

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Důležitost systemické inzulinové rezistence pro imunitní  
odpověď**

Diplomová práce

**Bc. Lukáš Strych**

Školitel: doc. Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.

České Budějovice 2021

Strych, L., 2021: Důležitost systemické inzulínové rezistence pro imunitní odpověď. [The importance of systemic insulin resistance for an immune response . Mgr. Thesis, in Czech] – 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The aim of this thesis was to study insulin resistance in larval peripheral tissues of *Drosophila melanogaster* upon the infection by parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*. Firstly, the state of the insulin signalling during the immune response was analysed by measuring gene expression and phosphorylation of Akt. Subsequently, the importance of insulin resistance in peripheral tissues for the effectivity of the immune response was tested. The effect of Jak-Stat signalling on inducing insulin resistance in larval muscle was evaluated as well.

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

V Klenové, 5. 4. 2021

.....

Bc. Lukáš Strych

## **Poděkování**

V první řadě bych rád poděkoval svému školiteli doc. Mgr. Tomášovi Doležalovi, Ph.D. za výborné vedení mé diplomové práce a možnosti zhotovit diplomovou práci v jeho Laboratoři molekulární interaktivní fyziologie drozofily. Dále bych rád poděkoval všem členům této laboratoře za vytvoření přátelského kolektivu a za ochotu vždy poradit a pomoci. Děkuji také prof. RNDr. Markovi Jindrovi, CSc. za umožnění provést western bloty v jeho Laboratoři vývojové genetiky. Z jeho týmu děkuji zejména Mgr. Lence Bittové, Ph.D. za poskytnutí užitečných praktických rad ohledně Western blotting.

