

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

2017

Bc. Helena Šokčevičová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Role genu *Impl2* v regulaci imunitní odpovědi na
bakteriální infekci u *Drosophila melanogaster***

Diplomová práce

Bc. Helena Šokčevičová

Školitel: Mgr. Adam Bajgar, Ph.D.

České Budějovice 2017

Šokčevićová, H., 2017: Role genu *Impl2* v regulaci imunitní odpovědi na bakteriální infekci u *Drosophila melanogaster* [The role of *Impl2* gene in the regulation of immune response to bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. MSc. Thesis, in Czech] – 62 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Hlavním cílem této diplomové práce je posoudit roli genu *Impl2* během regulace imunitní odpovědi na bakteriální infekci u *Drosophila melanogaster*. V teoretické části poskytuje souhrn poznatků o imunitě drozofily spolu s nastíněním dosavadních znalostí o genu *Impl2*. V praktické části diplomová práce zkoumá úlohu genu *Impl2* při bakteriální infekci. Charakterizuje místo produkce genu *Impl2*, změny hladinách jeho exprese během bakteriální infekce a ověřuje důležitost tohoto genu pro správnou imunitní odpověď. Dále tato diplomová práce zkoumá metabolické změny doprovázející imunitní aktivaci ve spojitosti s genem *Impl2*. V neposlední řadě tato práce posuzuje vliv genu *Impl2* na mobilizaci energie pro probuzení se z chladem indukovaného kómatu.

Annotation

The main aim of this thesis is to investigate the role of *Impl2* gene in the regulation of immune response to bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. The theoretical part provides a conceptual background concerning immunity in drosophila and also it summarizes what is known about the *Impl2* gene. In the practical part, the function of *Impl2* gene during infection is examined, starting with the location of its production during immune response, the changes of *Impl2* gene amount during infection and its essentiality for a proper immune response. Furthermore, it examines the metabolic changes underlying an immune activation in connection to *Impl2* gene. Last but not least, it tests how *Impl2* gene is connected with the mobilization of energy during Chill Coma Recovery assay.

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

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

V Českých Budějovicích dne 13.12.2017

.....

Bc. Helena Šokčevičová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Mgr. Adamu Bajgarovi, Ph.D. za skvělé vedení, ochotu při předávání poznatků a pomoc při sepsání této diplomové práce. Rovněž bych ráda poděkovala doc. Mgr. Tomáši Doležalovi, Ph.D. za možnost vypracovat svou práci v jeho laboratoři. V neposlední řadě patří můj dík RNDr. Martině Slapničkové za pozitivní energii a ochotu při předvádění experimentů, jakož i ostatním členům laboratoře za jejich cenné připomínky a rady.

Velký dík patří i mé rodině a mému příteli, bez jejichž podpory, ochoty a zájmu by tato práce nemohla vzniknout.

Seznam použitých zkratek

AMPs = antimikrobiální peptidy

BCA = kyselina bicinchoninová

CCR = chill-coma recovery

CFU = colony forming units

Dilp2 = drosophila insulin-like peptid 2

FACS = fluorescence-activated cell sorting

Gal4 = kódující sekvence pro galaktózou-indukované geny

Gal80^{TS} = teplotně senzitivní Gal80 inhibiční protein

GFP = green fluorescent protein (zelený fluorescenční protein)

Hml = hemolectin (protein produkovaný hemocyty)

IGFBP7 = insulin-like growth factor-binding protein 7

Imd = immune deficiency

Impl2 = imaginal morphogenesis protein-late 2

PAMPS = pathogen-associated molecular pattern

PBS = fosfátový pufr

PCR = polymerázová řetězová reakce

PGRP = peptidoglycan recognition proteins (peptidoglykanové rozpoznávací proteiny)

ROS = reactive oxygen species (reaktivní formy kyslíku)

RNAi = RNA interference

Rp49 = ribozomální protein 49

UAS = upstream aktivační sekvence

TSB = tryptic soy broth

Seznam použitých obrázků a grafů

Obrázek 1: Schematické znázornění principu Gal4-UAS systému.....	12
Obrázek 2: Schematické znázornění funkce Gal80 ^{TS}	13
Obrázek 3: Vizualizace místa produkce genu <i>Impl2</i> v těle dospělé drozofily během bakteriální infekce.....	31
Tabulka 1: Recept na standardní dietu.....	23
Tabulka 2: Recept na experimentální dietu.....	23
Tabulka 3: Recept na přípravu TSB agaru.....	24
Graf 1: Počet <i>Impl2</i> pozitivních hemocytů v neinfikované drozofile a v drozofile infikované streptokokem.....	32
Graf 2: Hladina exprese genu <i>Impl2</i> v celých drozofilách infikovaných streptokokem v porovnání s neinfikovanými kontrolními jedinci.....	34
Graf 3: Hladina exprese genu <i>Impl2</i> specificky v hemocytech drozofil infikovaných streptokokem v porovnání s neinfikovanými kontrolními jedinci.....	35
Graf 4: Hladina exprese genu <i>Impl2</i> v kontrolních liniích a v experimentálních liniích s utlumením exprese genu <i>Impl2</i>	36
Graf 5: Křivka přežití <i>Impl2</i> RNAi drozofil po infekci streptokokovou infekcí v porovnání s infikovanými kontrolními jedinci.....	37
Graf 6: Rychlost růstu bakteriálních kolonií v <i>Impl2</i> RNAi drozofilách infikovaných streptokokem v porovnání s kontrolami.....	38
Graf 7: Vývoj koncentrace volně cirkulující glukózy v čase 0 – 48 hodin po streptokokové infekci.....	40
Graf 8: Vývoj koncentrace glykogenu v čase 0 – 48 hodin po streptokokové infekci.....	41
Graf 9: Časy probouzení drozofil z chladem indukovaného kómatu.....	43

Obsah

1. ÚVOD	1
1.1 <i>Drosophila melanogaster</i> jako modelový organismus ke studiu imunity	2
1.2 Imunitní systém u <i>Drosophila melanogaster</i>	3
1.2.1 Buněčná imunita.....	3
1.2.2 Humorální imunita.....	4
1.2.3 Průběh bakteriální infekce u <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.2.4 Metabolické změny indukované během infekce.....	7
1.3 Sobecký imunitní systém	9
1.3.1 Teoretické předpoklady.....	9
1.3.2 Extracelulární adenosin jako signální molekula pro systemické metabolické změny.....	9
1.4 Gen <i>Impl2</i> u <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.4.1 Genetické nástroje umožňující zkoumání genu <i>Impl2</i>	11
1.4.1.1 Gal4-UAS systém.....	11
1.4.1.2 Gal80 inhibiční protein.....	12
1.4.1.3 RNA interference.....	13
1.4.2 Místa produkce genu <i>Impl2</i> v <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.4.2.1 Gen <i>Impl2</i> v tukovém tělese.....	14
1.4.2.2 Gen <i>Impl2</i> ve svalové tkáni.....	15
1.4.2.3 Gen <i>Impl2</i> v imaginálních discích.....	15
1.4.2.4 Gen <i>Impl2</i> ve střevě.....	16
1.4.2.5 Produkce genu <i>Impl2</i> v imunitních buňkách.....	17

1.4.3 Zvýšení hladiny genu <i>Impl2</i> během infekce.....	17
1.4.4 Důležitost genu <i>Impl2</i> pro boj organismu s patogenem.....	17
1.4.5 Vliv genu <i>Impl2</i> na systemické metabolické změny během infekce.....	18
<u>2. CÍLE PRÁCE</u>	20
<u>3. MATERIÁLY A METODY</u>	21
3.1 Příprava konkrétních RNAi linií	21
3.2 Chov a manipulace	23
3.3 Infekce	24
3.3.1 Manipulace s jedinci před infekcí.....	24
3.3.2 Proces infikace.....	25
3.3.3 Časová osa experimentu.....	25
3.4 Vyhodnocování přežití infikovaných jedinců	26
3.5 Colony forming units (CFU)	26
3.6 Chill-coma recovery (CCR)	27
3.7 Měření metabolitů	27
3.8 Měření genové exprese	28
3.9 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)	29
3.10 Konfokální mikroskop	29
3.11 Grafické zpracování obrázků	29
3.12 Počítání buněk	30
3.13 GraphPad	30

<u>4. VÝSLEDKY</u>	31
4.1 Produkce genu <i>Impl2</i> v imunitních buňkách.....	31
4.2 Zvýšení hladiny genu <i>Impl2</i> během bakteriální infekce.....	34
4.3 Důležitost genu <i>Impl2</i> pro boj s patogenem.....	37
4.4 Vliv genu <i>Impl2</i> na systemické metabolické změny během infekce.....	40
4.5 Role genu <i>Impl2</i> během probouzení se z chladem indukovaného kómatu (CCR).....	43
<u>5. DISKUZE</u>	45
5.1 Produkce genu <i>Impl2</i> v imunitních buňkách.....	46
5.2 Zvýšení hladiny genu <i>Impl2</i> během bakteriální infekce.....	48
5.3 Důležitost genu <i>Impl2</i> pro boj s patogenem.....	50
5.4 Vliv genu <i>Impl2</i> na systemické metabolické změny během infekce.....	52
5.5 Role genu <i>Impl2</i> během probouzení se z chladem indukovaného kómatu (CCR).....	53
<u>6. ZÁVĚR</u>	55
<u>7. LITERATURA</u>	56

1. ÚVOD

Drosophila melanogaster je díky své podobnosti k savčím imunitním systémům skvělým modelem pro studium vrozené imunitní odpovědi. Aktivace imunitního systému je velice energeticky náročná, a proto se veškerá energie, která je v běžné situaci rozdělována mezi růst, vývoj a reprodukci, během infekce přeměruje pro potřeby imunitního systému. Zabránění spotřeby této energie je podmíněno extracelulárním signálem produkovaným imunitními buňkami během jejich aktivace. Na základě metabolických projevů, které způsobuje během hladovění, poškození mitochondrií a rakoviny, byl jako kandidát na tento extracelulární signál zvolen gen *Impl2*.

Protože o genu *Impl2* se zatím neví mnoho a ještě nebyl zkoumán v kontextu bakteriální infekce, je třeba prozkoumat, kde (a zda vůbec) se produkuje během infekce, jaká je jeho role v boji s touto infekcí, jaký vliv má omezení jeho produkce na rezistenci organismu vůči infekci, a především zda jeho účinky během bakteriální infekce opravdu řídí metabolické přesměrování energie směrem k imunitním buňkám. Tato práce si klade za cíl přinést odpovědi na tyto otázky, a zároveň nabídnout podněty pro další zkoumání genu *Impl2* v kontextu systemického metabolismu drozofily.

1.1 *Drosophila melanogaster* jako modelový organismus pro studium imunity

Drosophila melanogaster je jako modelový organismus využívána již více než sto let. Svému proslavení a univerzálnímu použití ke studiu genetiky vděčí především Thomasi Huntovi Morganovi, který jako první zmapoval chromozomy drozofily, ukázal, že dědičné znaky jsou na chromozomy vázané a děděné s jejich segregací, či objevil *white* mutaci používanou jako základní kontrolní linie pro genetické experimenty (Shine and Wrobel, 1976).

Hlavními výhodami využívání drozofily je především homologie mnoha drozofilích orgánových systémů k savcům, evoluční konzervovanost signálních drah a transkripčních regulátorů řídících fyziologické procesy jako jsou vývoj, metabolismus a imunita (Buchon, Silverman and Cherry, 2014). V neposlední řadě je výhodou drozofily také krátký životní cyklus a vysoká efektivita reprodukce, či krátká generační doba. Genom drozofily, sestávající se ze čtyř párů chromozomů, byl v roce 2000 plně osekvenován a zaznamenán do FlyBase, čímž se u tohoto modelového organismu mohlo rozvinout velké množství nejúčinnějších genetických nástrojů, které mohou pomoci objasnit fyziologické procesy na pozadí pozorovaných jevů v kontrolních i experimentálních podmínkách (Adams et al., 2000; Neyen et al. 2014).

Použití širokého spektra dominantních markerů, díky kterým můžeme sledovat kombinace chromozomů děděné ve filiálních generacích, balancerové chromozomy, sofistikované genetické nástroje jako systém Gal4-UAS, RNAi, p-elementové inserce či snadná transgeneze dělají z drozofily ideální modelový organismus mimo jiné ke studiu imunitní odpovědi.

V této práci jsme se rozhodli studovat vliv bakteriální infekce na hemocytově specifickou produkci genu *Impl2*, tedy genu, který byl již popsán pro svůj vliv na insulinovou signalizaci a efekt na systemický metabolismus (Andersen et al., 2000). Právě pro tento účel je *Drosophila melanogaster* ideálním modelovým organismem. Průběh infekce u *D. melanogaster* je, stejně jako metabolické změny indukované během infekce, velmi dobře charakterizován. Kombinace těchto faktorů, detailněji popsanych níže, nám dává silný experimentální systém k zodpovězení otázek, které jsou nepochybně v centru zájmu jak experimentální biologie, tak i moderní medicíny.

1.2 Imunitní systém u *Drosophila melanogaster*

Imunitní systém drozofily můžeme rozdělit na dvě navzájem propojené a synchronizované hlavní větve. První větev představují imunitní buňky, které se účastní boje s infekcí a zároveň opravení poškozené tkáně. Druhou větev tvoří rozpustné signální látky a efektorové molekuly šířící se v extracelulárním prostoru a zajišťující synchronizaci dějů charakteristických pro imunitní odpověď, jakož i snazší likvidaci extracelulárních patogenů. Ačkoli je toto rozdělení do dvou hlavních větví do jisté míry umělé a obě větve spolu souvisí, této práci poslouží především k přehlednějšímu popisu imunitního systému.

1.2.1 Buněčná imunita

Buněčná imunitní odpověď u *Drosophila melanogaster* je realizována pomocí změny stavů a chování krevních buněk zvaných hemocyty. Primární produkce prohemocytů, ze kterých se následně vyvíjejí jednotlivé subpopulace hemocytů, probíhá v lymfatické žláze během larválního stádia jedince (Crozatier, 2007). Kromě lymfatické žlázy mohou hemocyty dále vznikat v takzvaných hematopoetických kapsách, které jsou konzervovaným hematopoetickým orgánem během larválního vývoje (Makhijani, 2011). Subpopulace hemocytů nevznikají vždy *de novo*, ale jednotlivé typy se mohou transdiferencovat mezi sebou, což bylo experimentálně ověřeno na příkladu infekce parazitickou vosou rodu *Leptopilina* (Anderl et al., 2016).

Tvorba hemocytů je obecně typická pro larvální stadium jedince. Ačkoliv se někteří autoři (př. Gosh et al., 2015) pokusili experimentálně prokázat tvorbu hemocytů u dospělých drozofil, kvůli obtížné opakovatelnosti experimentu se většina vědců přiklání k tomu, že hemocyty vznikají pouze v larválním stadiu a dospělec si tudíž celý život musí vystačit pouze s hemocyty, které se vytvořily během larválního vývoje.

Po diferenciaci hemocyty mohou buď volně cirkulovat v hemolymfě, nebo přilnout ve formě klastrů k buněčným stěnám či orgánům (Lanot et al., 2001). Hemocyty se dále diferencují ve tři typy buněk, konkrétně plazmatocyty, lamelocyty a krystalové buňky. Základní úlohou nejpočetnějších plazmatocytů je fagocytóza, kdy dochází k pohlcení bakterií či odumřelých tkání. Lamelocyty se účastní imunitní reakce pouze při setkání s parazitem, kdy enkapsulují a melanizují cizorodý objekt. Nejméně početné krystalové buňky produkují enzymy uplatňující se rovněž při procesech melanizace a enkapsulace (Royet et al., 2003).

V případě streptokokové infekce je buněčná odpověď u drozofily realizovaná plazmatocyty, které se naváží na cílové molekulární struktury patogenu (PAMPS = pathogen associated molecular patterns), čímž spustí signální dráhu vedoucí k pohlcení bakterie a její degradaci lysozomy, reaktivními formami kyslíku a oxidem dusnatým (Royet et al., 2003). Právě fagocytická aktivita plazmatocytů se zdá být esenciální pro přežití streptokokové infekce, kdy se po ablaci plazmatocytů schopnost drozofily přežít tuto infekci dramaticky snižuje (Defaye, 2009).

Hemocyty mají kromě mechanické funkce zároveň funkci regulační, neboť řídí průběh imunitní odpovědi produkcí cytokinů (například Unpaired-3) a anti-mikrobiálních peptidů, a tím se buněčná imunitní odpověď propojuje s odpovědí humorální (Lemaitre and Hoffman, 2007). Rovněž se hemocyty účastní procesu metamorfózy, při které hrají roli v přetváření tkání a fagocytózu buněčných fragmentů (Abrams et al., 1993). Nejdůležitější úlohou hemocytů z pohledu této práce je jejich schopnost produkovat látky ovlivňující systemický metabolismus (Droujinine and Perrimon, 2016).

Hemocyty jsou jedním z hlavních témat mé výzkumné práce, a to zejména v kontextu extracelulárně produkováných látek ovlivňujících systemický metabolismus. Citlivá regulace je nezbytná pro tento proces, protože v případě chronické aktivace či deregulace zkoumaných kaskád dochází k závažným metabolickým změnám podněcujícím mnoho známých patologií.

1.2.2 Humorální imunita

Humorální imunita u drozofily se skládá z osmi rodin anti-mikrobiálních peptidů sekretovaných do hemolymfy (dále zvaných AMPs) (Imler and Bulet, 2005). K produkci peptidů dochází v tukovém tělese, analogickém k savčím játrům, a v hemocytech, avšak na rozdíl od savčích homologů jsou tyto peptidy aktivní proti limitovanějšímu množství mikroorganismů. (Lemaitre and Hoffman, 2007).

Základní signalizační dráhy řídící humorální imunitní odpověď jsou Imd (Immune Deficiency) reagující na Gram-negativní bakterie a v případě Gram-pozitivních bakterií, jako je *Streptococcus*, Toll signalizační dráha, případně jejich kombinace (Hoffman, Reichhart, 2002). Stejně či podobné signalizační dráhy lze najít i u savčí imunitní odpovědi, což poukazuje na vysokou míru evoluční konzervace imunitních mechanismů (Georgel et al., 2001; Lund and DeLotto, 2011).

Toll signální dráha, jejíž objev přinesl v roce 2011 Nobelovu cenu pro Hoffmana, je během infekce aktivována v hemolymfě proteázovou kaskádou (pravděpodobně peptidoglykanový rozpoznávající protein) a vede k sekreci proteinu Spätzle vázajícímu se na Toll receptor. Tato vazba indukuje intracelulární signální kaskádu, která degraduje protein Cactus a nukleárně translokuje transkripční faktory Dif a Dorsal spouštějící tvorbu AMPs (Gregorio, Spellman and Lemaitre, 2002).

