jlr.M300508-JLR200.
- Tapadia, M. G. and Verma, P. (2012) 'Immune Response and Anti-Microbial Peptides Expression in Malpighian Tubules of *Drosophila melanogaster* Is under Developmental Regulation', *PLoS ONE*. Edited by M. Kango-Singh, 7(7), p. e40714. doi: 10.1371/journal.pone.0040714.
- Terman, A. and Brunk, U. T. (1998) 'Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age.', *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 106(2), pp. 265–76. doi: 10.1111/j.1699-0463.1998.tb01346.x.
- Terman, A. and Brunk, U. T. (2004) 'Lipofuscin', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(8), pp. 1400–1404. doi: 10.1016/j.biocel.2003.08.009.
- Thummel, C. S. (1996) 'Flies on steroids — *Drosophila* metamorphosis and the mechanisms

- of steroid hormone action', *Trends in Genetics*, 12(8), pp. 306–310. doi: 10.1016/0168-9525(96)10032-9.
- Tracy, K. and Baehrecke, E. H. (2013) 'The Role of Autophagy in *Drosophila* Metamorphosis', in, pp. 101–125. doi: 10.1016/B978-0-12-385979-2.00004-6.
- Trayhurn, P. and Beattie, J. H. (2001) 'Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ', *Proceedings of the Nutrition Society*, 60(3), pp. 329–339. doi: 10.1079/PNS200194.
- Turpin-Nolan, S. M. and Brüning, J. C. (2020) 'The role of ceramides in metabolic disorders: when size and localization matters', *Nature Reviews Endocrinology*, 16(4), pp. 224–233. doi: 10.1038/s41574-020-0320-5.
- Valenza, A. *et al.* (2018) 'Anthocyanins Function as Anti-Inflammatory Agents in a *Drosophila* Model for Adipose Tissue Macrophage Infiltration', *BioMed Research International*, 2018, pp. 1–9. doi: 10.1155/2018/6413172.
- Villarroya, F., Iglesias, R. and Giralt, M. (2007) 'PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression', *PPAR Research*, 2007, pp. 1–12. doi: 10.1155/2007/74364.
- Vilmos, P. (1998) 'Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system', *Immunology Letters*, 62(2), pp. 59–66. doi: 10.1016/S0165-2478(98)00023-6.
- Vural, A., Shi, C.-S. and Kehrl, J. H. (2015) 'Toll-Like Receptors Serve as Activators for Autophagy in Macrophages Helping to Facilitate Innate Immunity', in *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging*. Elsevier, pp. 179–189. doi: 10.1016/B978-0-12-801032-7.00011-3.
- Wang, G. and Bieberich, E. (2018) 'Sphingolipids in neurodegeneration (with focus on ceramide and S1P)', *Advances in Biological Regulation*, 70, pp. 51–64. doi: 10.1016/j.jbior.2018.09.013.
- Wang, S. *et al.* (2010) '20-hydroxyecdysone Reduces Insect Food Consumption Resulting in Fat Body Lipolysis During Molting and Pupation', *Journal of Molecular Cell Biology*, 2(3), pp. 128–138. doi: 10.1093/jmcb/mjq006.
- Ward, C. *et al.* (2016) 'Autophagy, lipophagy and lysosomal lipid storage disorders', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(4), pp. 269–284. doi: 10.1016/j.bbalip.2016.01.006.

- Wat, L. W. *et al.* (2020) ‘A role for triglyceride lipase brummer in the regulation of sex differences in *Drosophila* fat storage and breakdown’, *PLoS Biology*. Edited by B. A. Hassan, 18(1), p. e3000595. doi: 10.1371/journal.pbio.3000595.
- Wetterau, J. R. *et al.* (1992) ‘Absence of Microsomal Triglyceride Transfer Protein in Individuals with Abetalipoproteinemia’, *Science*, 258(5084), pp. 999–1001. doi: 10.1126/science.1439810.
- Wilcox, G. (2005) ‘Insulin and insulin resistance.’, *The Clinical biochemist. Reviews*, 26(2), pp. 19–39. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16278749>.
- Willebrords, J. *et al.* (2015) ‘Strategies, models and biomarkers in experimental non-alcoholic fatty liver disease research’, *Progress in Lipid Research*, 59, pp. 106–125. doi: 10.1016/j.plipres.2015.05.002.
- Williams, A. S., Kang, L. and Wasserman, D. H. (2015) ‘The extracellular matrix and insulin resistance’, *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 26(7), pp. 357–366. doi: 10.1016/j.tem.2015.05.006.
- Woodcock, K. J. *et al.* (2015) ‘Macrophage-Derived upd3 Cytokine Causes Impaired Glucose Homeostasis and Reduced Lifespan in *Drosophila* Fed a Lipid-Rich Diet’, *Immunity*, 42(1), pp. 133–144. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.023.
- Wu, J. *et al.* (2012) ‘Beige Adipocytes Are a Distinct Type of Thermogenic Fat Cell in Mouse and Human’, *Cell*, 150(2), pp. 366–376. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.016.
- Wu, Z. *et al.* (1999) ‘Cross-Regulation of C/EBP α and PPAR γ Controls the Transcriptional Pathway of Adipogenesis and Insulin Sensitivity’, *Molecular Cell*, 3(2), pp. 151–158. doi: 10.1016/S1097-2765(00)80306-8.
- Wynn, T. A. and Vannella, K. M. (2016) ‘Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis’, *Immunity*, 44(3), pp. 450–462. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.015.
- Yang, Q. *et al.* (2010) ‘Role of *Drosophila* alkaline ceramidase (Dacer) in *Drosophila* development and longevity’, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(9), pp. 1477–1490. doi: 10.1007/s00018-010-0260-7.
- Ye, J. *et al.* (2007) ‘Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob / ob and dietary obese mice’, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(4), pp. E1118–E1128. doi:

10.1152/ajpendo.00435.2007.

Yu, X.-H. *et al.* (2013) 'Foam cells in atherosclerosis', *Clinica Chimica Acta*, 424, pp. 245–252. doi: 10.1016/j.cca.2013.06.006.

Zeng, G. *et al.* (2000) 'Roles for Insulin Receptor, PI3-Kinase, and Akt in Insulin-Signaling Pathways Related to Production of Nitric Oxide in Human Vascular Endothelial Cells', *Circulation*, 101(13), pp. 1539–1545. doi: 10.1161/01.CIR.101.13.1539.

Zhao, Y., Van Berkel, T. J. and Van Eck, M. (2010) 'Relative roles of various efflux pathways in net cholesterol efflux from macrophage foam cells in atherosclerotic lesions', *Current Opinion in Lipidology*, 21(5), pp. 441–453. doi: 10.1097/MOL.0b013e32833dedaa.

Zheng, H., Yang, X. and Xi, Y. (2016) 'Fat body remodeling and homeostasis control in *Drosophila*', *Life Sciences*, 167, pp. 22–31. doi: 10.1016/j.lfs.2016.10.019.

ZHOU, L. *et al.* (2015) 'High-density lipoprotein synthesis and metabolism (Review)', *Molecular Medicine Reports*, 12(3), pp. 4015–4021. doi: 10.3892/mmr.2015.3930.

Zoico, E. *et al.* (2019) 'Brown and Beige Adipose Tissue and Aging', *Frontiers in Endocrinology*, 10. doi: 10.3389/fendo.2019.00368.