## Seznam použitých zkratek

**4E-BP** = represor iniciace translace, 4E-binding protein

**Akt** = proteinkináza B

**AMPs** = antimikrobiální peptidy

**BCA** = kyselina bicinchoninová

**BSA** = hovězí sérový albumin

**cDNA** = komplementární DNA

**Ct** = Cycle threshold

**DEPC H<sub>2</sub>O** = Diethyl pyrocarbonate treated H<sub>2</sub>O

**Dilps** = Drosophila insulin-like peptides

**dNTP** = deoxinukleotid trifosfát

**dsRNA** = dvojitá RNA

**EDTA** = kyselina ethylendiamintetraoctová

**Eiger** = bezbratřový ortolog tumor necrosis factor (TNF)

**FOXO** = Forkhead Box O

**Gal4** = transkripční aktivátor vázající se na UAS (upstream activation sequence)

**Gal80** = negativní regulátor transkripčního aktivátoru Gal4

**GFP** = zelený fluorescenční protein

**hpi** = hodiny po infekci

**HRP** = křemenná peroxidáza

**Chico** = substrát inzulínového receptoru

**IMD** = Immunodeficiency

**InR** = inzulínový receptor

**InR<sup>CA</sup>** = konstitutivně aktivní forma inzulínového receptoru

**IPCs** = inzulín produkující buňky

**IR** = inzulínová rezistence

**IS** = inzulínová signalizace

**Jak** = Janus kinases

**JNK** = c-Jun N-terminal kinase

**Mef2** = Myocyte enhancer factor 2

**NF-κB** = nukleární faktor kappa B

**NlaZ** = Neural Lazarillo

**pAkt** = fosforylovaný Akt

**PBS** = fosfátový pufr

**q-RT-PCR** = kvantitativní real-time PCR

**RNAi** = RNA interference

**Rp49** = ribozomální protein 49

**SDS** = dodecylsírany sodný

**SDS-PAGE** = elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného

**Srp** = Serpent

**STAT** = signal transducer and activator of transcription proteins

**TRIP** = kontrolní linie k RNAi linii

**UAS** = upstream activation sequence

**Upd** = unpaired

**W** = white

## Obsah

1. Úvod .....	1
1.1. Modelový organismus <i>Drosophila melanogaster</i> .....	2
1.2. Imunitní systém u <i>Drosophila melanogaster</i> .....	4
1.2.1. Imunitní reakce proti parazitoidním vosičkám .....	5
1.3. Metabolický přesmyk při infekci u <i>Drosophila melanogaster</i> .....	6
1.4. Inzulínová signalizace u <i>Drosophila melanogaster</i> .....	9
1.4.1. Inzulínová signalizace a regulace metabolismu při imunitní reakci .....	11
1.4.2. Důležitost inzulínové signalizace pro imunitní reakci .....	14
2. Cíle práce .....	16
3. Materiál a metody .....	17
3.1. Chov a manipulace s octomilkou .....	17
3.2. Výchozí linie octomilek .....	18
3.3. Křížení .....	18
3.4. Infekce .....	20
3.5. Měření genové exprese .....	21
3.5.1. Příprava vzorků .....	21
3.5.2. Izolace RNA .....	21
3.5.3. Reverzní transkripce .....	22
3.5.4. q-RT-PCR .....	22
3.6. Detekce proteinů .....	23
3.6.1. Příprava vzorků .....	23
3.6.2. SDS-PAGE .....	24
3.6.3. Western blot .....	24
3.7. Počítání hemocytů .....	25
3.8. Statistika a zpracování dat. ....	26
4. Výsledky .....	27

4.1.	Inzulínová signalizace je potlačena ve svalech a tukovém tělese larev octomilek při infekci parazitoidní vosičkou <i>Leptopilina boulardi</i> .....	27
4.2.	Inzulínová signalizace je potlačena z důvodu vzniku inzulínové rezistence.....	30
4.3.	Inzulínové rezistence je důležitá v periferních tkáních pro efektivitu akutní imunitní odpovědi proti parazitoidní vosičce <i>Leptopilina boulardi</i> .....	31
4.4.	Vliv Jak-Stat signalizace na indukci inzulínové rezistence ve svalech při infekci parazitoidní vosičkou <i>Leptopilina boulardi</i> .....	33
5.	Diskuze .....	36
5.1.	Inzulínová signalizace je potlačena ve svalech a tukovém tělese larev octomilek při infekci parazitoidní vosičkou <i>Leptopilina boulardi</i> .....	36
5.2.	Inzulínová signalizace je potlačena z důvodu vzniku inzulínové rezistence.....	38
5.3.	Inzulínové rezistence je důležitá v periferních tkáních pro efektivitu akutní imunitní odpovědi proti parazitoidní vosičce <i>Leptopilina boulardi</i> .....	39
5.4.	Vliv Jak-Stat signalizace na indukci inzulínové rezistence ve svalech při infekci parazitoidní vosičkou <i>Leptopilina boulardi</i> .....	40
6.	Závěr.....	43
7.	Literatura .....	44
8.	Přílohy .....	54

## 1. Úvod

V posledních letech se začínají více studovat metabolické změny spojené s imunitní odpovědí, které však nejsou dostatečně prozkoumané. Pro studium regulace metabolismu při infekci se mimo jiné používá model octomilky *Drosophila melanogaster*, u kterého je dobře popsána imunitní reakce proti parazitoidním vosičkám, jako je *Leptopilina boulardi*. Právě na tomto modelu bylo zjištěno, že při infekci dochází k systemickému metabolickému přesmyku (Bajgar et al., 2015). Při systemickém přesmyku je potlačen přísun glukózy do periferních tkání za účelem zanechání více glukózy pro aktivované imunitní buňky. Předpokládá se, že důvodem potlačení přísunu glukózy do periferních tkání je snížení inzulínové signalizace, konkrétně vznik inzulínové rezistence. Cílem mé práce proto bylo s využitím zmíněného modelu zjistit, jestli snížení příjmu glukózy do periferních tkání je skutečně způsobeno vznikem inzulínové rezistence v těchto tkáních. Dalšími případnými cíli bylo zjistit důležitost inzulínové rezistence pro imunitní reakci, či jakými imunitními signalizacemi je inzulínová rezistence indukována. Jelikož jsou důležité mechanismy evolučně konzervované, získané informace mohou být cenným zdrojem i pro medicínu, kde je inzulínová rezistence hojně studována ve spojitosti s různými patologiemi.

Kapitoly v teoretické části diplomové práce budou shrnovat potřebné informace k pochopení následující praktické části. Nejdříve budou zmíněny informace o modelovém organismu (1.1.), jeho imunitním systému (1.2.), se zaměřením se na imunitní reakci proti parazitoidním vosičkám (1.2.1.), dále o změně metabolismu při infekci (1.3.) a na závěr o inzulínové signalizaci (1.4.), její roli (1.4.1.) a důležitosti (1.4.2.) v regulaci metabolismu při infekci.