Imd signální dráha indukuje imunitní odpověď při styku s Gram-negativními bakteriemi. Tato dráha je aktivována PGRP (peptidoglykan rozpoznávající protein), který se vyskytuje v membráně hemocytů. Aktivace IMD indukuje fosforylaci pre-transkripčního faktoru Relish, a ten je štěpen cysteinproteázou (kaspázou) Dredd. Důsledkem tohoto štěpení vzniká transkripční faktor Rel-68, který v jádře aktivuje transkripci AMPs (Lemaitre and Hoffman, 2007).

V neposlední řadě u drozofily, stejně jako u savců, v případě bakteriální infekce dochází k rychlé syntéze reaktivních forem kyslíku (ROS) ve střevě a v imunitních buňkách. Tímto mechanismem získá drozofila dodatečnou bariéru proti požitým mikroorganismům (Lemaitre and Hoffman, 2007). Kromě imunitní odpovědi řídí koncentrace ROS v drozofile i diferenciaci prohemocytů ve tři subtypy imunitních buněk, která probíhá hlavně v lymfatické žláze (Owusu-Ansah and Banerjee, 2009), a reparační mechanismy tkání (Schieber and Chandel, 2014).

Navzdory tomu, že jsou dobře objasněny faktory podílející se na aktivaci imunitní odpovědi, víme jen velmi málo o faktorech, které imunitní odpověď utlumují. Vzhledem k potenciálním škodlivým vlivům imunitní odpovědi na okolní buňky potřebuje organismus udržovat tyto pochody v rovnováze. Jednou z možností regulace je například down-regulace NF- κ B transkripčního faktoru a následné přerušení transkripce AMPs v jádře (Kim et al., 2007).

Během bakteriální infekce u drozofily humorální i buněčná větev imunitního systému pracují ve vzájemné souhře a imunitní odpověď je realizována nejen pomocí fagocytózy, ale zároveň i pomocí AMPs produkovaných tukovým tělesem či hemocyty. Participace obou větví imunitního systému nastává i po ukončení boje s infekcí, kdy v organismu dochází k opravě tkání (viz 1.2.3).

U savčích modelů dochází k využití jak vrozené imunity (buněčná a humorální), tak získané imunity, a protože lze potvrdit podobnost mezi vrozenou imunitou u drozofily a savců, slouží drozofila jako vhodný model ke studiu vrozené imunity nezkrácené vlivem imunity získané. Poznatky o funkci obou imunitních větví mohou tudíž být aplikovány na mnoho imunitních procesů pozorovaných u savců a člověka.

1.2.3 Průběh bakteriální infekce u *Drosophila melanogaster*

Imunitní systém drozofily je mnohvrstevný a představuje sofistikovaný způsob, jak bojovat s bakteriemi, viry a parazity, se kterými se drozofila během svého života může setkat. Díky absenci získané imunity slouží drozofila jako ideální modelový organismus pro studium přirozené imunity, jejíž některé složky prokazatelně odpovídají přirozené imunitě u savců (Govind, 2008). Bakteriální infekce *Streptococcus pneumoniae*, používaná k našim pokusům, není pro drozofilu přirozená, neboť dochází k injikaci vysoké dávky bakterií přímo do těla drozofily a tím pádem nejsou uplatňovány mechanismy epitelární imunity (Lemaitre and Hoffman, 2007; Govind, 2008). Použití tohoto typu bakteriální infekce nám slouží jako ideální model sepse a nezvládnutelného namnožení bakterií v organismu. Po proniknutí streptokoka do těla dochází k jeho okamžité proliferaci, která je s jistým zpožděním následována aktivací imunitní odpovědi (Wang, Kounatidis, Ligoxygakis, 2014). Období proliferace a aktivace imunitní odpovědi vykazuje zvýšení hladiny bakteriálních kolonií (CFU = colony forming units) bezprostředně po proniknutí bakterie do těla. Buněčná imunita tvoří i u drozofily hlavní složku imunitní reakce, kdy plazmatocyty pomocí fagocytózy bojují s patogenem a fungují jako analog savčích M1 makrofágů (Govind, 2008; Novák and Koh, 2013).

Fagocytóza začíná rozpoznáním bakterie pomocí PAMPS a navázání streptokoka na povrch těchto molekul. Následuje aktinová cytoskeletální remodelace umožňující internalizaci cizorodé látky, která se po obalení membránou degraduje pomocí lyzozomálních enzymů (Lemaitre and Hoffman, 2007). Současně s buněčnou imunitou dochází v drozofile i k aktivaci humorální imunity, produkující AMPs v tukovém tělese či v hemocytech (Wang, Kounatidis, Ligoxygakis, 2014). Antimikrobiální peptidy mají v boji s bakteriální infekcí spíše doprovodnou roli k fagocytóze buněčné složky imunity. Pokud ani spolupráce obou složek imunity není dostatečně efektivní v boji s patogenem a množství bakterií na jednu drozofilu přesáhne hranici 10^6 , dochází ke smrti (Lemaitre and Hoffman, 2007).

V opačném případě pozorujeme pokles CFU a nastává čas na opravu tkání, odpovídající aktivitě savčích M2 makrofágů (Novák and Koh, 2013). Na základě pokusů Neves a kol., hemocyty stimulují opravu tkání poškozených UV zářením. Principem je tvorba PDGF-related a VEGF-related faktoru 1 ve fotoreceptorech. Tím se následně aktivuje PDGF-related a VEGF-related receptor v hemocytech a stimuluje opravu poškozených tkání (2016). Kromě aktivního boje s infekcí tudíž mají hemocyty i alternativní roli v poinfekčním vyrovnání se s následky patogenu. Pro svou aktivaci a efektivní funkci v obou fázích infekce hemocyty spotřebují velké množství energie, tudíž během infekce musí docházet i k systemickým metabolickým změnám popsáním v kapitole 1.2.4.

1.2.4 Metabolické změny indukované během infekce

Komplexnost imunitní reakce během bakteriální infekce vyžaduje velké množství energie pro svoji efektivitu. Provázanost imunitního systému s metabolickou regulací je proto jednou ze základních podmínek jeho fungování (Unckless, Rottschaefer and Lazzaro, 2015). Vzhledem k evoluční konzervovanosti metabolických pochodů a společným znakům mezi drozofilou a člověkem, slouží tento experimentální model k jednoduchému a efektivnímu zkoumání metabolismu karbohydrátů, který lze aplikovat i u vyšších organismů (Haselton and Fridell, 2010). V běžném stavu dojde u drozofily po přijetí energie ve formě glukózy k jejímu uložení do tukového tělesa jako zásobárny energie ve formě glykogenu (Arrese and Soulages, 2010). K vytvoření glykogenu z glukózy v tukovém tělese využívá drozofila glykogen-syntázu. V případě zvýšené potřeby energie v organismu se glykogen z tukového tělesa rozkládá v hemolymfě pomocí glykogen-fosforylázy zpět na glukózu a slouží tak jako pohotová zásobárna energie pro tkáně (Reyes-DelaTorre, Peña-Rangel, Riesgo-Escovar, 2012).

Během bakteriální infekce dochází právě u imunitních buněk k této zvýšené potřebě energie a glykogen z energetických zásob se rozkládá zpět na glukózu a trehalózu, které imunitní buňky využívají k fagocytóze, produkci AMPs či opravě tkání po akutním boji s infekcí (Govind, 2008). Aby měly dostatek energie pro všechny tyto funkce, je potřeba snížit co nejvíc spotřebu energie neimunitními tkáněmi a chovat se sobecky ve smyslu meziorgánové komunikace, kdy dojde k nadřazení potřeb celého organismu nad potřeby jednotlivých tkání.

Proto hemocyty zapříčiní inzulinovou rezistenci neimunitních tkání a tím způsobí, že glukóza nemůže proniknout do buněk a zůstane volně cirkulovat v hemolymfě k dispozici pro imunitní buňky (Bajgar et al., 2015). Oproti stavu před infekcí se během imunitní reakce snižuje hladina glykogenu za současného zvýšení volně cirkulující glukózy. K rozkladu glykogenu na glukózu se využívá glykogen fosforyláza (Steele, 1982).

Dynamika konverze mezi glykogenem a volně cirkulující glukózou během imunitní reakce musí být řízena autonomně imunitními buňkami a jde ruku v ruce s jejich schopností zabránit ostatním tkáním, aby volně cirkulující glukózu během infekce použily na svou vlastní potřebu. Mechanismus této regulace je vysvětlen v následujících kapitolách.

1.3 Sobecký imunitní systém

1.3.1 Teoretické předpoklady

Imunitní systém při své aktivaci potřebuje rychle získat velké množství energie a nutrientů, aby mohl úspěšně bojovat s infekcí. Nejrychlejší metodou, jak energii získat, je glykolýza a právě proto je při aktivaci imunitních buněk upřednostňována před oxidativní fosforylací, ačkoliv produkuje méně ATP (Delmastro-Greenwood and Piagenelli, 2013). Pro získání dostatečného množství energie glykolýzou imunitní buňky zapříčiní systemické metabolické změny, kdy je spotřeba energie neimunitními tkáněmi redukována a tato energie může být následně využita buňkami imunitními. Steroidní hormon inzulin umožňuje glukóze vstup do buněk a jeho efekt musí být tudíž během imunitní aktivace v neimunitních tkáních potlačen (Hotamisligil, 2006). Tyto tkáně se stanou dočasně rezistentní vůči inzulinu a v organismu lze pozorovat hyperglykémii, neboť cirkulující glukóza slouží jako pohotovový zdroj energie pro imunitní buňky (Straub, 2014). Ačkoliv se tím zpomalí růst organismu, vývoj i reprodukční funkce, jsou tyto systemické metabolické změny nezbytné pro boj s patogenem a tím i pro přežití drozofily (Bajgar et al., 2015). Navzdory tomu, že byly metabolické změny pozorovány nejen u drozofily, ale i obratlovců včetně člověka, víme zatím jen velmi málo o molekulárním mechanismu, který tyto změny zapříčiňuje.

1.3.2 Extracelulární adenosin jako signální molekula pro systemické metabolické změny

Jedním z kandidátů na signální molekulu spouštějící metabolické změny byl extracelulární adenosin, zejména díky jeho roli ve vyvolání inzulinové rezistence (Natali et al., 1994) a v imunitní odpovědi u savců (Bours et al., 2006). Jeho vliv na metabolismus během infekce byl později experimentálně prokázán a tato hypotéza byla potvrzena (Bajgar et al., 2015). Adenosin je purinový nukleosid skládající se z molekuly adeninu a ribózy propojených β -N₉ glykosidickou vazbou. V organismu se nachází buď intracelulárně, nebo extracelulárně v mezibuněčném prostoru a podílí se hlavně na energetickém metabolismu. Oproti intracelulárnímu adenosinu je množství extracelulárního adenosinu mnohonásobně menší, nicméně jeho role v buněčné signalizaci zejména v případě imunitní odpovědi nesmí být opomíjena (Yegutkin, 2008).

V případě infekce parazitickou vosou je adenosinový signál produkovaný metabolicky stresovanými buňkami a funguje jako místní či systemický hormon, aktivující adenosinový receptor (Nováková and Doležal, 2011). Parazitické vosí vajíčko je rozeznáno cirkulujícími prohemocyty, ze kterých se diferencují lamelocyty. K rychlé diferenciaci, enkapsulaci a melanizaci parazitního vajíčka je potřeba velké množství energie, proto imunitní buňky začnou produkovat adenosin (Doležal, 2015). Následkem produkce adenosinu je utlumení spotřeby energie neimunitními tkáněmi a rovněž zpomalení jejich vývoje (Bajgar et al., 2015). Tkáně se stanou dočasně rezistentní vůči inzulinu a v celém organismu pak nastává dočasná hyperglykemie. Cirkulující glukóza je k dispozici imunitním buňkám pro jejich funkci. Jakkoliv může tento výsledek znít negativně z hlediska vývoje a reprodukční funkce, je to nezbytný stav pro úspěšný boj s patogenem a měl by tudíž být vnímán v pozitivním světle.

Pokud jsou tyto systemické metabolické změny indukované adenosinem znemožněny, aktivace imunitních buněk na parazitaci je nedostatečná a drozofila umírá. Pokud je naopak signál neadekvátně silný, v organismu nastává signifikantní plýtvání energií, které nakonec vede ke smrti z vyčerpání (Bajgar and Doležal, unpublished). Metabolické změny indukované adenosinem jsou tudíž nezbytné pro úspěšný boj s patogenem, nicméně musí být drženy v rovnováze. Vzhledem k výskytu adenosinové signalizace při metabolickém stresu i u dalších organismů se tato signální dráha ukazuje být univerzální, evolučně konzervovaná a efektivní reakce na stres (Shimkets and Dworkin, 1981).

Objevení extracelulárního adenosinu jako signální molekuly pro metabolické změny eskalovalo pochopitelně velkou řadu otázek, z nichž nejzajímavější pro nás byla, zda existuje kromě adenosinu ještě nějaká jiná molekula, která by fungovala jako signál pro sobecký imunitní systém. A právě na tuto otázku jsme se pokusili najít odpověď na následujících stranách této práce. Vycházíme-li z teoretického konceptu molekul produkovaných sobeckým imunitním systémem, můžeme zobecnit pravidla, která každá potencionální molekula musí splňovat, aby její role odpovídala chování efektivní sobecké molekuly.

1.4 Gen *Impl2* u *Drosophila melanogaster*

Po studiu literatury jsme jako kandidáta pro signální molekulu zapříčiňující systemické metabolické změny během infekce zvolili gen *Impl2*, což je homolog lidského IGFBP7 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein) (Andersen et al., 2000). Regulace exprese a aktivita funkce IGFBP u savců není v současné době detailně zpracována, a proto je objev homologie genu *Impl2* k savčímu možností, jak jeho vlivy zkoumat ve zjednodušeném modelu. Lepší pochopení insulinové signalizace u savců a člověka je velmi důležité zejména v asociaci s její dysfunkcí ústící v diabetes mellitus, kardiovaskulární poruchy či různé typy rakoviny (Blumenthal, 2010).

Gen *Impl2* patří do imunoglobulinové superrodiny a tvoří ho geny kódující 20-hydroxyekdyson-indukovaných proteinů vázaných na membránu či sekretovaných (Garbe et al., 1993). Mechanismem funkce genu *Impl2* je jeho extracelulární vazba na Dipl2 (*Drosophila* Insulin-Like Peptid 2), syntetizovaný v buňkách produkující inzulín. Tato vazba následně utlumuje insulinovou signalizaci (Andersen et al., 2000). V důsledku utlumení této signalizace se v organismu zvyšuje hladina cirkulující glukózy, snižuje hladina glykogenu a objevuje se inzulínová rezistence a kachexie tkání (Figueroa-Clarevaga and Bilder, 2015). Kromě metabolické regulace gen *Impl2* dále řídí především buněčný růst a fertilitu či ovlivňuje délku života drozofily (Honegger et al., 2008).

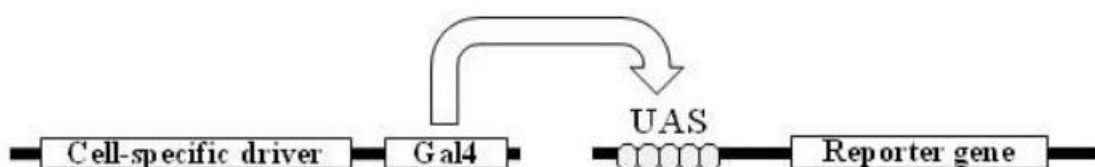
1.4.1 Genetické nástroje umožňující zkoumání role genu *Impl2*

Pro tuto výzkumnou práci používáme RNA interferenci a systém Gal4-UAS spolu s Gal80 teplotně senzitivní modifikací, jejichž mechanismy jsou popsány v následujících odstavcích.

1.4.1.1 Gal4-UAS systém

Cílená tkáňově specifická kontrola genové exprese pomocí systému Gal4-UAS umožňuje zkoumání rolí jednotlivých genů v konkrétním místě jejich působení. Protein kódovaný Gal4 sekvencí se skládá z 881 aminokyselin a váže se na specifické místo v DNA sekvenci zvané UAS, což indukuje transkripci genů, které za sekvencí následují (Fischer et al., 1988). Pokud exprimujeme Gal4 tkáňově specificky, můžeme tím spustit transkripci genů cíleně v jednotlivých tkáních a zkoumat tak jejich účinek, zatímco zbytek systému funguje běžným způsobem.

Tato metoda se ukazuje jako obzvlášť účinná v případě, že transkribovaný gen je toxický, či negativně ovlivňuje životaschopnost drozofily (Brand and Perrimon, 1993). Díky systému Gal4-UAS je možné držet cílený gen pod UAS kódující sekvencí, zatímco jeho transkripční aktivátor (Gal4 protein) se bude nacházet v odlišné transgenní linii, a pouze po zkřížení těchto dvou linií bude transkripce cíleného genu spuštěna (Brand and Perrimon, 1993).

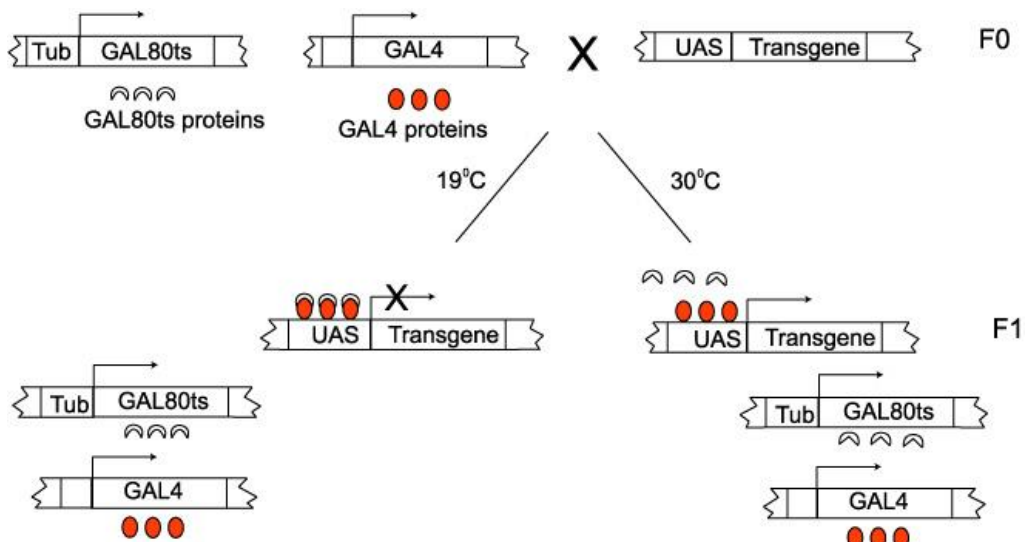


Obr. 1: Schematické znázornění principu Gal4-UAS systému (Adapted from Brand and Perrimon, 1993). Gal4 sekvence kóduje protein, který se naváže na UAS sekvenci na DNA. Následně dojde ke spuštění transkripce genu umístěného za UAS sekvencí. UAS = aktivační sekvence na horním konci genu

Gal4 = kódující sekvence pro galaktózou indukované geny

1.4.1.2 Gal80 inhibiční protein

Kromě tkáňově specifické regulace genové exprese u drozofily je možné docílit i časově specifické regulace, a to pomocí teplotně senzitivního inhibičního proteinu Gal80 (Zeidler et al., 2004). Tento inhibiční protein objevený u kvasinek rodu *Saccharomyces cerevisiae*, který je exprimován pod promotorem tubulin 1, nasedá na posledních 30 aminokyselin proteinu Gal4 a zablokuje tím jeho aktivační doménu pomocí interakce dimer-dimer (Melcher and Xu, 2001). Systém Gal80^{TS} inhibičního proteinu byl experimentálně ověřen u drozofily pomocí zeleného fluorescenčního proteinu, který byl cíleně reprimován v nervovém systému u larválního stádia. Měření fluorescence probíhalo v referenčních teplotách, kdy v 18°C Gal80^{TS} téměř kompletně inhiboval Gal4, zatímco v 25-29°C byla fluorescence jen málo inhibovaná (Suster et al., 2004).



Obr. 2: Schematické znázornění funkce Gal80^{TS} (Wang and Zhong, 2004).

V 19°C dojde k navázání Gal80 na Gal4 proteiny, čímž se znemožní jejich aktivace proteinu kódovaného UAS sekvencí. Ve 30°C se teplotně degraduje Gal80 inhibiční protein a Gal4 po nasednutí na UAS sekvenci spouští transkripci kódovaného genu.

Pomocí Gal4-Gal80^{TS} interakce je možné specificky regulovat jakékoliv buňky drozofily v libovolném stadiu jejího vývoje (Lee and Luo, 1999). Této vlastnosti jsme využili při tvorbě experimentálního designu pokusů, kdy jsme cíleně tlumili produkci genu *Impl2* v dospělém stadiu pomocí RNA interference (RNAi), takže během předchozích vývojových stadií byly drozofily drženy v teplotě 18°C a Gal80^{TS} inhiboval nasednutí Gal4 na UAS a spuštění RNAi. Až v konkrétním bodu jejich vývoje v dospělém stadiu byly drozofily přemístěny do 29°C, Gal80^{TS} byl tímto degradován a RNAi byla spuštěna (viz následující kapitola).

1.4.1.3 RNA interference

RNA interference je technika, které se používá k umlčování genů. Funguje na principu degradace specifických mRNA a tím k zabránění syntézy proteinů jimi kódovaných. RNAi je díky své rychlosti a relativní jednoduchosti využívána v organismu k boji s patogenními nukleovými kyselinami a regulaci genové exprese, cílená RNAi je ve vědě efektivním nástrojem pro přímou (forward) genetiku, jejíž přístupem se geny charakterizují pomocí jejich vypnutí a následném sledování genotypických projevů. Před objevením principu RNA interference se přímá genetika musela spoléhat na mutace vznikající přirozeně nebo v důsledku využití radiace či chemických mutagenů.

RNA interference tvoří velmi důležitou součást imunitního systému drozofily. Využívá ribonukleázu Dicer-2, která nastříhá dvouvláknové molekuly RNA na krátké, přibližně 21-24 nukleotidů dlouhé siRNA, které jsou poté proteinem R2D2 přeneseny k proteinu Argonaute-2. Následně dojde k zformování komplexu RISC a k rozštěpení dvouvláknové DNA současně s degradací jednoho z vláken. Druhé vlákno se naváže ke komplementární sekvenci patogenu a protein Argonaute-2 poté rozštípe siRNA společně s navázanou RNA patogenu (Dietzl et al., 2007; Kavi et al., 2005).

1.4.2 Místa produkce genu *Impl2* v *Drosophila melanogaster*

Ilia Droujinine a Norbert Perimon ve své práci popisují produkci genu *Impl2* v tukovém tělese, svalech, imaginálních discích a střevě larvy a dospělého (2016). V těchto tkáních je gen *Impl2* exprimován pod vlivem různých experimentálních podmínek či genetických modifikací. Efektům jeho produkce v těchto tkáních se budou zabývat následující odstavce této práce. Jisté však je, že účinek genu *Impl2* na systemický metabolismus je v případech jeho produkce identický, a není tudíž až tak důležité, ze které tkáně je v organismu produkován.

1.4.2.1 Gen *Impl2* v tukovém tělese

Produkce genu *Impl2* v tukovém tělese byla experimentálně prokázána v larválním stadiu během hladovění (Honegger et al., 2008). Utlumování insulinové signalizace bylo testováno v běžných i pozměněných nutričních podmínkách. Pokud na běžné dietě došlo k upregulaci genu *Impl2* na bázi celého organismu, následovalo signifikantní zmenšení velikosti celého těla, v případě utlumení genu *Impl2* drozofily vykazovaly naopak zvětšení celého těla. V případě pozměněných nutričních podmínek gen *Impl2* upregulovaný v tukovém tělese utlumil insulinovou signalizaci v celém organismu, což drozofile umožnilo přežít nepříznivé podmínky. Pokud byl gen *Impl2* experimentálně vypnut v tukovém tělese a larvy drozofily byly vystaveny hladovění, úmrtnost těchto larev se rapidně zvýšila v porovnání s wild-type kontrolami na téže experimentální dietě. Z výsledků experimentu můžeme usuzovat, že s hladověním se drozofila vyrovnává právě navýšením produkce genu *Impl2* v tukovém tělese a následným utlumením inzulinové signalizace (Honegger et al., 2008).

1.4.2.2 Gen *Impl2* ve svalové tkáni

Produkce genu *Impl2* ve svalové tkáni byla experimentálně prokázána v dospělci drozofily během mírné mitochondriální perturbace (Owusu-Ansah, Song and Perrimon, 2013). V případě poškození mitochondrií stárnutím či zraněním se v organismu spouští mitochondriální stresová signalizace (Liu and Butow, 2006). Překvapivě, pokud je poškození mitochondrií mírné, délka života zkoumaných organismů se naopak zvýší (Owusu-Ansah, Song and Perrimon, 2013). Není zatím přesně jasné, jaký mechanismus za zvýšením dlouhověkosti stojí, ovšem jednou z molekul exprimovaných během mitochondriálního stresu ve svalech je právě gen *Impl2*, který spouští systemickou represi insulinové signalizace a tím prodlouží životnost zkoumaných drozofil. Ačkoliv jsou jejich svaly díky poškození mnohem menší, díky mitochondriálně indukované produkci genu *Impl2* je velikost všech orgánů a tkání od počátku vývoje zmenšená a výsledný mutant je životaschopný i s redukovanou svalovou hmotou. V neposlední řadě gen *Impl2* indukuje opravné mechanismy, díky kterým jsou poškozené mitochondrie degradovány a tím se zlepšuje tolerance organismu k mitochondriální perturbaci. Díky těmto experimentům můžeme usoudit, že s poškozením mitochondrií se drozofila vyrovnává rovněž pomocí zvýšení mitochondriálně indukované produkce genu *Impl2* ve svalech a následnému utlumení insulinové signalizace (Owusu-Ansah, Song and Perrimon, 2013).

1.4.2.3 Gen *Impl2* v imaginálních discích

Transplantace imaginálních disků, ve kterých bylo indukované rakovinné bujení, do dospělé drozofily byla využita jako model reprezentující růst tkáně běžně pozorovaný při rakovině (Figuroa-Clarevega and Bilder, 2016). Právě během rakoviny velká spousta pacientů zemře na tzv. rakovinnou kachexii, kdy tkáně často vzdálené od tumoru vykazují příznaky hladovění, ačkoliv nutrienty přijímané pacientem jsou dostatečné. Stejně genotypické příznaky byly pozorovány i u drozofil s transplantovanými imaginálními disky, ve kterých bylo indukováno rakovinné bujení. Mechanismem, který imaginální disk (nádor) využívá, aby indukoval hladovění, je produkce genu *Impl2* a následná insulinová rezistence a kachexie tkání. Pokud byl gen *Impl2* pomocí RNAi vypnut specificky v nádorové tkáni, míra kachexie periferních tkání byla dramaticky snížena.

Ačkoliv je hladovění způsobené tumory s největší pravděpodobností multifaktorové, jedním ze základních stavebních kamenů je nádorem indukovaná overexprese genu *Impl2* a jeho následné utlumení insulinové signalizace a kachexie periferních tkání nezávisle na kvalitě přijímaných nutrietů (Figueroa-Clarevaga and Bilder, 2016).

1.4.2.4 Gen *Impl2* ve střevě

Young Kwon a kol. zkoumal *Impl2* signalizaci u dospělé drozofily ve vztahu k experimentálně zvýšené proliferaci střevních kmenových buněk, která způsobuje insulinovou rezistenci ve tkáních ovárií, tukového tělesa a svalů (2015). Při této zvýšené proliferaci byla prokázána exprese genu *Impl2* ze střeva, které inhibovala inzulinovou signalizaci v periferních tkáních. Pokud byly efekty genu *Impl2* cíleně vypnuty v místě kachexie, došlo k záchraně těchto tkání. Experimentálně bylo prokázáno, že nadměrně proliferující kmenové buňky ve střevě produkují gen *Impl2*, aby indukovaly inzulinovou rezistenci okolních tkání a uspořily tím nutrienty pro svůj další vývoj a množení (Kwon et al., 2015).

Produkce genu *Impl2* byla dále u dospělé drozofily popsána v aortě a srdci (Honegger et al., 2008; Cammarato et al., 2011), či v hlavové části drozofily (Aradská et al., 2015), avšak o jeho funkci se v souvislosti s těmito místy ví jen velmi málo. Jisté však je, že efekt účinku genu *Impl2* na systemický metabolismus má jisté společné znaky a není tudíž až tak důležité, ze které tkáně je v organismu produkován.

Ve všech ostatních případech produkce genu *Impl2* uvedených v literatuře, jako je stresová odpověď na hladovění, mírná mitochondriální perturbace, rakovina a nadměrná proliferace kmenových buněk, je spojující charakteristikou nedostatek energie pro dané buňky či tkáně, aktivace glykolýzy či znemožněná oxidativní fosforylace. Tyto fenotypické projevy se objevují i během aktivace imunitní buňky. Proto jsme se rozhodli prozkoumat, jestli i hemocyty mohou využívat produkce genu *Impl2* v případě bakteriální infekce, aby omezily příjem energie okolními tkáněmi a tuto energii ušetřily pro svoji potřebu při imunitní aktivaci. Díky experimentům Marca Dionneho a kol. víme, že během infekce *Mycobacterium marinum* drozofila vykazuje sníženou inzulinovou signalizaci a následné hladovění, nicméně nebylo zatím prokázáno, zda může gen *Impl2* být mediátorem tohoto snížení (2006).

Pro prokázání jeho role v regulaci metabolismu během imunitní odpovědi je nutné experimentálně ověřit několik parametrů, které by gen *Impl2* ve vztahu k bakteriální infekci musel splnit, aby mohl být považován za signální molekulu pro tyto systemické metabolické změny (viz 1.4.2.5 – 1.4.5).

1.4.2.5 Produkce genu *Impl2* v imunitních buňkách

Jednou z podmínek pro prokázání, že gen *Impl2* funguje jako signál pro utlumení inzulinové signalizace během bakteriální infekce, je jeho produkce specificky v aktivovaných imunitních buňkách. K detekci exprese genu *Impl2* v těchto buňkách použijeme produkci fluorescenčního proteinu mCherry pod kontrolou přirozeného promotoru genu *Impl2* (viz 3.12). Tento genetický konstrukt nám umožní sledovat místa aktivace tohoto promotoru a označí nám tak cílové buňky. Plazmatocyty *D. melanogaster* jsou charakteristické svojí distribucí v těle dospělého jedince a dají se rozlišit i morfologicky. Můžeme tedy snadno ověřit, zda se gen *Impl2* produkuje právě v imunitních buňkách.

1.4.3 Zvýšení hladiny genu *Impl2* během infekce

V návaznosti na produkci genu *Impl2* imunitními buňkami je logicky následujícím krokem prokázat, že hladina genu *Impl2* se během infekce výrazně zvedá. Míru exprese genu *Impl2* můžeme přesně měřit pomocí metody kvantitativní PCR, která nám jasně ukáže změny množství mRNA v odpověď na změnu experimentálních podmínek. Aby bylo možné vyloučit zkreslení výsledku produkcí genu *Impl2* v jiných tkáních (zejména v aortě, kde je jeho exprese výrazná), můžeme použít rovněž metodu FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting), díky které můžeme extrahovat hemocyty a pomocí kvantitativní PCR změřit produkci genu *Impl2* mRNA specificky ve vyselektovaných imunitních buňkách. Očekáváme, že hladina genu *Impl2* v celých organismech i v hemocytech bude signifikantně zvýšena u jedinců infikovaných streptokokem oproti kontrolám injikovaným puřem. Tento rozdíl by při měření přímo v hemocytech měl být markantnější v porovnání s produkcí genu *Impl2* v celém organismu.

1.4.4 Důležitost genu *Impl2* pro boj s patogenem

Molekulárně genetické nástroje u drozofily nám umožňují poměrně snadnou manipulaci genové exprese konkrétního genu v konkrétních tkáních i čase.

Utlumení exprese genu *Impl2* pomocí hemocytově specifického driveru nám umožní charakterizovat jeho vliv na imunitní odpověď jedince, aniž by došlo k ovlivnění jeho exprese v jiných tkáních.

Proto pro posouzení významu genu *Impl2* při bakteriální infekci tento gen v imunitních buňkách down-regulujeme a budeme sledovat, jak si drozofily s infekcí poradí. K vypnutí tohoto genu použijeme systém Gal4-UAS s teplotně senzitivní modifikací Gal80 (viz 1.4.1), který nám umožní specificky vypnout gen *Impl2* v hemocytech dospělého, aniž by se tím omezila jeho produkce v ostatních tkáních.

Efektivita imunitní odpovědi může být charakterizována dvojím způsobem, a to analýzou přežívání a také analýzou množství bakterií v jedinci v konkrétním čase po infekci. Tyto parametry jasně odhalí, zda je imunitní odpověď a baktericidní funkce makrofágů závislá na hemocytově specifické produkci genu *Impl2*.

1.4.5 Vliv genu *Impl2* na systemické metabolické změny během infekce

Poslední částí experimentu bude objasnit, zda důležitost genu *Impl2*, potencionálně prokázaná v předchozích bodech, spočívá právě v jeho schopnosti způsobit systemické metabolické změny nezbytné pro imunitní buňky. Pro posouzení tohoto faktu můžeme měřit hladinu volně cirkulující glukózy a glykogenu v mutantech i kontrolách, a to v různých časech po infekci. Hladina glukózy slouží jako zásobárna pohotovosti energie pro imunitní tkáň a bylo ukázáno, že se její hladina v odpovědi na bakteriální infekci dramaticky liší (Bajgar A., Doležal T., unpublished). Infekcí indukované změny glukózy korelují také se změnami zásob glykogenu. Měření těchto metabolitů nám tedy může dát velmi dobrou představu o roli genu *Impl2* v regulaci systemického metabolismu během bakteriální infekce.

Dalším nástrojem, který nám může přispět k odhalení role genu *Impl2* během stresové odpovědi, je CCR (Chill-coma Recovery). Bylo ukázáno, že během dlouhodobého působení nízkých teplot se organizmus, který k tomu není adaptovaný, snaží do poslední chvíle vzdorovat nízkým teplotám a spotřebuje veškerou volnou (v glukóze vázanou) energii především na udržení membránového potenciálu buněk (Chen and Walker, 1993). Spotřeba volných energetických zásob vede k následnému zhroucení rovnováhy v organismu a kómatu.

Tento stav je do jisté míry reverzibilní a čas, který je potřebný k probuzení se z tohoto stavu po skončení působení nízkých teplot, ukazuje, jak rychle dokáže jedinec mobilizovat energii ze zásob a doručit ji svalovým buňkám (probuzení se hodnotí postavením se na nohy) (Chen and Walker, 1994). Tato esej může odhalit mnohé z působení hodnoceného genu na systemický metabolismus a jeho roli v aktivaci kaskád vedoucích k uvolnění glukózy z glykogenu a transport glukózy do cílových buněk.

2. CÍLE PRÁCE

1. Prokázat, zda se gen *Impl2* exprimuje v imunitních buňkách.
2. Charakterizovat míru exprese genu *Impl2* během bakteriální infekce.
3. Experimentálně ověřit důležitost genu *Impl2* pro rezistenci vůči bakteriální infekci.
4. Charakterizovat roli genu *Impl2* v regulaci metabolismu během.
5. Charakterizovat roli genu *Impl2* v procesu probouzení se z chladem navozeného kómatu.

3. MATERIÁLY A METODY

3.1 Příprava konkrétních RNA linií

Křížení č. 1: Experimentální linie Hml Gal4 Gal80 x *Impl2* RNAi

$$P: \frac{w}{w}; \frac{Hml\ Gal4}{Hml\ Gal4}; \frac{P\{tubPGal80ts\}}{P\{tubPGal80ts\}} \quad \times \quad \frac{w}{/}; \frac{UAS\ Impl2\ RNAi}{UAS\ Impl2\ RNAi}; \frac{+}{+}$$

$$F1: \frac{w}{/}; \frac{Hml\ Gal4}{UAS\ Impl2\ RNAi}; \frac{P\{tubPGal80ts\}}{+}$$

Křížení č. 2: Experimentální linie *Impl2* Gal4 x UAS mCherry

$$P: \frac{w}{w}; \frac{+}{+}; \frac{Impl2\ R\Delta\ Gal4}{TM_6B\ e\ Tb\ Hu} \quad \times \quad \frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{UAS-hoesin:Cherry}{UAS-hoesin:Cherry}$$

$$F1: \frac{w}{w}; \frac{+}{+}; \frac{Impl2\ R\Delta\ Gal4}{UAS-hoesin:Cherry} \quad \times \quad \frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

$$F2: \frac{w}{w}; \frac{+}{+}; \frac{Impl2\ R\Delta\ Gal4\ UAS-hoesin:Cherry}{+} \quad \times \quad \frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{Impl2\ R\Delta\ Gal4\ UAS-hoesin:Cherry}{+}$$

$$F3: \frac{w}{(w)}; \frac{+}{+}; \frac{Impl2\ R\Delta\ Gal4\ UAS-hoesin:Cherry}{Impl2\ R\Delta\ Gal4\ UAS-hoesin:Cherry}$$

Křížení č. 3: Experimentální linie Hml Gal4 x *Impl2* RNAi

$$P: \frac{w}{w}; \frac{Hml\Delta-Gal4}{Hml\Delta-Gal4}; \frac{+}{+} \quad \times \quad \frac{w}{/}; \frac{UAS\ Impl2\ RNAi}{UAS\ Impl2\ RNAi}; \frac{+}{+}$$

$$F1: \frac{w}{/}; \frac{Hml\Delta-Gal4}{UAS\ Impl2\ RNAi}; \frac{+}{+}$$

Křížení č. 4: Kontrolní linie w[1118]

Pro potřeby této práce je používaná linie w[1118] v následujícím textu zkracována jako w.