### 1.1. Modelový organismus *Drosophila melanogaster*

Octomilka *Drosophila melanogaster* je hojně využívaným modelovým organismem pro řadu výhod, které poskytuje. Výhodami je snadný a levný chov, rychlá generační doba, produkce velké množství potomstva, široká škála dostupných genetických a molekulárních technik a jistá homologie k člověku.

Vývoj octomilky při standartní laboratorní teplotě 25 °C trvá přibližně 10 dní, ale pro experimentální účely se chovají i při nižší (18 °C) i vyšší (29 °C) teplotě. Životní cyklus se skládá z nakladeného vajíčka, larev prvního až třetího instaru, stádia kukly a dospělého jedince. Nově vylíhlí jedinci, stejně tak jako dospělí samci a samice, jsou snadno rozeznatelní. Rozpoznání čerstvě vylíhlých samic je důležité pro křížení, jelikož samice až do více jak 8 hodin po vylíhnutí nejsou schopné se pářit, čehož se využívá při křížení. Po spáření samička dokáže naklást až 100 vajíček denně po dobu až třech týdnů a lze tak velice rychle namnožit určitou linii.

Dostupnost genetických nástrojů vychází z faktu, že octomilka je více jak 100 let využívána jako genetický model. Genom octomilky se skládá ze 4 párů chromozomů, jednoho páru pohlavních chromozomů (XX/XY) a třech párů autozomů. Pohlavní chromozóm je označován jako první chromozóm a autozomy jako druhý, třetí a čtvrtý chromozóm. Významnou událostí bylo oskenování 97-98 % genomu octomilky a zveřejnění sekvence přibližně 13 600 genů (Adams et al., 2000).

Jedním z nejpoužívanějších genetických nástrojů je tzv. Gal4/UAS systém, který umožňuje regulovat tkáňově specifickou expresi genů (Brand & Perrimon, 1993). Systém se skládá z transkripčního aktivátoru z kvasinek Gal4 exprimovaného v určitých buňkách kvůli použití tkáňově specifického promotoru a genu pod kontrolou UAS (upstream activation sequence), kam se váže Gal4. Jednotlivé komponenty (promotor-Gal4 a UAS-gen) se nachází ve dvou liniích a do kontaktu se dostávají až u potomka vniklého ze zkřížení těchto dvou linií. Jen u tohoto potomka dochází k tkáňově specifické expresi cílového genu. Oddělení linií s promotor-Gal4 a s UAS-gen má výhodu v kombinování různě tkáňově specifických Gal4 s konstrukty UAS-gen a v ovlivnění exprese jen v experimentální linii.

Využívané je také spojení Gal4/UAS systému s teplotně senzitivním inhibičním proteinem Gal80 (Zeidler et al., 2004). Toto spojení umožňuje kromě tkáňově specifické regulace exprese i regulovat expresi cílového genu časově. Principem je, že Gal80 pod promotorem tubulin1 $\alpha$  blokuje aktivitu Gal4 navázáním Gal80 k aktivační doméně Gal4 a vznikem

dimeru (Melcher, 2001). Zeidler et al. (2004) dále ukázali, že teplotně senzitivní protein Gal80 je schopný inhibovat Gal4 aktivitu ve všech tkáních v 18 °C, avšak ne v 29 °C a jen částečně v 25 °C. Dnes se proto používá teplotně senzitivní protein Gal80 pod promotorem tubulin1 $\alpha$  (tub-Gal80), který je schopný inhibovat Gal4 aktivitu ve všech tkáních v 18 °C, avšak ne v 25-29 °C. Časově specifická exprese tak spočívá v udržování experimentálních jedinců v 18 °C, které se v určitém čase přemístí do teploty 25-29 °C, která způsobí degradaci Gal80 a umožní nasednutí Gal4 na UAS a spuštění exprese genu.