P: Kontrolní linie *white*

$$\frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

Křížení č. 5: Kontrolní linie Hml Gal4 Gal80 x w[1118]

$$\text{P: } \frac{w}{w}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+} \quad \times \quad \frac{w}{/}; \frac{Hml\ Gal4}{CyO}; \frac{P\ \{tubPGal80ts\}}{TM_6B}$$

↓

$$\text{F1: } \frac{w}{/}; \frac{+}{Hml\ Gal4}; \frac{+}{P\ \{tubPGal80ts\}}$$

Křížení č. 6: Kontrolní linie *Impl2* RNAi x w[1118]

$$\text{P: } \frac{w}{w}; \frac{UAS\ Impl2\ RNAi}{UAS\ Impl2\ RNAi}; \frac{+}{+} \quad \times \quad \frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

↓

$$\text{F1: } \frac{w}{/}; \frac{UAS\ Impl2\ RNAi}{+}; \frac{+}{+}$$

Schema jednotlivých křížení bylo zapsáno podle konsenzu pro genetická křížení drozofily (viz Roote and Prokop, 2013).

3.2 Chov a manipulace

V laboratorních podmínkách byly drozofily chovány ve skleněných či plastových vialkách (zkumavkách s rovným dnem), uzavřených vatovou zátkou, která zabrání vylétnutí drozofil ven, ale zároveň je dostatečně propustná pro vzduch. Na dně vialky se nacházela přibližně 2cm silná vrstva potravy, která zároveň sloužila jako prostor pro kladení vajíček a počáteční vývoj larev. Rodičovské generace drozofil byly chovány na dietě s 5% glukózy ve skleněných vialkách a dospělé drozofily vybrané pro experimenty byly následně přemístěny na experimentální dietu s 0% glukózy v plastových vialkách.

Standardní dieta

Voda	1500 ml
Kukuřičná mouka 8%	120 g
Agar Ambresco(J637) 1%	15 g
Instantní kvasnice 4%	60 g
Sacharóza 5%	75 g
<i>Vařit 14 min při 100°, poté 50 min při 90°, snížit teplotu na 60°.</i>	
Metyl paraben 1,67%	25 ml

Tab. 1: Recept na standardní dietu

Experimentální dieta

Voda	1500 ml
Kukuřičná mouka 5,4%	80,3 g
Agar Drosophila Type II. (Apex – 66-103) 0,6%	9,3 g
Instantní kvasnice 2,8%	42,3 g
Sacharóza 0%	0 g
<i>Vařit 12 min při 100°, poté 60 min při 90°, snížit teplotu na 60°.</i>	
Metyl paraben 1,67%	25,1 ml

Tab. 2: Recept na experimentální dietu

Vialky byly v průběhu experimentů přemístovány z 18°C do 29°C v závislosti na cílené, časově specifické aktivaci RNAi pomocí Gal4 Gal80^{TS}. Vlhkost v inkubátorech dosahovala hodnoty 52-57%.

Při křížení finální generace bylo velmi důležité, aby genetický konstrukt Hml Gal4Gal80 byl v samici drozofily, která je panna. Díky tomu jsme měli jistotu, že v následující generaci dostaneme 100% potomků s kombinací Gal4Gal80 a RNAi.

3.3 Infekce

3.3.1 Manipulace s jedinci před infekcí

Po vylíhnutí drozofil chovaných v 18° a 60% vlhkosti na standardní dietě byli z chovu vyselektováni samci a ti byli následně přemístěni na experimentální dietu s 0% sacharózy, rovněž do 18° na sedm dní. Po uplynutí sedmi dnů byli přesunuti na 24 hodin do 29°, aby došlo k degradaci Gal80 a spuštění *Impl2* RNAi. Vlhkost v 29° dosahovala asi 57%. Současně jsme pěstovali kulturu streptokoka k infikaci.

Streptococcus pneumoniae (kmen EJ1) byl skladován v -80°C v Tryptic Soy Broth médiu (Sigma) s 10% glycerolem. Následně byla směs nanesena na TSB agarové misky připravené podle následujícího receptu:

TSB Agar:

dH ₂ O	400 ml
Tryptic Soy Broth 3%	12 g
Agar Ambresco(J637) 1,5%	6 g
Streptomycin sulfátová sůl 0,0075%	0,03 g

Tab 3.: Recept na přípravu TSB agaru

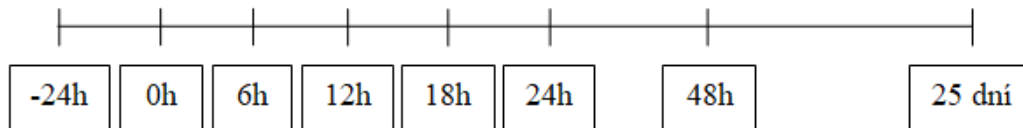
Agarová miska se streptokokovou kulturou byla přes noc inkubována ve 37°C. Poté se 3ml TSB smíchaly se 100 000 jednotkami katalázy a inkubovaly přes noc ve 37°C + 5% CO₂. Vypěstované kultury se dvakrát promyly TSB s čerstvou katalázou a nechaly se růst po dobu dalších cca. 4 hodin, aby dosáhly absorbance 0,4 OD₆₀₀. Díky centrifugaci a rozpuštění ve fosfátovém pufru (PBS) závěrečná absorbance dosahovala hodnoty 2,4 OD₆₀₀. Kultury byly poté uchovávány na ledu až do chvíle infikace.

3.3.2 Proces infikace

Přibližně 650 kusů každého ze zkoumaných genotypů drozofily bylo během několika opakování nainfikováno 20 000 bakteriemi *Streptococcus pneumoniae* (linie EJ1) v 50nl pufru pomocí skleněné jehly přístroje Eppendorf Femtojet Microinjector. Pro každý běh experimentu bylo nutné individuálně nakonfigurovat čas a tlak injikace, aby byl objem injikované dávky konstantní (50nl). Kontrolní drozofily byly injikovány 50nl čistého PBS. K uspávání drozofil byl použit CO₂ Flowbuddy Flow Regulator (Genesee Scientific, 7l/min), a po dobu jejich uchování na destičce zůstaly drozofily utlumené. Po infekci byly přemístěny po přibližně 20-30 kusech do vialky a umístěny do 29°C. Tyto drozofily byly každý druhý den přesypávány do čistých vialek s experimentální dietou, aby byla zaručena jejich životaschopnost pro využití do dalších experimentů.

3.3.3 Časová osa experimentu

Pro lepší pochopení dynamiky experimentálního designu infekce a následujících výzkumných kroků je jejich sled vynesena na časovou osu:



-24 h: přemístění dospělých samců z 18° do 29°

0 h: infekce, CFU, sběr na měření metabolitů

6 h: sběr na měření metabolitů

12 h: sběr na měření metabolitů

18h: CFU, sběr na měření metabolitů

24 h: vyhodnocování přežití, CFU, sběr na měření metabolitů

48 h: vyhodnocování přežití, sběr na měření metabolitů

25 dní: ukončení každodenního vyhodnocování přežití

3.4 Vyhodnocování přežití infikovaných jedinců

Po infikaci samců drozofily 20 000 bakterií byly octomilky přemístěny do čistých plastových vialek s experimentální dietou (cca. 25 kusů/vialka) a uchovávány v 29°C, 57% vlhkost. Vzhledem k uspání jedinců CO₂ bylo nutné je zkontrolovat po probuzení, aby bylo jisté, že infekci všechny drozofily přežily. Během experimentálního období bylo nutné dále drozofily přemísťovat každé 2 dny do čisté vialky, aby nedošlo ke zkreslení křivky přežití vlivem nevhodného stavu potravy na dně vialky. K tomuto přemístění nebyla použita anestezie, protože by mohla negativně ovlivnit mortalitu především u starších drozofil. Rovněž se na stěnu vialky zapisoval počet mrtvých drozofil přesypaných ze staré, aby nedošlo k dvojitému započítání. Každý den po dobu minimálně 25 dní (nebo dokud všechny octomilky nezemřely) se zapisovalo množství mrtvých jedinců, které bylo následně statisticky zpracováno (viz 3.13). Jako mrtvé byly započítány ty drozofily, které ležely na zádech a i po poklepu na stěnu vialky nevykazovaly žádný pohyb. Drozofily, které zemřely následkem neodborné manipulace či se přilepily na vrstvu diety, byly z pokusu vyloučeny. Statistické zpracování výsledných dat je uvedeno v kapitole 4.3. Experimentální design byl převzat a upraven podle Linford et al., 2013.

3.5 Colony forming units (CFU)

K spočítání rychlosti růstu bakterií v drozofile po infekci byl proveden experiment CFU, a to ve dvou časových bodech – 18h a 24h po infekci. Pro zhodnocení rovnoměrnosti infekce byl rovněž změřen obsah bakterií v různých drozofilách bezprostředně po infekci. V kontrolních časech byli nainfikovaní jedinci uspání CO₂ přístrojem a umístěni do mikrozkušavek typu Eppendorf s 200μl PBS v počtu 1 ks/zkušavka. Během celého průběhu experimentu bylo nutné zkumavky po co největší množství času uchovávat na ledu. Od každého genotypu bylo měřeno celkem 8 zkumavek pro každé opakování. Drozofily byly homogenizovány a následně bylo mikropipetou odebráno 20μl roztoku a dvakrát ředěno na 96 jamkové destičce. V každé jamce se nacházelo 180μl PBS, takže výsledná koncentrace ředění byla 10⁻³. Finálně naředěný roztok byl vnesen na TSB agarovou misku připravenou podle receptu viz 3.2, pro každý běh měření byly dopředu připraveny čerstvé misky. Po zaschnutí kapek byly misky přemístěny na 24 hod do inkubátoru s teplotou 37°C k inkubaci. Po uplynulé době bylo možné binolupou (Olympus SZ51) počítat množství kultivovaných bakteriálních jednotek v každé drozofile.

Tato data byla zaznamenána do tabulky a následně počítačově zpracována viz 3.13.

3.6 Chill-Coma Recovery (CCR)

K provedení pokusu CCR byly použity drozofily přibližně stejného stáří (6 dní). Experimentální design byl převzat a upraven z literatury (David et al., 1998). Samci, kteří se vylíhli v 18°C v 52% vlhkosti byli přemístěni na experimentální dietu s 0% cukru na sedm dní. První opakování jsme vložili do inkubátoru s 25°C a 57% vlhkostí 24 hod před experimentem, druhé opakování jsme do týchž podmínek vložili 46 hod před experimentem.

Po uplynutí lhůty 24/46 hod byly drozofily umístěny do čistých prázdných vialek na led, čímž bylo umožněno jejich usnutí a následná manipulace bez použití CO₂, aby byl experiment co nejvíce objektivní. Jakmile se drozofily přestaly pohybovat, jemně jsme je přemístili na předchlazenou hliníkovou folii na ledu a pinzetou po jedné umísťovali na 96 jamkovou destičku. Po umístění drozofil do všech jamek destičky a uzavření víčkem se celá tato destička pokryla ledem a krabice se nechala 16 hodin v teplotě 8°C.

Následně se každá destička umístila na čistý filtrační papír a byl zaznamenán přesný čas zotavení octomilek. Kriterium pro zaznamenání času byl moment, kdy se drozofila úspěšně postavila na nohy. Ty octomilky, které se nehýbaly ani po 90 minutách, byly zaznamenány jako mrtvé.

3.7 Měření metabolitů

Měřené byly 3 veličiny – volně cirkulující glukóza, glykogen a proteiny, sloužící pro standardizaci možných odchylek způsobených odlišnými velikostmi drozofil. Sběr octomilek probíhal v časech 0, 6, 12, 18, 24 a 48 hodin po infekci. Pro přípravu vzorků byly použity 3 drozofily na jednu zkumavku typu eppendorf, které byly homogenizovány s 200 µl PBS. Pevné části tkání byly následně odstředěny 3 minutovou centrifugací ve 4°C, 8000 otáček za minutu. Vzorky určené pro kvantifikaci proteinů byly zamrazeny v -80°C, vzorky určené pro glukózu a glykogen byly denaturovány teplotou 75°C po dobu deseti minut, a následně rovněž zamrazeny v -80°C. V průběhu zpracování vzorků byly zkumavky drženy co nejvíc času na ledu.

Ke stanovení proteinů byl použit BCA kit (Sigma), kdy byl smíchán 1 díl vzorku s 20 díly roztoku (50 dílů kyseliny bicinchoninové + 1 díl B reagentu). Koncentrace proteinů byla odvozena z absorbance roztoku ve vlnové délce 595 nm.

Při stanovování glukózy jsme používali GAGO-20 kit (Sigma), kdy se 45 μ l vzorku smíchalo se 100 μ l reagentu (glucose oxidase-peroxidase reagent + o-dianisidine), následně se roztok 30 minut inkuboval v 37°C a po přidání 100 μ l H₂SO₄ se měřila jeho absorbance v 540 nm.

Ke kvantifikaci glykogenu se 5 μ l vzorku smíchalo s 5 μ l amyloglukosidázy, 20 μ l PBS a 100 μ l reagentu (glucose oxidase-peroxidase reagent + o-dianisidine). Následně se směs rovněž inkubovala 30 minut ve 37°C a po přidání 100 μ l H₂SO₄ se měřila absorbance v 540 nm. Všechna data byla následně zpracována pomocí počítačového programu.

3.8 Měření genové exprese

K analýze genové exprese byla použita metoda kvantitativní real-time PCR (polymerázová řetězová reakce). Celé drozofily (3 ks) byly homogenizovány a pomocí TRIzol® RNA isolation reagentu (Ambion) byla vyizolována RNA podle laboratorního protokolu výrobce. Zbytky DNA byly odstraněny pomocí Turbo DNase free kitu (Ambion), rovněž podle laboratorního protokolu výrobce (37°C, 30 min). DNase inactivation reagent byl použit k následné deaktivaci DNazy, kdy se vzorek nejprve ponechal 5 minut při pokojové teplotě a následně stočil ve 13000 otáčkách za minutu, rovněž při pokojové teplotě. Tím byla získána cDNA pomocí reverzní transkripce (Superscript III. reverse transcriptase – Invitrogen) a výsledná míra genové exprese byla změřena s použitím IQ Sybr Green Supermix Mastermix (BioRad) a přístroje CFX 1000 Touch Real-Time cycler (BioRad). Genová exprese byla standardizována podle exprese Ribosomálního proteinu 49 a výsledné hodnoty jsou uvedené v grafech, zpracovaných pomocí programu Statistica 13.

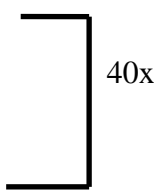
Sekvence primerů pro PCR:

<i>Impl2</i>	Forward	5'TTCGCGGTTTCTGGGCACCC3'
	Reverse	5'GCGCGTCCGATCGTCGCATA3'
Rp49	Forward	5'AAGCTGTGCGCACAAATGGCG3'
	Reverse	5'GCACGTTGTGCACCAGGAAC3'

PCR protokol:

94°C 3 min

94°C 15 sec denaturace
56°C 30 sec annealing
52°C 35 sec elongace
Fluorescenční detekce



Analýza křivky tání

65 – 85°C/krok 0,5°C

3.9 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Pro změření produkce genu *Impl2* specificky v hemocytech jsme k extrakci hemocytů použili metodu FACS pomocí přístroje S3TM cell sorter. Do zkumavek typu eppendorf jsme napipetovali 200µl PBS a vložili uspané drozofily (cca. 100 ks). Následně jsme drozofily mechanicky homogenizovali pro získání buněčné suspenze. Tato suspenze byla mililitrovou pipetou s ustřiženou špičkou přenesena kvůli vyčištění na sítko na FACS zkumavce. Poté jsme k suspenzi přidali 200µl PBS. Vzorky byly zcentrifugovány 3 minuty v 3500 otáčkách, 6°C. Po odsátí supernatantu jsme rozsuspendovali pelet v 1ml PBS a opět centrifugovali, tento krok se opakoval celkem třikrát. Po roztřídění buněk na cell-sorteru na základě endogenně produkovaného GFP pod Hemolectin Gal4 driverem jsme zkumavky s buňkami po překrytí víčka parafilmem uchovávali v mrazáku. Pro zjištění množství genu *Impl2* ve vysortovaných hemocytech byla použita metoda kvantitativní PCR (viz 3.8)

3.10 Konfokální mikroskop

Pro fixaci na konfokální mikroskop jsme drozofily promyli 1ml EtOH ve zkumavce eppendorf a po odsátí jsme přidali 4% paraformaldehyd. Po půl hodině až hodině na spinneru jsme 3krát promyli PBS a mezi každým promytím 10 minut točili na spinneru. Zafixovaný vzorek bylo následně možno pozorovat v konfokálním mikroskopu.

3.11 Grafické zpracování obrázků

Obrázky lokalizace produkce genu *Impl2* a *Impl2* pozitivních hemocytů byly vytvořeny pomocí konfokálního mikroskopu Olympus (FV1000) a zpracovány pomocí programu Statistica 13.

3.12 Počítání buněk

Pro lokalizaci produkce genu *Impl2* a počítání *Impl2* pozitivních hemocytů jsme použili vizualizaci pomocí fluorescenčního proteinu mCherry. Genetickým nástrojem pro tuto metodu byl Gal4-UAS (viz 1.4.1). Po zkřížení *Impl2* Gal4 s UAS mCherry linií došlo k označení místa produkce genu *Impl2* a kolokalizaci této produkce s místem výskytu hemocytů v organismu. Porovnávali jsme výskyt u kontrolních jedinců i jedinců infikovaných *Streptococcus pneumoniae*. K vizualizaci byl použit konfokální mikroskop (Olympus FV1000).

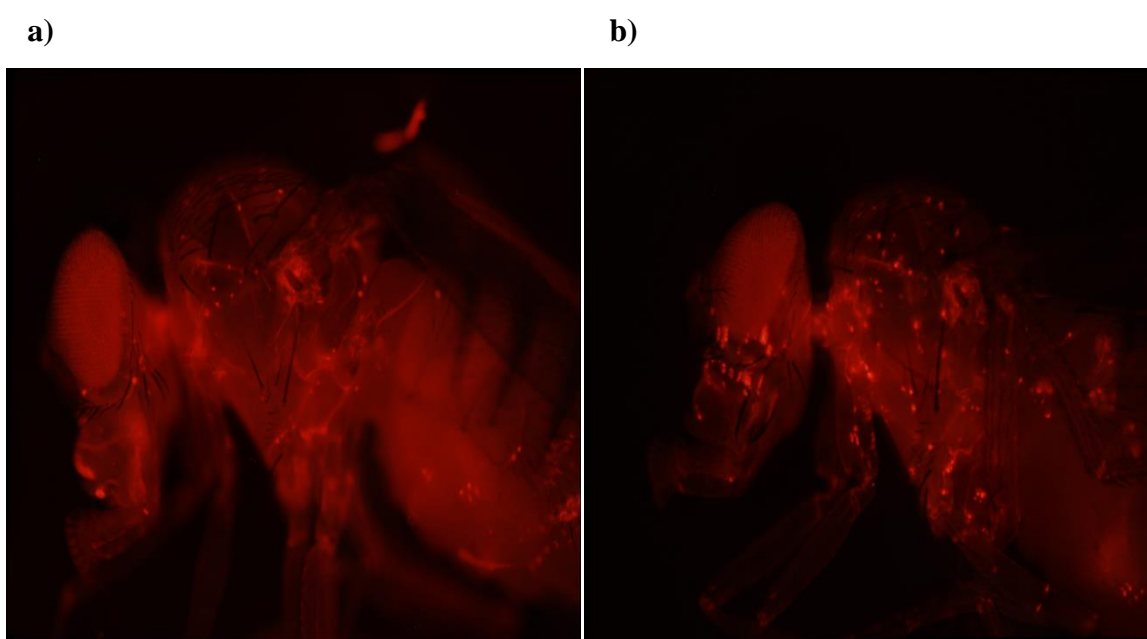
3.13 Graphpad Prism

Statistická data této diplomové práce byla zpracována pomocí počítačového programu Graphpad Prism 7.03, v případě parametrických testů byla testována normalita rozdělení a homogenita variancí v programu Statistica 13. Signifikanci pro kvantifikaci počtu hemocytů a míry exprese genu *Impl2* jsme stanovili pomocí Student's t-test podle následujícího postupu: p-hodnota $\leq 0,05$ jedna hvězdička (*), p-hodnota $\leq 0,01$ dvě hvězdičky (**), p-hodnota $\leq 0,001$ tři hvězdičky (***). Signifikanci pro srovnání hladiny metabolitů a CFU jsme stanovili pomocí Two-way ANOVA s Tukey multiple comparison testem podle následujícího postupu: p-hodnota $\leq 0,05$ jedna hvězdička (*), p-hodnota $\leq 0,01$ dvě hvězdičky (**), p-hodnota $\leq 0,001$ tři hvězdičky (***). Pro stanovení Chill-Coma Recovery signifikance byl použit One-way ANOVA s Tukey multiple comparison testem podle následujícího postupu: p-hodnota $\leq 0,05$ jedna hvězdička (*), p-hodnota $\leq 0,01$ dvě hvězdičky (**), p-hodnota $\leq 0,001$ tři hvězdičky (***). Pro posouzení signifikance křivek přežití byl aplikován Log-rank test podle následujícího postupu: p-hodnota $\leq 0,05$ jedna hvězdička (*), p-hodnota $\leq 0,01$ dvě hvězdičky (**), p-hodnota $\leq 0,001$ tři hvězdičky (***).

4. VÝSLEDKY

4.1 Produkce genu *Impl2* v imunitních buňkách

První podmínkou pro prokázání, že gen *Impl2* se v případě bakteriální infekce chová sobeckým způsobem, bylo potvrzení produkce genu *Impl2* specificky v imunitních buňkách. Za tímto účelem jsem použila vizualizaci místa produkce genu *Impl2* pomocí fluorescenčního proteinu mCherry, produkovaného pod přirozeným promotorem genu *Impl2*, a porovnání místa této produkce s charakteristickým vzorcem výskytu hemocytů v dospělé drozofile na snímcích z konfokálního mikroskopu.

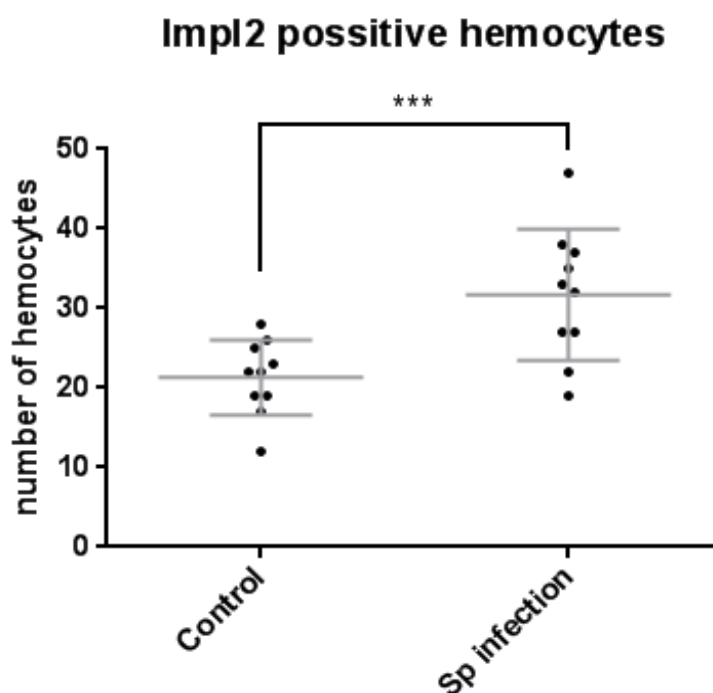


Obr. 3: Vizualizace místa produkce genu *Impl2* v těle dospělé drozofily během bakteriální infekce. Konfokální mikroskopický snímek zobrazující červeně svítící místa produkce genu *Impl2* v a) kontrolní neinfikované drozofily, b) v drozofily infikované bakterií *Streptococcus pneumoniae*. Výskyt míst produkce genu *Impl2* po infekci vykazuje výskyt odpovídající předpokládanému výskytu v organismu.

Na obrázku 3a jsem vizualizovala produkci genu *Impl2* v drozofily chované v kontrolních podmínkách – injikované puřem. K vizualizaci byl použit systém Gal4-UAS (viz 3.1) Na obrázku 3b je vizualizace produkce genu *Impl2* v drozofily po streptokokové infekci.

Oproti kontrolnímu jedinci, ve kterém byl gen *Impl2* exprimován minimálně, produkce genu *Impl2* po infekci narůstá a vizualizovaná místa této produkce odpovídají místům výskytu hemocytů v organismu dle dostupné literatury. Je patrné, že je gen *Impl2* je produkován na bazální úrovni v imunitních buňkách i bez infekce, ale po infekci se tato exprese signifikantně zvyšuje.

Kvantifikaci absolutního počtu *Impl2* pozitivních hemocytů v hrudním oddíle kontrolní drozofily a v drozofily infikované streptokokem jsem vynesla do následujícího grafu.



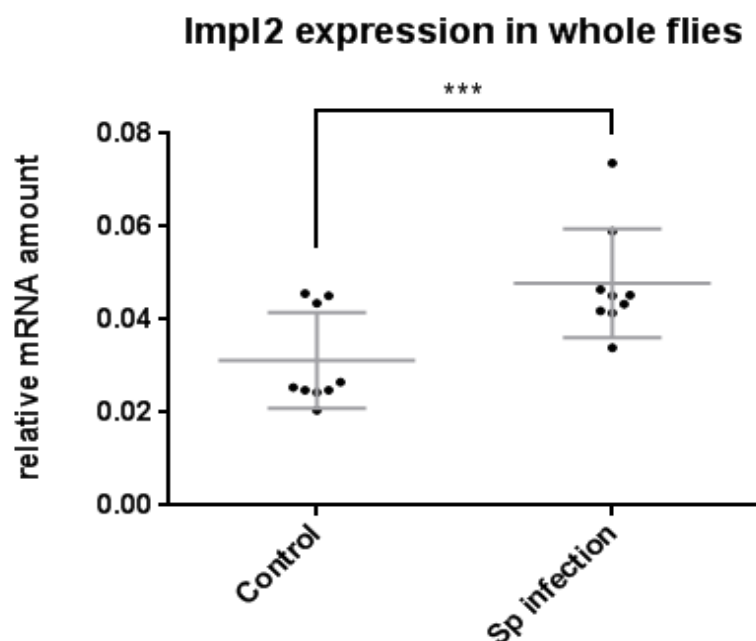
Graf 1: Počet *Impl2* pozitivních hemocytů v neinfikované drozofile a v drozofile infikované streptokokem. Počty hemocytů byly zaznamenávány v 10 testovaných drozofilách od každé zkoumané skupiny podle snímků z konfokálního mikroskopu. Snímky byly pořízeny z oblasti thoraxu, 5 vrstev při stejné intenzitě laseru. Vodorovné přímký zaznamenávají směrodatnou odchylku. Počet *Impl2* pozitivních hemocytů v infikovaných drozofilách je signifikantně zvýšen s hladinou významnosti $p < 0,001$ pomocí Student's t-test. Data jsou zpracovaná v programu Statistica 13.

Počet *Impl2* pozitivních hemocytů byl podle předpokladu signifikantně zvýšen u drozofil infikovaných streptokokem. Toto zvýšení odpovídalo hladině významnosti $p < 0,001$. Místo produkce genu *Impl2* odpovídá předpokládanému výskytu imunitních buněk v drozofile.

Pro ověření místa produkce genu *Impl2* specificky v hemocytech je nutné rovněž změřit míru exprese genu *Impl2* specificky v těchto buňkách v porovnání s mírou exprese v celém těle drozofily (viz. 4.2).

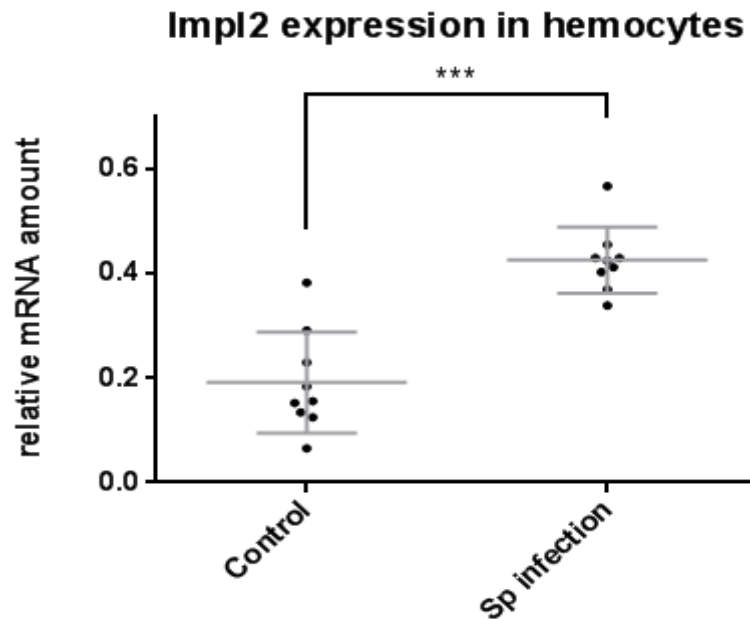
4.2 Zvýšení hladiny genu *Impl2* během bakteriální infekce

Abych kvantifikovala míru zvýšení produkce genu *Impl2*, pozorované během předchozího experimentu, měřila jsem množství exprese genu *Impl2* v těle dospělých drozofil. K měření této exprese byla použita metoda kvantitativní PCR, díky které jsem získala relativní hladinu mRNA porovnáním s expresí housekeeping genu Rp49.



Graf 2: Hladina exprese genu *Impl2* v celých drozofilách infikovaných streptokokem v porovnání s neinfikovanými kontrolními jedinci. Každý bod reprezentuje jeden měřený vzorek, ve kterém byly homogenizovány 3 ks drozofil. Vodorovné přímkové určují průměr a směrodatnou odchylku. Množství mRNA v drozofilách po infekci streptokokem bylo signifikantně zvýšeno, hladina významnosti odpovídala $p < 0,001$. Zpracováno v programu pomocí Student's t-test.

Relativní míra exprese genu *Impl2*, reprezentovaná jednotlivými body v grafu, byla signifikantně zvýšena u některých jedinců infikovaných streptokokem oproti kontrolním jedincům. Během infekce se tedy pravděpodobně zvyšuje produkce genu *Impl2* v celém těle drozofily. Abych ovšem identifikovala míru produkce genu *Impl2* specificky z imunitních buněk, která v tomto grafu může být zkrslena produkcí genu *Impl2* v jiných buňkách (například perikardiálních), rozhodla jsem se změřit produkci tohoto genu přímo v extrahovaných hemocytech. Pomocí cell sorteru jsem vytřídila hemocyty a změřila jsem produkci genu *Impl2* přímo v nich, opět s použitím metody qPCR.

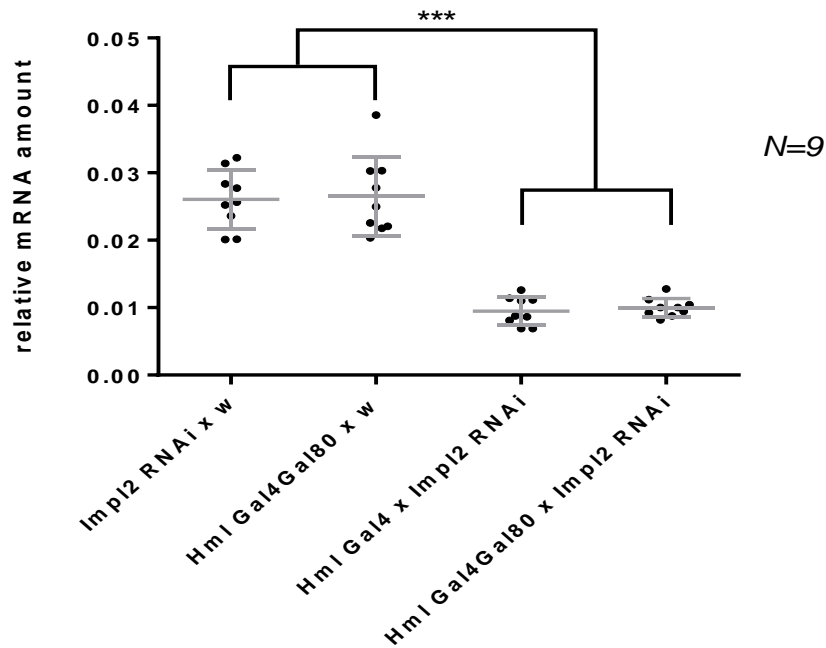


Graf 3: Hladina exprese genu *Impl2* specificky v hemocytech drozofil infikovaných streptokokem v porovnání s neinfikovanými kontrolními jedinci. Každý bod reprezentuje jednu měřenou vialku, ve které byly hemocyty vytříděné z přibližně 100 ks drozofil. Vodorovné přímkové určují směrodatnou odchylku. Množství mRNA v drozofilách po infekci streptokokem bylo dvojnásobně zvýšeno, hladina významnosti odpovídala $p < 0,001$. Zpracováno v programu Statistica 13 pomocí Student's t-test.

Pomocí cell sorteru jsem na základě endogenně produkovaného GFP proteinu vytřídila hemocyty z přibližně 100 ks drozofil a v nich jsem následně pomocí qPCR kvantifikovala relativní míru exprese genu *Impl2*. U drozofil infikovaných streptokokem bylo množství *Impl2* mRNA dvojnásobně zvýšeno, což je jednoznačně konkrétnější posun oproti předchozím grafu. Oproti měření *Impl2* mRNA v celém těle drozofil je také hladina mRNA přímo v hemocytech desetkrát vyšší. Můžeme tedy tvrdit, že k produkci genu *Impl2* dochází při infekci především v hemocytech a tato produkce se během této infekce signifikantně zvyšuje.

Abych ověřila účinnost RNA interference, měřila jsem rovněž hladinu genu *Impl2* exprimovanou v celém těle drozofil v kontrolní linii a v experimentální linii s utlumením exprese genu *Impl2* (experimentální linie 1).

**Effect of gene silencing on *Impl2* expression level
whole flies**

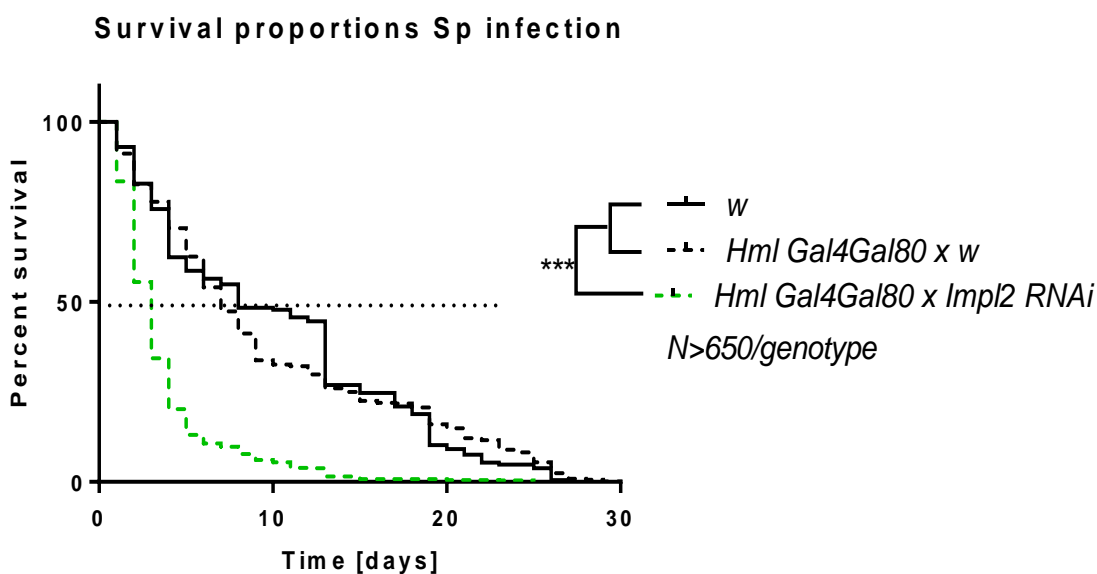


Graf 4: Hladina exprese genu *Impl2* v kontrolních liniích a v experimentálních liniích s utlumením exprese genu *Impl2*. Pro měření exprese byly vybrány experimentální linie, jejichž exprese genu *Impl2* je utlumena specificky v hemocytech pomocí systému Gal4-UAS a poté linie s přidáním teplotně senzitivní modifikace Gal80. Jako kontrolní linie byly zvoleny drozofily nesoucí driver pro *Impl2* RNA interferenci a drozofily nesoucí Hemolectin Gal4 Gal80 driver. Na ose X jsou zaznamenány jednotlivé genotypy, na ose Y je vynesena relativní míra exprese genu *Impl2*. V porovnání s kontrolními drozofilami je exprese genu *Impl2* v experimentálních liniích přibližně 2,5x nižší (hladina významnosti odpovídá $p < 0,001$). Počet testovaných drozofil je 9 kusů na každý genotyp. Data byla zpracována v programu Statistica 13 pomocí Student's t-test.

Z výsledků měření je evidentní, že exprese genu *Impl2* je 2,5x vyšší u kontrolních linií nesoucích driver pro *Impl2* RNAi nebo Hemolectin Gal4Gal80 driver v porovnání s experimentálními liniemi, ve kterých je produkce genu *Impl2* vypnuta specificky v hemocytech (Hml Gal4 x *Impl2* RNAi) a v linii s Gal80 teplotně senzitivní modifikací (Hml Gal4Gal80 x *Impl2* RNAi). Tyto výsledky ilustrují důležitost produkce genu *Impl2* v hemocytech, neboť produkce tohoto genu je měřena v celých tělech drozofil. Účinnost RNA interference a tím pádem utlumení exprese genu *Impl2* v hemocytech je signifikantní, hladina významnosti odpovídá $p < 0,001$.