Za UAS sekvencí nemusí být vložen jen gen kódující protein, ale i gen pro nekódující RNA, konkrétně pro vlásenkovou dvouvláknovou RNA (dsRNA). V tomto případě se využije objevu RNA interference, kdy dsRNA způsobí zničení homologní mRNA a tím umlčení genu u háďátka *Caenorhabditis elegans* (Fire et al., 1998). Proces RNAi byl objeven i octomilky (Kennerdell & Carthew, 1998), a proto došlo k rozvoji této techniky. Dnes se nejvíce používá indukování RNAi expresí invertovaných repetitivních fragmentů cílového genu, které způsobí vznik specifické vlásenkové struktury dsRNA (Dietzl et al., 2007). Velkým přínosem bylo postupné vytvoření dostupných sbírek linií UAS-RNAi pro všechny geny octomilky, které v Gal4/UAS (Gal4Gal80/UAS) systému umožní umlčet gen tkáňově i časově specificky. Lze tak nejen studovat fyziologickou roli genu při zvýšené expresi ale i při umlčení genové exprese. Pojem umlčení genu a ne vypnutí genu se používá proto, že RNAi není schopná úplně potlačit expresi genu (Dietzl et al., 2007).

Důležitou výhodou je také podobnost s člověkem, která umožňuje použít octomilku jako model pro studium lidských nemocí. Podobnost s člověkem lze najít jak u larev, tak u dospělce, na molekulární i vyšší úrovni. Podobnost na úrovni genů ukázal Reiter (2001) zjištěním, že 77 % genů asociovaných s lidskými chorobami lze najít i u octomilky. Podobnost na orgánové úrovni lze demonstrovat na příkladu, že buňky tukového tělesa octomilky stejně jako lidské adipocyty regulují ukládání a uvolňování živin (Yu, Zhang, & Jin, 2018). U octomilky jsou i další analogické orgány s člověkem: srdce, mozek či krev (hemolymfa) (Galenza & Foley, 2019). Je tedy zřejmé, že savci i hmyz mají podobné tkáně a lze tak na octomilce modelovat komunikace mezi nimi, které jsou důležité pro studium lidských onemocnění.

Octomilka má výhody i pro studium imunity a metabolismu, jelikož nejdůležitější metabolické a imunitní signalizace jsou konzervované mezi hmyzem a savci (Galenza & Foley, 2019). Příkladem konzervované metabolické signalizace je inzulinová signalizace

(Teleman, 2010). Díky tomu se octomilka začíná používat jako model lidských metabolických chorob zahrnující například cukrovku, která je vzrůstající zdravotní problém. Tímto modelem se dá studovat jak cukrovku prvního typu (nedostatečná sekrece inzulínu), tak i druhého typu (inzulínová rezistence), která tvoří více než 90 % celkových případů cukrovky (Graham & Pick, 2017).

## **1.2. Imunitní systém u *Drosophila melanogaster***

Imunitní systém octomilky je založen na přirozené imunitě, jelikož octomilka postrádá specifickou imunitu. V poslední době byla ale snaha ukázat, že i přirozená imunita bezobratlých by mohla mít částečně imunitní paměť (Cooper & Eleftherianos, 2017). Imunitní systém může být rozdělen do buněčné a humorální imunity, avšak obě části jsou velice provázané.

Nejlépe popsána je humorální imunitní reakce proti houbové a bakteriální infekci. Charakteristickým znakem humorální imunity je produkce antimikrobiálních peptidů (AMPs) zejména v tukovém tělese a jejich uvolnění do cirkulace. Produkce AMPs je velice důležitá proti mnoha mikrobiálním patogenům a je regulována zejména Toll a IMD (immune deficiency) signalizacemi. Toll signalizace je aktivována hlavně houbami a mnohými Gram pozitivními bakteriemi, zatímco IMD signalizace zejména gram negativními. Ačkoli tyto dvě signalizace nesdílejí žádné klíčové komponenty v signalizacích, obě signalizace se potkávají v aktivaci alespoň jednoho transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B rodiny (Toll aktivuje Dif nebo Dorsal, IMD primárně Relish), které indukují expresi AMPs genů (Silverman, Paquette, & Aggarwal, 2009).