4.3 Důležitost genu *Impl2* pro boj s patogenem

Dalším krokem následujícím identifikaci místa produkce genu *Impl2* bylo zhodnocení jeho důležitosti pro boj s bakteriální infekcí. Za tímto účelem jsem pomocí RNA interference opět utlumila produkci genu *Impl2*, kterou bylo možno systémem Gal4-UAS regulovat specificky v hemocytech. Gal80 teplotně senzitivní modifikace mi umožnila vypnout gen *Impl2* přímo v požadovaném stádiu vývoje, v mém případě ve stádiu dospělé těsně před infekcí. Po streptokokové infekci jsem následně sledovala křivku přežití u drozofil, u kterých byla utlumena produkce genu *Impl2* v hemocytech v porovnání s jedinci, jejichž produkce genu *Impl2* zůstala zachována.

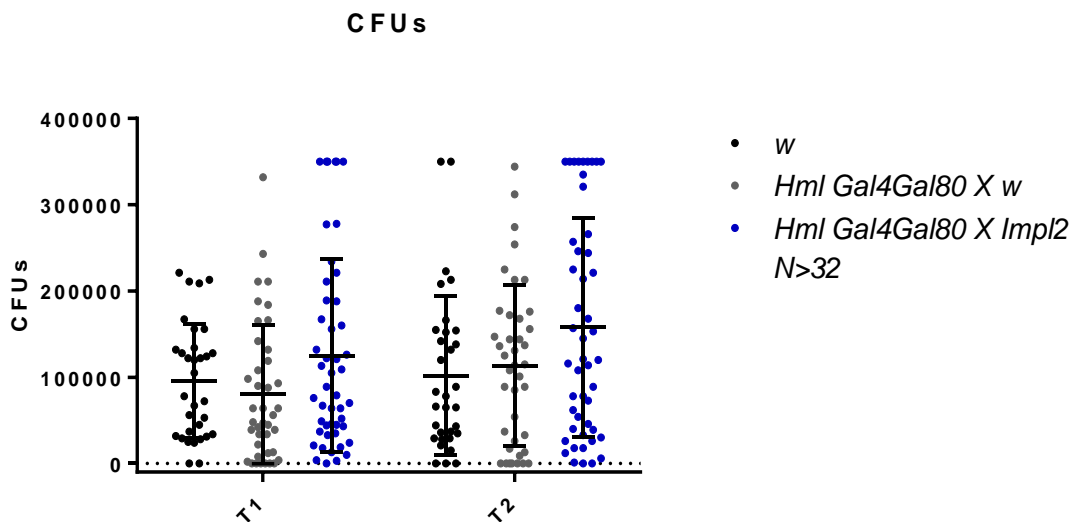


Graf 5: Křivka přežití *Impl2* RNAi drozofil po infikaci streptokokovou infekcí v porovnání s infikovanými kontrolními jedinci. Na ose X jsou vyneseny jednotlivé dny po infekci, sledování probíhalo po dobu 30 dní, osa Y znázorňuje umírání drozofil v procentech. Kontrolní jedince zastupují genotypy *w* a kontrolní křížení č. 5 (*Hml Gal4 Gal80 driver + w*). Výsledný graf vznikl fúzí výsledků z 6 nezávislých pokusů, průměrný počet drozofil je více než 650 kusů pro každý genotyp. Oproti výsledkům kontrolních drozofil vykazují *Impl2* RNAi drozofily od prvního dne rychlejší a rapidnější vymírání, kdy polovina jedinců zemře již do 3 dne po infekci, na rozdíl od kontrolních jedinců, z nichž polovina zemře těsně před hranicí desátého dne. Hladina významnosti odpovídá $p < 0,001$. Zpracováno v programu pomocí Log-rank test.

Z výsledků grafu je evidentní, že *Impl2* RNAi jedinci umírají na streptokokovou infekci mnohem rychleji a ve větším počtu. Již 3 den po infekci zemře až polovina *Impl2* RNAi

drozofil, po 12 dni od infekce většinou žádné z nich nepřežijí. Naproti tomu kontrolní jedinci bojují s infekcí podstatně déle, 50% jedinců se dožije téměř 10 dní po infekci a umírání postupně pomalu pokračuje až do ukončení pokusu 30. dne. Výsledky v grafu vznikly spojením 6 nezávislých kol infekce, kdy celkový počet drozofil převyšuje 650 kusů na každý genotyp. Rozdíl v křivce přežití *Impl2* RNAi oproti kontrolním jedincům vychází signifikantně, hladina významnosti $p < 0,001$.

Umírání drozofil může být způsobeno dvěma důvody. Prvním důvodem by mohla být náročnost samotné imunitní odpovědi – nízká tolerance drozofil. Dalším důvodem by mohlo být nedostatečné potlačení růstu bakterií – nízká rezistence drozofil. Proto jsem se rozhodla změřit množství bakterií v infikovaných jedincích a posoudit tak efektivitu fagocytózy. Pro provedení tohoto experimentu jsem použila metodu CFU (viz 3.5).

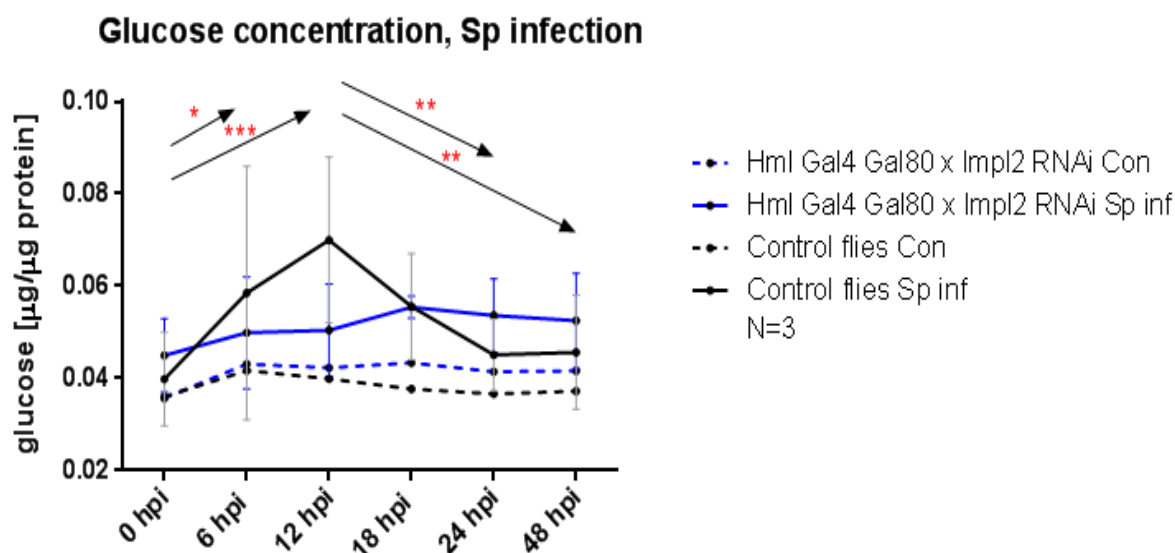


Graf 6: Rychlost růstu bakteriálních kolonií v *Impl2* RNAi drozofilách infikovaných streptokokem v porovnání s kontrolami. K měření počtu bakteriálních kolonií v každém jedinci po infekci byly zvoleny dva časy – 18 a 24 hodin po infekci. Tyto časy jsou vyneseny na ose X, osa Y znázorňuje množství bakteriálních kolonií v jednotlivých drozofilách, kdy nejvyšší uvedená hranice je 20 000 bakteriálních kolonií. Pro výsledky byla zvolena data získaná pro kontrolní genotypy *w* a křížení č. 5. Experimentální linii reprezentoval genotyp *Impl2* RNAi v hemocytech dospělého (experimentální křížení 1). Vodorovné linie vyznačují směrodatnou odchylku. Množství testovaných drozofil se rovná 8 kusům od každého genotypu v pěti opakováních (celkem 32 drozofil pro každý genotyp). Rozdíly mezi jednotlivými testovanými liniemi sejevily, nicméně po otestování pomocí Two-way ANOVA a Tukey multiple comparison testu tyto rozdíly nevyšly signifikantně.

Výsledný graf vznikl spojením dat ze 4 nezávislých experimentů, vybrána byla data porovnávací kontrolní linií *white* a linií nesoucí Hml Gal4Gal80 driver s linií experimentální, u které v hemocytech dochází k *Impl2* RNA interferenci (Hml Gal4 Gal80 x *Impl2* RNAi). Celkový počet jedinců byl 32 ks od každého genotypu. Množství bakteriálních kolonií bylo zkoumáno 18 a 24 hodin po infekci. Ačkoliv se rozdíly mezi jednotlivými časy po infekci i mezi oběma zkoumanými liniemi jeví jako průkazné, po použití Two-way ANOVA a Tukey multiple comparison testu tyto výsledky nevyšly signifikantně. Do budoucna by proto bylo vhodné provést experiment na větším množství jedinců, popřípadě zvýšit či snížit dávku bakterií na každého jedince.

4.4 Vliv genu *Impl2* na systemické metabolické změny během infekce

Aby mohl být gen *Impl2* považován za signální molekulu indukující systemické metabolické změny během infekce, bylo třeba charakterizovat jeho vliv na proměny hladin volně cirkulující glukózy a glykogenu v reakci na bakteriální infekci. Za tímto účelem jsem použila metody pro měření metabolitů, popsané v části 3.7.



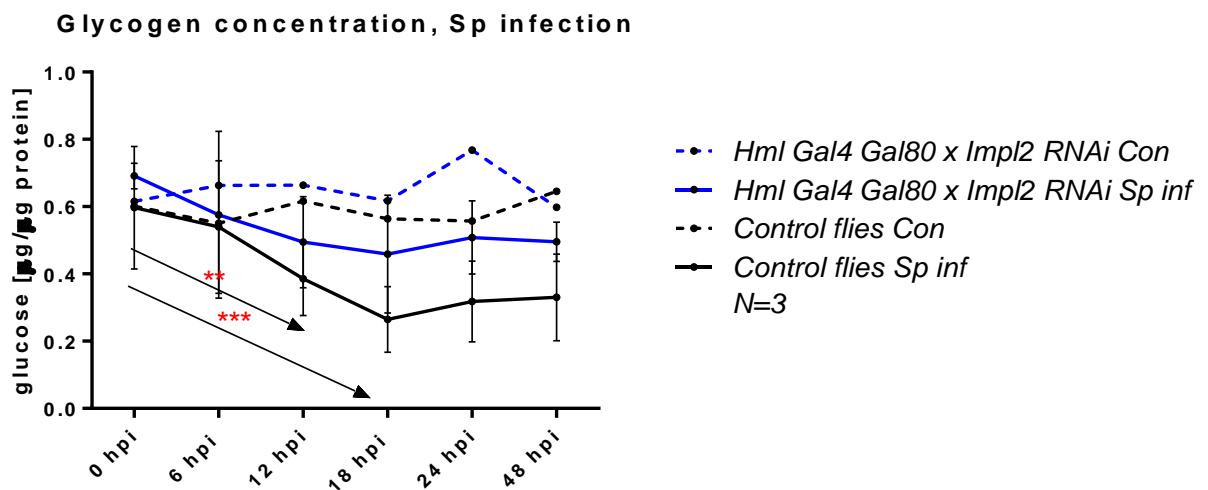
Graf 7: Vývoj koncentrace volně cirkulující glukózy v čase 0 – 48 hodin po streptokokové infekci. Na ose X jsou vyneseny jednotlivé časové body měření, na ose Y je znázorněna koncentrace volně cirkulující glukózy v µg v poměru k proteinům.

Výsledkem grafu je porovnání množství volně cirkulující glukózy po streptokokové infekci u *Impl2* RNAi drozofil vzhledem ke kontrolním drozofilám. Jako kontrolní linie byly použity sloučené vzorky z genotypů w, w x *Impl2* RNAi a Hml Gal4Gal80 x w. Pro demonstraci změn během infekce oproti zdravému stavu byly rovněž tyto linie kontrolně injikovány puřem, tyto křivky jsou vyvedeny přerušovanou čarou. Na jeden časový bod byl použit vzorek ze 3 kusů drozofil, každý experiment se třikrát opakoval. Oproti modře vyznačeným *Impl2* RNAi drozofilám vykazují kontrolní infikované drozofily signifikantní zvýšení volně cirkulující glukózy již v čase 6 hodin po infekci (hladina významnosti $p < 0,05$), nejvýraznější zvýšení pak nastává v čase 12 hodin po infekci ($p < 0,001$). V čase po 12 naopak u kontrolních infikovaných drozofil dochází k snížení hladiny volně cirkulující glukózy, které se ustaluje mezi 24 a 48 hodinami po infekci ($p < 0,01$). Oproti tomu hladina cirkulující glukózy u *Impl2* RNAi drozofil je během celé infekce v zásadě nezměněná. K posouzení signifikancí byl použit Two way ANOVA a Tukey multiple comparison test.

Měření hladiny cirkulující glukózy a glykogenu probíhalo v 6 časových bodech po infekci u genotypů *Impl2* RNAi a kontrol (sloučení dat z genotypů w, w x *Impl2* RNAi a Hml Gal4Gal80 x w).

Zároveň byla experimentální i kontrolní linie proměřena ve stejných časových rozestupech i po kontrolní injekci puřem. Běžná křivka volně cirkulující glukózy po infekci vykazuje prudký nárůst až do času 12 hodin, kdy začne pozvolna klesat a ve 24 hodinách se ustálí. Oproti tomu křivka *Impl2* RNAi drozofil zůstává po celou dobu po infekci zhruba vyrovnaná a potvrzuje, že metabolismus těchto mutantů na infekci systemicky reaguje jen velmi mírně, což odpovídá metabolismu za běžného režimu (viz injekce puřem – přerušované čáry).

Analogicky ke zvyšující se hladině cirkulující glukózy dochází obvykle ke snížení hladiny glykogenu, který v organismu funguje jako zásobárna energie.



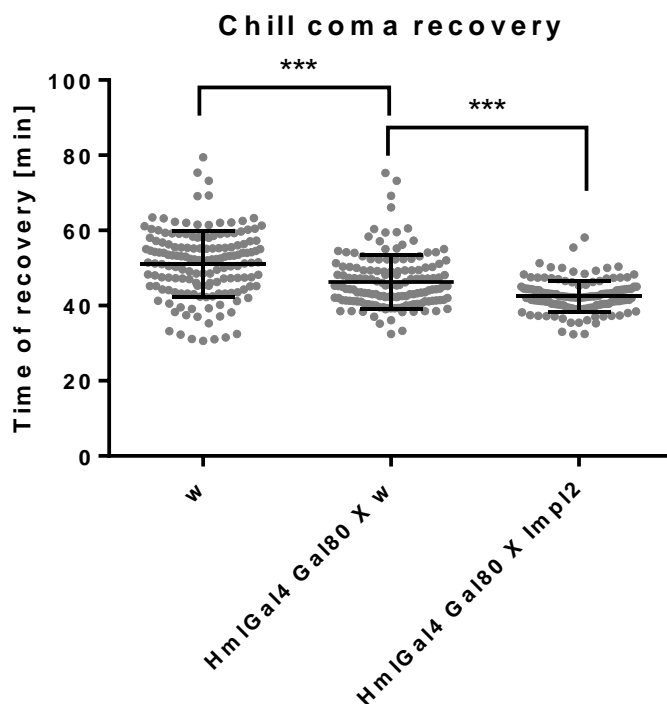
Graf 8: Vývoj koncentrace glykogenu v čase 0 – 48 hodin po streptokokové infekci. Na ose X jsou vyneseny jednotlivé časové body měření, na ose Y je znázorněna koncentrace glykogenu v µg v poměru k proteinům. Výsledkem grafu je porovnání množství glykogenu po streptokokové infekci u *Impl2* RNAi drozofil vzhledem ke kontrolním drozofilám. Jako kontrolní linie byly použity sloučené vzorky z genotypů *w*, *w x Impl2* RNAi a *Hml Gal4Gal80 x w*. Pro demonstraci změn během infekce oproti nemanipulovanému stavu byly rovněž tyto linie kontrolně injikovány puřem, tyto křivky jsou vyvedeny přerušovanou čarou. Na jeden časový bod byl použit vzorek ze 3 kusů drozofil, každý experiment se třikrát opakoval. Oproti modře vyznačeným *Impl2* RNAi drozofilám vykazují kontrolně infikované drozofily signifikantní snížení hladiny v čase 12 hodin po infekci (hladina významnosti $p < 0,01$), nejvýraznější zvýšení pak nastává v čase 18 hodin po infekci ($p < 0,001$). Následně se hladina glykogenu ustálí. Oproti tomu hladina glykogenu *Impl2* RNAi drozofil klesá jen velmi mírně a tato změna není signifikantní. K posouzení signifikancí byl použit Two way ANOVA a Tukey multiple comparison test.

Měření hladiny glykogenu probíhalo rovněž v 6 časových bodech po infekci. K testování byly použity stejné linie jako pro měření volně cirkulující glukózy.

U kontrolních linií dochází po infekci ke snižování hladiny glykogenu v čase 12 ($p < 0,01$) a 18 hodin po infekci ($p < 0,001$). Hladina glykogenu se poté ustálí a dále se již nesnižuje. *Impl2* RNAi mutanti naproti tomu hladinu glykogenu v reakci na bakteriální infekci signifikantně nemění, což koreluje s jejich nezměněnou hladinou volně cirkulující glukózy a s neschopností systemicky reagovat na prodělávanou bakteriální infekci.

4.5 Role genu *Impl2* během probouzení se z chladem indukovaného kómatu (CCR)

Pro objasnění role genu *Impl2* při metabolismu v drozofile jsem charakterizovala jeho vliv na přeměnu glykogenu na glukózu v případě potřeby energie. Modelem pro potřebu rychlé mobilizace energie bylo pro tento experiment chladem indukované kóma (CCR – viz 3.6).



Graf 9: Časy probouzení drozofil z chladem indukovaného kómatu. Na ose X jsou vyneseny dvě kontrolní linie – *white* a drozofila nesoucí Hml Gal4Gal80 driver. Na ose Y je čas probuzení se z kómatu v sekundách. Každý bod v grafu určuje přesný čas probuzení drozofily, k měření bylo použito 96 jedinců ve 2 opakováních. Probouzení drozofil s utlumenou expresí genu *Impl2* specificky v hemocytech proběhlo signifikantně dříve, hladina významnosti $p < 0,001$. V porovnání kontrol dochází opět k signifikantnímu posunu, kdy se drozofily nesoucí Hml Gal4Gal80 driver probouzí významně dříve, $p < 0,001$. K výpočtu signifikancí byl použit Two-way ANOVA test s pomocí Tukey multiple comparison testu.

Měření probuzení z chladem indukovaného kómatu probíhalo během 90 minut od přesunutí vzorků v 96 jamkové destičce do pokojové teploty. Drozofily, které ani po 90 minutách nevykazovaly náznaky pohybu, byly počítány jako mrtvé. Na ose X jsou vyneseny jednotlivé měřené genotypy, na ose Y je zaznamenán čas postavení se na nohy v minutách.

Oproti kontrolním drozofilám se jedinci s *Impl2* RNA interferencí probouzelí z chladem indukovaného kómatu signifikantně dříve ($p < 0,001$). Rovněž časový rozptyl probouzení byl u *Impl2* RNAi drozofil mnohem menší oproti kontrolám, u kterých se objevovaly rozdíly v probuzení i 50 minut. Při porovnání jednotlivých kontrol dochází obecně k posunu jedinců nesoucích Hml Gal4Gal80 driver směrem k dřívějšímu probuzení ($p < 0,001$).

Z výsledků souhrnně vyplývá, že k produkci genu *Impl2* dochází v hemocytech, a že tato produkce narůstá během bakteriální infekce nejen v celém těle drozofily, ale i specificky v imunitních buňkách. Zároveň se při RNA interferenci genu *Impl2* snižuje schopnost drozofily bojovat s infekcí, což je evidentní z křivky přežití infikovaných jedinců. Rozdíly v množství bakterií (CFU) v drozofilách po infekci nevyšly signifikantně a pro posouzení efektivity fagocytózy je nutné provést do budoucna další měření, popřípadě upravit experimentální design. Účinky genu *Impl2* ovlivňují systemické metabolické změny během infekce, protože při jeho utlumení nedošlo u drozofil ke zvýšení hladiny glukózy a ke snížení hladiny glykogenu, které bylo pozorováno u drozofil s normální produkcí genu *Impl2*. Při probouzení se z chladem indukovaného kómatu se drozofily s utlumenou produkcí probouzely dříve než jedinci, u nichž se gen *Impl2* produkoval běžným způsobem.

Hemocytově specifické ovlivnění produkce genu *Impl2* naznačuje, že je tento gen v hemocytech produkován i během jiných stresových podmínek, než je bakteriální infekce. Příkladem dalších pozorování produkce genu *Impl2* v hemocytech je kromě chladem indukovaného kómatu například i chov drozofil na vysokotučné dietě. Další potenciální možností by mohlo být i hladovění či hypoxie. V budoucnu se proto exprese genu *Impl2* bude pozorovat i v těchto podmínkách.

5. DISKUZE

Energetická náročnost aktivované imunitní odpovědi je značná, a proto se energie potřebná pro imunitní buňky musí uspořít omezením spotřeby ostatními tkáněmi. Po uvolnění zásobáren energie z glykogenu je cirkulující glukóza v hemolymfě dostupná pro všechny tkáně, proto je třeba u neimunitních tkání indukovat inzulinovou rezistenci, která ponechá glukózu volně k dispozici pro hemocyty. Tento signál pro neimunitní tkáně musí být produkován aktivovanými hemocyty a podmiňovat systemické metabolické změny v organismu, které lze přirovnat k warburg efektu. Jednou ze signálních molekul, způsobujících tyto metabolické změny v organismu, je extracelulární adenosin (Bajgar et al., 2015). Na základě charakterizace efektů, které gen *Impl2* indukuje při jeho produkci během hladovění (Honegger et al., 2008), poškození mitochondrií (Owusu-Ansah, Song and Perrimon, 2013) a rakoviny (Figueroa-Clarevaga and Bilder, 2016; Kwon et al., 2015), se tento gen jevil jako ideální kandidát na další signální molekulu, která je během infekce produkována v hemocytech a způsobuje v organismu identické metabolické projevy. Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat roli genu *Impl2* během aktivované imunitní odpovědi a posoudit jeho vliv na systemické metabolické změny, které bakteriální infekci doprovází.

5.1 Produkce genu *Impl2* v imunitních buňkách

Systemické metabolické změny doprovázející imunitní odpověď v organismu nastávají po aktivaci imunitních buněk, které se v organismu jako první setkávají s patogenem a regulují intenzitu imunitní odpovědi pomocí cytokinů a chemokinů (Lemaitre and Hoffman, 2007). Je tudíž logické, aby byly tyto metabolické změny aktivovanými imunitními buňkami podmíněny, to znamená, že signální molekula indukující tyto metabolické změny by měla být produkována specificky v aktivovaných imunitních buňkách. V dosud dostupné literatuře je dokázáno, že gen *Impl2* se v organismu produkuje při hladovění v tukovém tělese (Honegger et al., 2008), při indukci rakoviny v proliferujících buňkách (Figuroa-Clarevaga and Bilder, 2016; Kwon et al., 2015), či při poškození mitochondrií ve svalových buňkách (Owusu-Ansah, Song and Perrimon, 2013). Zároveň byla v dospělé drozofile pozorována produkce genu *Impl2* v aortě a srdci (Honegger et al., 2008), či v hlavové části drozofily (Aradska et al., 2015). Ovšem dosud nikdy nebyla zkoumána produkce genu *Impl2* specificky hemocyty.

Dosud známými rolemi hemocytů při imunitní aktivaci jsou především fagocytóza (Royet et al., 2003), produkce cytokinů a AMPs (Lemaitre and Hoffman, 2007) a produkce adenosinu (Doležal, 2015).

Při získávání odpovědi na otázku, zda gen *Impl2* slouží jako signální molekula pro indukci systemických metabolických změn, jsem nejprve ověřovala, zda dochází k jeho produkci během imunitní reakce. Jasným ukazatelem produkce tohoto genu byly metabolické změny pozorované v hemocytech (Bajgar and Krejčová, unpublished), společně s aktivací Hif1a a HRE DNA elementu. Právě Hif1a – HRE signalizační kaskáda je zodpovědná za regulaci exprese mnoha genů a v souvislosti s hypoxií byla identifikována jako regulátor exprese genu *Impl2* (Allee, J., 2011; Li et al., 2013). Ostatní experimenty prováděné v naší laboratoři naznačují, že dochází k aktivaci Hif1a-HRE signalizační kaskády v hemocytech během bakteriální infekce a společně se vztahem této kaskády ke genu *Impl2* během hypoxie nás tyto poznatky opět přivedly k myšlence, že právě gen *Impl2* by mohl být jednou z dalších signálních molekul, ovlivňujících systemické metabolické změny doprovázející bakteriální infekci.

Z obrázku č. 3 vyplývá, že během streptokokové infekce dochází k zvýšení produkce genu *Impl2*, vizualizovaného pro tyto účely fluorescenčním proteinem mCherry produkovaným pod přirozeným promotorem genu *Impl2*.

Rovněž místa produkce genu *Impl2* na snímcích z konfokálního mikroskopu odpovídají charakteristice míst výskytu hemocytů v hrudní oblasti drozofily.

Výsledky získané vizualizací místa produkce genu *Impl2* jsem se rozhodla kvantifikovat, viz graf číslo 1. Z grafu je evidentní, že počet hemocytů produkujících gen *Impl2* během infekce narůstá. Díky této kvantifikaci se potvrzuje předpoklad, že k produkci genu *Impl2* dochází i v hemocytech, a zároveň nám výsledky naznačují, že tato produkce narůstá v případě aktivace hemocytů při bakteriální infekci. To, že produkce genu *Impl2* je řízena specificky hemocyty, naznačuje jeho roli pro imunitní aktivaci a zapadá tedy do konceptu sobeckosti imunitních buněk vzhledem k ostatním tkáním. Produkce genu *Impl2* specificky imunitními buňkami ukazuje na výhodnost jeho účinků pro tyto imunitní buňky, což celkově podporuje naši původní hypotézu. Dalším navazujícím krokem proto bylo kvantifikovat dynamičnost produkce genu *Impl2*, čili jak přesně produkce genu *Impl2* narůstá během bakteriální infekce.

5.2 Zvýšení hladiny produkce genu *Impl2* během bakteriální infekce

Během ostatních experimentálně ověřených případů produkce genu *Impl2* docházelo ke zvyšování této produkce během přetrvávajícího stresu. Honegger a kol. prokázal, že k expresi genu *Impl2* nedochází u drozofilích larev krmených normální dietou, avšak u larev se sníženou nutriční hodnotou diety produkce genu *Impl2* narůstá (2008). V případě transplantace imaginálních disků, ve kterých byla indukována rakovina, je rovněž signifikantně zvýšena exprese genu *Impl2* v těchto nádorech (Figuroa-Clarevaga and Bilder, 2016). Růst exprese genu *Impl2* byl rovněž zaznamenán během poškození mitochondrií (Owusu-Ansah, Song and Perrimon, 2013) a zvýšené proliferace kmenových střevních buněk (Kwon et al., 2015). Na základě těchto publikovaných výsledků jsem očekávala, že produkce genu *Impl2* bude narůstat i v hemocytech během bakteriální infekce. Již výsledky v grafu č. 1 naznačily, že produkce genu *Impl2* se během infekce zvyšuje. Pro kvantifikaci této produkce během infekce v kontrastu s neinfikovanými drozofilami jsem měřila hladinu exprese genu *Impl2* v drozofilách infikovaných streptokokem a drozofilách kontrolních.

Z grafu číslo 2 je patrné, že hladina exprese genu *Impl2* je vyšší u drozofil infikovaných streptokokem oproti drozofilám kontrolním. Vzhledem k tomu, že gen *Impl2* je v drozofile produkován i jinými buňkami, než hemocyty, například v aortě a v srdci (Honegger et al., 2008), či v hlavové části (Aradská et al., 2015), bylo potřeba odstranit potencionální zkreslení výsledků, které mohlo být způsobeno odlišným místem produkce genu *Impl2*. Za tímto účelem jsem pomocí metody FACS vysortovala hemocyty a následně změřila produkci genu *Impl2* přímo v nich. Při porovnání grafu číslo 2 a 3 je evidentní, že produkce genu *Impl2* v hemocytech probíhá v mnohem větším měřítku, než produkce tohoto genu při kvantifikaci hodnot pro celé tělo. Tím, že produkce v hemocytech narůstá po bakteriální infekci, se podařilo odstínit vlivy produkce genu *Impl2* v jiných tkáních, potvrdit, že exprese genu probíhá specificky v hemocytech během bakteriální infekce, a současně definovat nárůst této produkce oproti běžnému stavu bez infekce.

Z tohoto tvrzení můžeme vyvodit několik důležitých faktů, které nasměrovaly následující kroky této práce. Pokud dochází k produkci genu *Impl2* během bakteriální infekce v hemocytech, znamená to, že účinek tohoto genu je pro efektivní průběh boje s touto infekcí důležitý.

Díky tomu, že imunitní aktivace je energeticky náročná (Unckless, Rottschaefer and Lazzaro, 2015), největší důležitost pro imunitní buňky představuje dostatek energie. Z toho vyplývá, že gen *Impl2*, jehož produkci hemocyty považují za důležitou během infekce, má pravděpodobně schopnost ovlivnit množství energie, které je k dispozici pro hemocyty. Pokud buňky tuto energii nemají, je imunitní reakce nedostatečná a organismus s patogenem nedovede bojovat (Bajgar et al., 2015). Následujícím krokem proto bylo posoudit důležitost genu *Impl2* během bakteriální infekce.

5.3 Důležitost genu *Impl2* pro boj s patogenem

Důležitost genu *Impl2* byla již experimentálně prokázána například během hladovění, kdy drozofily se znemožněnou produkcí tohoto genu vykazovali rapidně zvýšenou mortalitu při vystavení vlivu diety s 1% glukózy či jen PBS po dobu 24 hodin (Honegger et al., 2008). Obecně je produkce genu *Impl2* nezbytná v případech vystavení organismu stresu, který kromě hladovění představuje třeba právě bakteriální infekce. Snížená křivka přežití jedinců se znemožněnou produkcí genu *Impl2* během bakteriální infekce (viz graf 5), je v souladu s těmito předpoklady a naznačuje důležitost zkoumaného genu během imunitní aktivity.

K posouzení účinnosti RNAi se využila metoda měření relativní exprese genu *Impl2* u kontrolních i mutantních linií drozofil. Protože jsou hladiny genu *Impl2* u mutantních drozofil nižší než u drozofil kontrolních, můžeme tuto RNA interferenci považovat za funkční.

Pro interpretaci toho, v čem důležitost genu *Impl2* pro imunitní odpověď spočívá, je nutné dopředu předjímat jeho účinky. Gen *Impl2* se extracelulárně váže na *Dipl2* a tím tlumí inzulinovou signalizaci. V běžném stavu organismu není nezbytné tuto signalizaci tlumit, proto jedinci s RNAi genu *Impl2* v dospělém stadiu nevykazovali letalitu (Andersen et al., 2000). Ovšem u infikovaných jedinců jsou běžně pozorovány metabolické výkyvy v hladinách glukózy a glykogenu (Govind, 2008), které jsou známkou změn v inzulinové signalizaci. Utlumením exprese genu *Impl2* znemožníme drozofily efektivně regulovat svůj metabolismus, což může mít za následek vysokou úmrtnost, znázorněnou v grafu číslo 5. Dle našeho názoru může být snížená křivka přežití zdůvodněna dvěma způsoby. První hypotézou je samotná imunitní reakce, která je pro organismus natolik vysilující, že umírá.

Druhou hypotézou je potom nedostatečná aktivace imunitních buněk, výsledkem které je neefektivní boj s patogenem. Tyto hypotézy jsme se rozhodli ověřit změřením množství bakteriálních kolonií v jedinci po infekci.

Pomocí metody CFU jsem v grafu číslo 6 kvantifikovala množství bakterií v jedinci s utlumenou produkcí genu *Impl2* v porovnání s kontrolní drozofilou. Výsledky tohoto měření bohužel byly pouze na hranici signifikance, a pro potvrzení této hypotézy by bylo třeba provést dodatečná měření na větším množství drozofil, popřípadě i experimentálně zvýšit a snížit dávku bakterií a sledovat, jak se změní hladina CFU.

Teoreticky se přikláníme spíše k hypotéze, že při tlumení signálu produkovaného genem *Impl2* se imunitní buňky nedostatečně aktivují a jedinec umírá kvůli neefektivnímu boji s infekcí. Tyto výsledky by rovněž korelovaly s výsledky utlumení produkce extracelulárního adenosinu - další signální molekuly, účastnící se metabolických změn během infekce parazitickou vosou (Bajgar et al., 2015). Zobecněním těchto hypotetických výsledků bychom mohli předpokládat, že při nedostatečné aktivaci imunitních buněk se mohou bakterie v organismu lépe množit, a počet jejich kolonií následně naroste v porovnání s jedinci, jejichž imunitní aktivace byla dostatečná. Tyto výsledky by rovněž byly v souladu s charakteristikou metabolických výkyvů při infekci (Govind, 2008), kdy zvýšená hladina glukózy představuje energii pro aktivaci imunitních buněk, a pokud je toto zvýšení glukózy znemožněno, nedostatečně aktivované buňky nezabrání bakteriím se dále množit.

Existence několika typů signálních molekul pro systemické metabolické změny, jako je adenosin a gen *Impl2*, se může zdát pro organismus nadbytečná, nicméně předpokládáme, že tyto signální molekuly mohou účinkovat na jiné úrovni či v jiném čase, a počet dosud objevených signálních molekul pravděpodobně vzhledem ke komplexitě systemické metabolické reakce na infekci nebude konečný. Pokusy s infekcí *Mycobacterium marinum* například ukazují, že k systemické metabolické změny, pozorované při expresi genu *Impl2*, jsou u drozofil v tomto případě spouštěny utlumením efektorové kinázy inzulinové signalizace AKT (Dionne et al., 2006). Díky těmto výsledkům věříme, že typické systemické metabolické změny doprovázející bakteriální infekci jsou v organismu indukovány mnoha různými způsoby a teorie sobeckého imunitního systému může být tudíž zobecněna na všechny do budoucna identifikované signální molekuly.

5.4 Vliv genu *Impl2* na systemické metabolické změny během infekce

Systemické metabolické změny během infekce představují především zvýšení hladiny volně cirkulující glukózy a snížení hladiny glykogenu (Govind, 2008). Metabolismus sacharidů v těle je regulován inzulínem, jehož signalizaci lze řídit pomocí genu *Impl2* (Andersen et al., 2000). Zároveň víme, že gen *Impl2* ovlivňuje hladinu trehalózy (Figuroa-Clarevaga and Bilder, 2016) a glukózy (Kwon et al., 2015) během rakoviny. Proto jsme zkoumali, jak gen *Impl2* ovlivňuje hladinu glukózy a glykogenu během bakteriální infekce. Na rozdíl od experimentálních pokusů s genem *Impl2* ve zmíněných publikacích není tento gen v mých pokusech upregulován, ale pouze utlumován, takže výsledné metabolické výkyvy nebudou tak silné, jako ve výsledcích těchto publikací. Výhodou mých pokusů je především mnohem přirozenější model, zkoumající reálnou míru produkce genu *Impl2* a její účinky v organismu. V grafech 7 a 8 lze nicméně i přes relativně nižší hladinu exprese genu *Impl2* pozorovat tendenci kontrolních linií navýšit množství volně cirkulující glukózy, sloužící jako energie pro imunitní buňky, za současného snížení hladiny glykogenu, ze kterého je glukóza přeměňována. Tyto změny hladin metabolitů jsou realizovány pomocí glykogen-fosforylázy (Reyes-DelaTorre, Peña-Rangel, Riesgo-Escovar, 2012), hemocyty následně zapříčiní inzulínovou rezistenci neimunitních tkání a způsobí, že glukóza do buněk nemůže proniknout a zůstane volně cirkulovat v hemolymfě k dispozici pro hemocyty (Bajgar et al., 2015). Tento jev byl pozorován u kontrolních drozofil v grafech 7 a 8, ovšem drozofily s RNA interferencí genu *Impl2* žádné výkyvy v hladinách metabolitů nevykazovaly. Tato neměnnost metabolických křivek u RNAi mutantů pro gen *Impl2* může být vysvětlena dvěma způsoby.

Jednou z možností je, že v mutantních liniích nedojde k aktivaci imunitních buněk pomocí genu *Impl2*, tím pádem nedojde v těle drozofily k požadavku na vyšší hladinu glukózy jako energie pro imunitní reakci a metabolismus mutantní drozofily tudíž pracuje stejně jako v běžném režimu. Hladina glukózy i glykogenu zůstávají nezměněné od běžné hladiny těchto metabolitů v těle. Druhou možností je, že gen *Impl2* ovlivňuje i produkci glykogen-fosforylázy, zodpovědné za rozklad glykogenu na glukózu. Tím by se vysvětlila nesnižující se hladina glykogenu v mutantních liniích, která by v opačném případě byla konstantně spotřebovávána na tvorbu glukózy i pro tkáně, které jsou díky genu *Impl2* běžně rezistentní vůči inzulínu. K ověření těchto dvou hypotéz by se v budoucnu dalo změřit množství glykogen-fosforylázy v liniích s RNA interferencí genu *Impl2* oproti liniím kontrolním.