Buněčnou imunitu zajišťují imunitní buňky souhrnně nazývané hemocyty, které jsou tradičně rozdělovány podle morfologie do třech skupin – plazmatocyty, lamelocyty a krystalové buňky. Nedávné výzkumy ale odhalily složitější systém s různými podskupinami, novými typy či středními stádii využitím single-cell RNA sequencing (Cattenoz et al., 2020; Cho et al., 2020; Fu, Huang, Zhang, van de Leemput, & Han, 2020). Cattenoz et al. (2020) například definovali 13 typů plazmatocytů v neinfikované larvě, které asociovali s různými buněčnými procesy.

Podle tradiční terminologie jsou nejpočetnější skupinou plazmatocyty. Kormě časného embrya tvoří více jak 90 % všech hemocytů a zodpovídají za fagocytózu, sekreci mimobuněčného matrixu a signálních molekul (Gold & Brückner, 2015). Dalším nejčastějším typem jsou krystalové buňky, které uvnitř buněk obsahují krystalky složené

z profenoloxidáz (Rizki & Rizki, 1959). Při infekci jsou profenoloxidázy aktivované na fenoloxidázy, které katalyzují vznik nerozpustného melaninu v místě zranění nebo infekce (Dudzic, Kondo, Ueda, Bergman, & Lemaitre, 2015). Odpadní produkt melanizační reakce jsou volné kyslíkové radikály, které se podílejí na zabíjení patogenů (Dudzic et al., 2015). Poslední skupinou jsou velké ploché buňky zvané lamelocyty, které se neobjevují u zdravého jedince. Objevují se pouze v larválním stádiu a zejména při infekci parazitodní vosičkou (Parsons & Foley, 2016).

### **1.2.1. Imunitní reakce proti parazitoidním vosičkám**

Infekce parazitoidními vosičkami slouží jako hlavní model ke studiu buněčné imunity, která při tomto typu infekce hraje největší roli v imunitní reakci (Vanha-aho et al., 2015). Nejvíce popsána je imunitní reakce proti parazitoidní vosičce *Leptopilina boulardi* (Carton & Nappi, 1991), kdy samička parazitoidní vosičky naklade vajíčko do larvy octomilky. Pokud octomilka nespustí dostatečně silnou imunitní odpověď, z vosího vajíčka se vyvíjí larva, která vyžije octomilku jako zdroj potravy a tím ji zabije. Octomilka se ale brání spuštěním buněčné imunitní odpovědi proti parazitoidovi, která může skončit enkapsulací a zabitím vosího vajíčka.

První pozorovatelnou událostí po nakladení vajíčka je zvýšení počtu cirkulujících plazmatocytů, které následně tvoří první vrstvu buněk obklopujících vosí vajíčko (Russo, Dupas, Frey, Carton, & Brehelin, 1996). Zvýšení počtu plazmatocytů v cirkulaci je způsobeno jejich proliferací a uvolněním z hematopoetických kapes (Markus et al., 2009). Dále dojde k diferenciaci plazmatocytů na lamelocyty, a to jak v cirkulaci, tak přímo na vosím vajíčku (Anderl et al., 2016). Na základě nových analýz, kterými byly plazmatocyty rozřazeny až na 13 skupin, lze také rozdělit lamelocyty na dvě skupiny (Cattenoz et al., 2020), což by potvrzovalo zmíněný dvojitý původ lamelocytů. Lamelocyty poté vytvářejí další vrstvu buněk okolo vajíčka, kdy formují pevné spoje mezi buňkami a oddělí vajíčko od hemocoelu (Russo et al., 1996). Takto obalené vajíčko je následně melanizováno krystalovými buňkami i lamelocyty, které také obsahují gen pro profenoloxidázu (Nam, Jang, Asano, & Lee, 2008). Ukládáním melaninu okolo vajíčka se vytváří fyzikální bariéra, která umožní bezpečnou a cílenou produkci volných kyslíkových radikálů k zabití vajíčka (Duvic, Hoffmann, Meister, & Royet, 2002).

Lamelocyty se také uvolňují z lymfatické žlázy, která se při infekci předčasně rozpadá (Lanot, Zachary, Holder, & Meister, 2001). K uvolnění dojde ale až mezi 24-48 hpi (hodin

po infekci) a lamelocyty z této druhé vlny slouží jen jako pomoc při imunitní odpovědi (Banerjee, Girard, Goins, & Spratford, 2019), jelikož ve 24 hpi je vajíčko již obaleno a do 48 hpi je melanizováno (Bajgar et al., 2015).