5.5 Role genu *Impl2* během probouzení se z chladem indukovaného kómatu (CCR)

Během stresu indukovaného chladem se drozofily snaží do poslední chvíle investovat energii především do udržení membránového potenciálu buněk (Chen and Walker, 1993). V okamžiku, kdy tento potenciál není již dále udržitelný, upadá drozofila do kómatu, které je po určitou dobu reverzibilní. Rychlost probuzení se z tohoto kómatu je přímo úměrná rychlosti, kterou dovede drozofila rozložit glykogen na glukózu a tuto glukózu transportovat do svalů (Chen and Walker, 1994). Probuzení z kómatu je tedy závislé na dvou procesech – rozkladu glykogenu na glukózu a aktivaci inzulínové signalizace, aby glukóza mohla vstoupit do svalových buněk. Experimentální pokusy vystavení drozofily teplotě -2°C po dobu 2 hodin ústily v probuzení těchto drozofil po přibližně 8,3 minutách (Andersen et al., 2014). Tato rychlost u kontrolních drozofil v našich experimentech odpovídá dle grafu 9 přibližně 40 – 50 minutám po přemístění do pokojové teploty. Odlišnost našeho měření od předchozího experimentu je pravděpodobně způsobena delší lhůtou vystavení drozofil chladu (16 hodin) a rovněž nulovou dietou, která u drozofil způsobí mírné utlumení inzulínové signalizace.

Dostatečné energetické zásoby ve formě glykogenu a produkce inzulínu, který umožňuje vstup této energie do buněk, urychlují probuzení z chladem indukovaného kómatu (Linderman et al., 2012). Protože u kontrolních drozofil je účinek inzulínu blokován genem *Impl2*, probuzení se z chladem indukovaného kómatu je pomalejší než u drozofil, jejichž produkce genu *Impl2* je utlumená (viz graf 9). Při utlumení produkce genu *Impl2* nedojde k jeho vazbě na Dilp2 a zpomalení inzulínové signalizace. Glukóza se tak do svalových buněk dostane rychleji. Rozdíl v těchto časech probuzení je průměrně 5 minut. Na základě těchto výsledků se domníváme, že gen *Impl2* neovlivňuje rozklad glykogenu na glukózu, ale pouze aktivaci inzulínové signalizace. Kontrolní drozofily by tudíž měly dostatečnou hladinu volně cirkulující glukózy, ale tato glukóza by se do svalů dostávala kvůli genu *Impl2* pomaleji. Protože se ovšem hladina glykogenu, která by měla být spotřebována na tvorbu glukózy, během infekce u předchozích experimentů v *Impl2* RNAi drozofilách neměnila, můžeme usuzovat, že gen *Impl2* neovlivňuje produkci glykogenfosforylázy, což je v nesouladu s předchozí hypotézou. Do budoucna jsou třeba další pokusy na objasnění přesného mechanismu účinku genu *Impl2* na systemický metabolismus. Jednou z možností je například změření hladiny glykogenfosforylázy, zodpovědné za rozklad glykogenu na glukózu, u kontrolních drozofil a drozofil s RNA interferencí genu *Impl2*.

Pokud by tato hladina u drozofil s RNAi genu *Impl2* odpovídala hladině u kontrolních drozofil, mohli bychom s jistotou říci, že gen *Impl2* neovlivňuje hladinu glykogen-fosforylázy, a tím pádem imunitní buňky těchto mutantů infekci dostatečně nerozpoznají a jejich metabolismus pracuje jako při běžném, bezinfekčním režimu. Zároveň bychom mohli experimentálně prověřit identické pokusy při chovu drozofil na běžné dietě s obsahem cukru. V tomto případě by bylo možné, že některé z výsledných efektů by se u drozofil na normální dietě neprojevovaly, stejně jako v případě extracelulárního adenosinu, a úmrtnost experimentálních linií drozofil by poté jasněji odlišila vliv nutričních od vlivu samotného genu *Impl2* (Bajgar et al., 2015).

Pro úplné objasnění mechanismu funkce genu *Impl2* dále navrhuji zejména experimentální ověření jeho možné regulace pomocí Hif1a-HRE signální kaskády. Pro zhodnocení různých variant stresových faktorů je možné testovat produkci genu *Impl2* v reakci na vysokotučnou dietu, hypoxii, popřípadě zkombinovat bakteriální infekci drozofily s běžnou dietou s obsahem cukru a sledovat rozdíly ve schopnosti s touto infekcí bojovat. Pro doplnění dat charakterizujících efektivitu fagocytózy by bylo vhodné zopakovat měření počtu bakteriálních kolonií s vyšším množstvím testovaných drozofil, popřípadě experimentálně upravit dávku bakterií injikovanou do drozofil. Vliv utlumení genu *Impl2* na změny hladin glykogenu a glukózy doporučuji dále rozpracovat pomocí měření glykogen-fosforylázy u jedinců s RNA interferencí genu *Impl2* a jedinců kontrolních. Po propojení všech budoucích experimentálních poznatků s těmi, které byly již ověřeny, tak získáme ucelenou teorii sobeckého imunitního systému, která by se v budoucnu mohla aplikovat nejen na drozofilu, ale i na savce a člověka.

6. ZÁVĚR

Z experimentálních výsledků této práce vyplývá, že gen *Impl2* se účastní metabolických změn doprovázejících bakteriální infekci v *Drosophila melanogaster*. Tento gen je v organismu za různých podmínek produkován různými tkáněmi, v případě bakteriální infekce dochází k jeho zvýšené produkci v hemocytech. Díky svému vlivu na systemické metabolické změny hladin glukózy a glykogenu, nezbytné pro správný průběh imunitní reakce, se tento gen stává významným nejen, co se týče pochopení metabolismu drozofily, ale zároveň se stává důležitým modelem pro zkoumání metabolických pochodů doprovázejících infekci savců a člověka. Z výsledků vyplývá, že gen *Impl2* zapříčiňuje inzulinovou rezistenci neimunitních tkání, není ovšem jisté, jestli má přímý vliv i na syntézu glukózy z glykogenu, a proto jsou potřeba dodatečné experimenty, které pomohou objasnit jeho fungování. Celkově je ovšem gen *Impl2* vynikajícím kandidátem na další signální molekulu sobeckého imunitního systému, jehož teoretický koncept by do budoucna mohl být zobecněn nejen pro adenosin, ale i pro další potenciální signální molekuly, například pro gen *Impl2*.

Rovněž se zatím neví, jakým způsobem je v hemocytech produkce genu *Impl2* regulována, a odpověď na tuto otázku by mohla vnést světlo i do mechanismů inzulinové rezistence u člověka, pozorované například během autoimunitního onemocnění *Diabetes mellitus II*, kardiovaskulárních poruch, či různých typů rakoviny.

7. LITERATURA

Abrams, J., White, K., Fessler, L., Steller, H. 1993. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development*. 117: 29-43.

Adams, M., Celniker, S., Holt, R., Evans, C., Gocayne, J., Amantides, P., ... Venter, J. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*. 287 (5461): 2185-95.

Allee, J. 2011. *Impl2* represses insulin signalling in response to hypoxia. Dissertation thesis. University of Oregon. Staženo z: scholarsbank.uoregon.edu.

Anderl, I., Vesala, L., Ihalainen, I., Vanha-aho, L., Andó, I., Rämetsä, M., Hultmark, D. 2016. Transdifferentiation and proliferation in two distinct hemocyte lineages in *Drosophila melanogaster* Larvae after wasp infection. *PLoS Pathog*. 12(7): e1005746.

Andersen, A., Hertz Hansen, H., Schäffer, L., Kristiansen, C. 2000. A new secreted insect protein belonging to the immunoglobulin superfamily binds insulin and related peptides and inhibits their activities. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 16948-53.

Andersen, J., Manenti, T., Sørensen, J., MacMillan, H., Loeschcke, V., Overgaard, J. 2014. How to assess *Drosophila* cold tolerance: chill coma temperature and lower lethal temperature are the best predictors of cold distribution limits. *Functional Ecology*. 29(1): 55-65.

Aradská, J., Bulat, T., Sialana, F., Birner-Gruenberger, R., Erich, B., Lubec, G. 2015. Gel-free mass spectrometry analysis of *Drosophila melanogaster* heads. *Proteomics*. 15(19): 3356-60.

Arrese, E., Soulages, J. 2010. Insect fat body: energy, metabolism and regulation. *Annual Review Entomology*. 55: 207-25.

Bajgar, A., Doležal, T. Extracellular adenosine modulates host-pathogen interactions through regulation of systemic metabolism during immune response in *Drosophila*. Unpublished

Bajgar, A., Kucerova, K., Jonatova, L., Tomcala, A., Schneedorferova, I., Okrouhlik, J., Doležal, T. 2015. Extracellular adenosine mediates a systemic metabolic immune response. *PLoS Biol*. 13(4): e1002135.

- Blumenthal, S. 2010. Perspectives in biology and medicine. 53: 491-508.
- Bours, M.J., Swennen, E.L., Di Virgilio, F., Cronstein, B.N., Dagnelie, P.C. 2006. Adenosine 5'-triphosphate and adenosine as endogenous signalling molecules in immunity and inflammation. *Pharmacol Ther.* 112(2):358-404.
- Brand, A., Perrimon, N. 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and dominant phenotypes. *Development.* 118: 400-15.
- Buchon, N., Silverman, N., Cherry, S. 2014. Immunity in *Drosophila melanogaster*- from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature Reviews Immunology.* 14(12): 796-810.
- Cammarato, A., Ahrens, C., Alayari, N., Qeli, E., Rucker, J., Reedy, M., ... Foster, D. 2011. A mighty small heart: The cardiac proteome of adult *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE.* 6(4): e18479.
- Crozatier, M., Meister, M. 2007. *Drosophila* haematopoiesis. *Cell. Microbiol.* 9: 1117-26.
- David, J., Gibert, P., Pla, E., Petavy, G., Karan, D., Moreteau, B. 1998. Cold stress tolerance in *Drosophila*: Analysis of Chill-Coma Recovery in *D. melanogaster*. *Journal of Thermal Biology.* 23: 291-99.
- Defaye, A., Evans, I., Crozatier, M., Wood, W., Lemaitre, B., Leulier, F. 2009. Genetic ablation of *Drosophila* phagocytes reveals their contribution to both development and resistance to bacterial infection. *Journal of Innate Immun.* 1: 322-34.
- Delmastro-Greenwood, M., Piagenelli, J. 2013. Changing the energy of an immune response. *Am. Journal of Clinical Experimental Immunology.* 2(1): 30-54.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K., Barinova, Y., Fellner, M., ... Dickson, B. 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature.* 448(7150): 151-56.
- Dionne, M., Pham, L., Shirasu-Hiza, M., Schneider, D. 2006. Akt and FOXO dysregulation contribute to infection-induced wasting in *Drosophila*. *Current Biology.* 16(20): 1977-85.
- Doležal, T. 2015. Adenosine: a selfish-immunity signal? *Oncotarget.* 6: 32307-08.

- Droujinine, I., Perrimon, N. 2016. Interorgan communication pathways in physiology: focus on *Drosophila*. Annual Rev. Genetics. 50: 24.1-24.32.
- Figuroa-Clarevaga, A., Bilder, D. 2015. Malignant *Drosophila* tumours interrupt insulin signalling to induce cachexia-like wasting. Developmental Cell. 33: 47-55.
- Fischer, J., Giniger, E., Maniatis, T., Ptashne, M. 1988. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. Nature. 332: 853-56.
- Garbe, J., Yang, E., Fristrom, J. 1993. IMP-L2: an essential secreted immunoglobulin family member implicated in neural and ectodermal development in *Drosophila*. Development. 119: 1237-50).
- Govind, S. 2008. Innate immunity in *Drosophila*: Pathogens and Pathways. Insect Science. 15(1): 29-43.
- Gosh, S., Singh, A., Mandal, S., Mandal, L. 2015. Active hematopoietic hubs in *Drosophila* adults generate hemocytes and contribute to immune response. Develop. Cell. 33(4): 478-88.
- Georgel, P., Naitza, S., Kappler, C., Ferrandon, D., Zachary, D., Swimmer, C.,...Hoffman, J. 2001. *Drosophila* immune deficiency (IMD) is a death domain protein that activates antibacterial defense and can promote apoptosis. Developmental Cell. 1: 503-14.
- Gregorio, E., Spellman, P., Lemaitre, B. 2002. The Toll and Imd pathways are the major regulators of the immunity response in *Drosophila*. EMBO J. 21(11): 2568-79.
- Haselton, A., Fridell, Y. 2010. Adult *Drosophila melanogaster* as a model for the study of glucose homeostasis. Aging. 2(8): 523-26.
- Hoffman, J., Reichhart, J. 2002. *Drosophila* innate immunity: an evolutionary perspective. Nature Immunology. 3: 121-26.
- Honegger, B., Galic, M., Köhler, K., Wittwer, F., Brogiolo, W., Hafen, E., Stocker, H. 2008. Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signalling in *Drosophila* and is essential for starvation resistance. Journal of Biology. 7(3): 10.
- Hotamisligil, G. 2006. Inflammation and metabolic disorders. Nature. 444: 860-867.

- Chen, C., Walker, V. 1993. Increase in cold-shock tolerance by selection of cold resistant lines in *Drosophila melanogaster*. *Ecological Entomology*. 18: 184-90.
- Chen, C., Walker, V. 1994. Cold-shock and chilling tolerance in *Drosophila*. *Journal of Insect Physiology*. 8: 661-69.
- Imler, L., Bulet, P. 2005. Antimicrobial peptides in *Drosophila*: structures, activities and gene regulation. *Chem. Immunol. Allergy*. 86: 1-21.
- Kavi, H., Fernandez, H., Xie, W., Birchler, J., 2005. RNA silencing in *Drosophila*. *FEBS Letters*. 579(26): 5940-49.
- Kim, L., Choi, U., Cho, H., Lee, J., Lee, W., Kim, J., Kyoungsook, J., Shim, J., Kim-Ha, J., Young-Joon, K. 2007. Down-regulation of NF- κ B targeted genes by the AP-1 and STAT complex during the innate response in *Drosophila*. *PLoS Biol*. 5(9): e238.
- Kwon, Y., Song, W., Droujinine, I., Hu, Y., Asara, J., Perrimon, N. 2015. Systemic organ wasting induced by localized expression of the secreted insulin/IGF antagonist *Impl2*. *Developmental Cell*. 33(1): 36-46.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., Meister, M. 2001. Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Dev. Biol*. 230(2): 243-57.
- Lee, T., Luo, L. 1999. Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron*. 22(3): 451-61.
- Lemaitre, B., Hoffman, J. 2007. The host defence of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*. 25: 697-743.
- Linderman, J., Chambers, M., Gupta, A., Schneider, D. 2012. Infection-related declines in Chill Coma Recovery and negative geotaxis in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*. 7(9): e41907.
- Linford, N., Bilgir, C., Ro, J., Pletcher, S. 2013. Measurement of lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Visualised Experiments*. 71: 50068.
- Li, Y., Padmanabha, D., Gentile, L., Dumur, C., Beckstead, R., Baker, K. 2013. HIF- and Non-HIF regulated hypoxic responses require the estrogen-related receptor in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*. 9(1): e1003230.

- Liu, Z., Butow, R. 2006. Mitochondrial retrograde signalling. *Annual Review Genetics*. 40: 159-85.
- Lund, V., DeLotto, R. 2011. Regulation of Toll and Toll-like receptor signalling by the endocytic pathway. *Small GTPases*. 2(2): 95-98.
- Makhijani, K., Alexander, B., Katja Brückner. 2011. The peripheral nervous system supports blood cell homing and survival in the *Drosophila* larva. *Development*. 138(24): 5379-91.
- Melcher, K., Xu, H. 2001. Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete GAL gene repression. *EMBO Journal*. 20(4): 841-51.
- Natali, A., Bonadonna, R., Santoro, D., Galvan, A., Baldi, S., Frascerra, S., Palombo, C., Ghione, S., Ferrannini, E. 1994. Insulin resistance and vasodilatation in essential hypertension. Studies with adenosine. *Journal Clin. Invest*. 94(4): 1570-76.
- Neves, J., Zhu, J, Sousa-Victor, P., Konjikusic, M., Riley, R., Che, S., Qi, Y., Jasper, H., Lamba, D. 2016. Immune modulation by MANF promotes tissue repair and regenerative success in the retina. *Science*. 353(6294): aaf3646.
- Neyen, C., Bretscher, A., Binggeli, O., Lemaitre, B. 2014. Methods to study *Drosophila* immunity. *Methods*. 68(1): 116-28.
- Novák, M. Koh, T. 2013. Macrophage phenotypes during tissue repair. *Journal Leukoc. Biol*. 93(6): 875-81.
- Nováková, M., Doležal, T. 2011. Expression of *Drosophila* adenosine deaminase in immune cells during inflammatory response. *PLoS One*. 6(3): e17741.
- Owusu-Ansah, E., Banerjee, U. 2009. Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature*. 461 (7263): 537-41.
- Owusu-Ansah, E., Song, w., Perrimon, N. 2013. Muscle mitohormesis promotes longevity via systemic repression of insulin signalling. *Cell*. 155: 699-712.

- Reyes-DelaTorre, A., Peña-Rangel, M., Riesgo-Escovar, J. 2012. Carbohydrate metabolism in *Drosophila*: Reliance on the disaccharide trehalose. *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*, Prof. Chuan-Fa Chang (Ed.), InTech.
- Roote, J., Prokop, A. 2013. How to design a genetic mating scheme: A basic training package for *Drosophila* genetics. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 3(2): 353-58.
- Royet, J., Meister, M., Ferrandon, D. 2003. Humoral and Cellular Responses in *Drosophila* Innate Immunity. 137-53 In: Ezekowitz R.A.B., Hoffmann J.A. (eds) *Innate Immunity. Infectious Disease*. Humana Press, Totowa, NJ.
- Schieber, M., Chandel, N. 2014. ROS function in redox signalling and oxidative stress. *Current Biology*. 24(10): R453-62.
- Shimkets, L., Dworkin, M. 1981. Excreted adenosine is a cell density signal for the initiation of fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Developmental Biol.* 84: 51-60.
- Shine, I., Wrobel, S. 1976. *Thomas Hunt Morgan: Pioneer of Genetics*. 1: 1-188. University Press of Kentucky, JSTOR.
- Straub, H. 2014. Insulin resistance, selfish brain, and selfish immune system: an evolutionarily positively selected program used in chronic inflammatory diseases. *Arthritis Research & Therapy*. 16: S4.
- Steele, J. 1982. Glycogen phosphorylase in insects. *Insect Biochemistry*. 12(2): 131-47.
- Suster, M., Seugnet, L., Bate, M., Sokolowki, M. 2004. Refining GAL4-driven transgene expression in *Drosophila* with a GAL80 enhancer-trap. *Genesis*. 39(4):240-45.
- Unckless, R., Rottschaefer, S., Lazzaro, B. 2015. The complex contributions of genetics and nutrition to immunity in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*. 11(3): e1005030.
- Yegutkin, G. 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1783(5): 159-66.

Wang, L., Kounatidis, I., Ligoxygakis, P. 2014. *Drosophila* as a model to study the role of blood cells in inflammation, innate immunity and cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiol.* 3: 113.

Wang, Y., Zhong, Y. 2004. TARGETing "When" and "Where". *Science's STKE.* 220: pe5.

Zeidler, M., Tan, C., Bellaiche, Y., Cherry, S., Häder, S., Gayko, U., Perrimon, N. 2004. Temperature-sensitive control of protein activity by conditionally splicing inteins. *Nature Biotechnology.* 22(7): 871-76.