K potlačení této imunitní odpovědi při kladení vajíčka některé vosičky (i *L. boulandi*) ale vpraví do larvy imunosupresivní látky, které potlačují diferenciaci lamelocytů (Labrosse et al., 2005), mění morfologii lamelocytů (Russo et al., 1996) a inhibují melanizaci (Colinet et al., 2009). Imunitní reakce proti vosí infekci je proto složitější proces, který navíc závisí na mnoho lokálních i systemických signálech (Letourneau et al., 2016) a zapojení dalších orgánů jako svaly a tuk (Banerjee et al., 2019). Bylo také ukázáno, že imunitní odpověď proti *L. boulandi* může být ovlivněna genotypy *D. melanogaster* (Leitão et al., 2019), proto je kladen v experimentech důraz na genetické pozadí v liniích.

### **1.3. Metabolický přesmyk při infekci u *Drosophila melanogaster***

Imunitní odpověď je obecně považována za energeticky náročný proces, jelikož je spojena s rychlou syntézou řady nových molekul, s buněčnou přestavbou imunitních buněk a jejich množení (Lochmiller & Deerenberg, 2000). Například pro boj s parazitoidní vosičkou je nutné namnožit a diferencovat lamelocyty (Parsons & Foley, 2016). Energetickou náročnost potvrzuje Bajgar et al. (2015), kteří ukázali, že imunitní buňky larvy octomilky při vosí infekci spotřebují jednu třetinu celkové spotřeby glukózy organismu z původních 10 %.

Skutečnost, že imunitní buňky se po aktivaci dokáží rychle namnožit i za cenu zvýšené spotřeby glukózy, je ale výhodná proto, aby imunitní buňky neúčastníci se boji s infekcí spotřebovaly málo energie a nebyly tak velké udržovací náklady (McKean, Yourth, Lazzaro, & Clark, 2008). Konstantně zvýšené množství imunitních buněk by sice způsobilo lepší odolnost proti patogenu (i parazitoidní vosičce), ale způsobilo by i vyšší udržovací náklady a tím menší kompetitivnost o zdroje (Kraaijeveld & Godfray, 1997).

Je potřeba zdůraznit, že pokud je řeč o energetické náročnosti imunitní odpovědi, je tím myšlena náročnost zejména buněčné imunity, ačkoli u humorální imunity je pravděpodobně energeticky náročné syntetizovat AMPs (Rera, Clark, & Walker, 2012). To potvrzuje i fakt, že indukce exprese *AMPs* je spojena potlačením anabolismu (Clark et al., 2013). Avšak je náročné jednoznačně oddělit energetickou náročnost humorální imunity, jelikož tukové těleso hraje roli jak v expresi *AMPs*, tak poskytuje energii buněčné imunitě. Energetická náročnost aktivované imunity tak může být jistě spojena jen s buněčnou imunitou.

Důvodem energetické náročnosti aktivované buněčné imunity spočívající ve větší spotřebě glukózy je změna v buněčném metabolismu aktivovaných imunitních buněk (Krejčová et al., 2019). Tato změna metabolismu byla u octomilky objevena až nedávno, přestože u savců je přestavba buněčného metabolismu dobře popsána (Olenchock, Rathmell, & Vander Heiden, 2017). Krejčová et al. (2019) zjistili, že aktivované plazmatocyty při akutní bakteriální infekci upřednostňují pro zisk ATP aerobní glykolýzu před oxidativní fosforylací. Oxidativní fosforylace, ač neefektivnější metoda oxidace glukózy, je totiž příliš pomalá ke generování ATP při imunitní reakci. Pomocí glykolýzy aktivované imunitní buňky vyprodukují více energie, ale spotřebují více glukózy (Bajgar et al., 2015; Krejčová et al., 2019). Preferování glykolýzy před oxidativní fosforylací při dostatku kyslíku připomíná proces zvaný Warburg efekt (Warburg, Wind, & Negelein, 1927). Tento efekt byl poprvé popsán u savců v rakovinných buňkách, ale je společný pro rychle se množící buňky (Burns & Manda, 2017). Krejčová et al. (2019) také zjistili, že buněčná odpověď je konzervovaná mezi savci a hmyzem a tak lze předpokládat, že řada informací z výzkumu na savcích je relevantní i pro octomilku. Změna buněčného metabolismu aktivovaných buněk se očekává i při vosí infekci, kde byla u hemocytů naměřena zvýšená exprese glykolytických genů (Bajgar et al., 2015) a produkcí laktátu (Strasser, 2016), který je vedlejší produkt aerobní glykolýzy sloužící k udržování redoxního potenciálu  $NAD^+/NADH$ .

Takto zvýšená spotřeba glukózy aktivovanými imunitními buňkami se změněným metabolismem způsobí ovlivnění celého metabolismu (Bajgar et al., 2015). Pro zanechání více glukózy imunitním buňkám dochází při infekci k potlačení metabolismu ve zbytku organismu. Charakteristické pro systemické potlačení metabolismu je zpomalení růstu, snížení příjmu glukózy do periferních tkání, uvolňování energie z energetických zásob či alespoň potlačení budování zásob a následná hyperglykémie (Bajgar & Dolezal, 2018; Bajgar et al., 2015; Krejčová et al., 2019) Systemickou změnu metabolismu indukují samy imunitní buňky (Bajgar & Dolezal, 2018; Bajgar et al., 2015). Toto sobecké chování imunitních buněk při infekci je ale životně důležité. Bajgar et al. (2015) na vosí infekci ukázali, že systemický metabolický přesmyk je nezbytný pro produkci lamelocytů. Usurpování energie imunitními buňkami zapadá i do teoretického konceptu nazvaného Sobecký imunitní systém (Straub, 2014).

Zpomalení vývoje a růstu bylo ukázáno na zpoždění v čase zakuklení a pomalejším růstu imaginálního disku u larvy při vosí infekci (Bajgar et al., 2015). Nicméně, zpomalení vývoje a růstu bylo potvrzeno i při jiných infekcích, např. i při virové infekci (Arnold, Johnson, &

White, 2013), což značí, že jde o obecný mechanismus. Snížení spotřeby glukózy bylo ověřeno pomocí radioaktivně značené  $^{14}\text{C}$  glukózy (Bajgar et al., 2015) a značené deoxyglukózy 2-NBDG (Krejčová et al., 2019), kdy inkorporace  $^{14}\text{C}$  a 2-NBDG do periferních tkání, jako jsou svaly, tuková tělesa a disky, klesla při infekci. Ukazatelem snížené spotřeby glukózy periferními tkáněmi může být nepřímo pravděpodobně i sledování redukce růstu a vývoje.

Potlačení ukládání energie z glukózy do energetických rezerv podle snižování nebo alespoň nenavyšování tukových a glykogenových zásob bylo ukázáno u larev při infekci parazitoidní vosičkou (Bajgar et al., 2015) i bakteriálních infekcích u dospělců, konkrétně *M. marinum* (Dionne, Pham, Shirasu-Hiza, & Schneider, 2006) a *L. monocytogenes* (Chambers, Song, & Schneider, 2012). Snížení zásob glykogenu bylo pozorováno i u dospělců infikovaných *S. pneumoniae* (Bajgar & Dolezal, 2018).

Potlačení budování energetických zásob a zároveň zanechání více energie v cirkulaci bylo demonstrováno při vosí infekci i snížením množství tkáňové trehalózy a vzrůstem cirkulující trehalózy v časně fázi infekce (Bajgar et al., 2015). Trehalóza jakožto neredukující disacharid může být štěpena sekreční formou trehalózy v cirkulaci a sloužit jako zdroj glukózy (Lehr Katharina, 2019). Podle nepublikovaných výsledků (Lehr Katharina, 2019) se ale ukazuje, že aktivované hemocyty spíše přijímají trehalózu, kterou přemění na glukózu uvnitř buněk pomocí cytoplazmatické formy trehalázy.

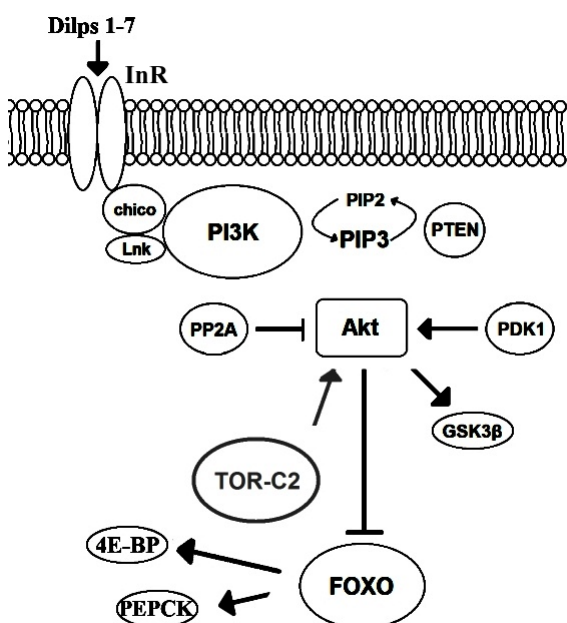
Zdá se logické, že aby aktivované imunitní buňky dostávaly dostatek energie (zejména glukózy), musí dojít potlačení neimunitních procesů a přenechání energie. Efekt infekce na globální potlačení růstu, vývoje a ostatních procesů ale není dostatečně prozkoumán (Dolezal, Krejčova, Bajgar, Nedbalova, & Strasser, 2019; Lee & Lee, 2018) a proto jsem se tímto tématem zabýval v experimentální části.

Kromě ukázané nutnosti přerozdělení energie, zásobování imunitního systému musí být také přesně regulováno a udržováno v rámci limit, i mírněním systemických změn (Bajgar & Dolezal, 2018; Schneider, 2007). Uvolněná glukóza může být využita patogenem a snížit tak přežití hostitele (Bajgar & Dolezal, 2018; Passalacqua, Charbonneau, & O’Riordan, 2016). Energetické zásoby také nejsou neomezené a je potřeba zamezit přílišnému vyčerpání energetických zásob, které bylo například pozorováno při mykobakteriální infekce (Dionne et al., 2006). Ze zmíněných informací vyplývá, že metabolismus při infekci musí být na

molekulární úrovni regulován řadou signalizací. Důležitou centrální roli zastává inzulinová signalizace (Dolezal et al., 2019).

#### 1.4. Inzulinová signalizace u *Drosophila melanogaster*

Inzulinová signalizace je evolučně konzervovaná na molekulární i fyziologické úrovni (Teleman, 2010). Pravděpodobně z důvodu dlouhodobé nutné adaptace organismů na rozdílný příjem a výdej energie, kdy se nadbytečná energii z cirkulujících sacharidů ukládá do glykogenu a tuku, odkud může být v případě potřeby získána. Funkcí inzulinové signalizace je proto regulovat řadu funkcí zahrnujících metabolismus lipidů a cukrů, růst nebo odolnost proti stresu (Teleman, 2010). Inzulinová signalizace je poměrně složitá signalizace, kde se nachází řada komponentů i specifických tkáňových regulátorů. Zde bude ale popsána zjednodušená signalizace (Obr. 1).



**Obr. 1: Schéma zjednodušené inzulinové signalizace.** Šipky reprezentují indukci, pruhy značí potlačení. Více informací v textu. Zkratky: Dilps, *Drosophila* insulin-like peptides; InR, insulin-like receptor; chico, insulin receptor substrate; Lnk, adaptor protein; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase; PIP3, phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate; PIP2, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate; PTEN, phosphatase and tensin homolog on chromosome 10; PDK1, phosphoinositide-dependent kinase-1; PP2A, protein phosphatase 2A; Akt, protein kinase B; FOXO, Forkhead Box O; 4E-BP, 4E-binding protein; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; TOR-C2, TOR complex 2; GSK-3 $\beta$ , glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . Upraven podle Reyes-DelaTorre, Teresa, & Rafael (2012).

V octomilce bylo identifikováno osm Dilps (*Drosophila* insulin-like peptides) (Grönke, Clarke, Broughton, Andrews, & Partridge, 2010). Exprese *Dilps* vykazuje tkáňově



i vývojově specifický vzor (Nässel, Liu, & Luo, 2015). Podle současného názoru různé Dilps získaly speciální roli v udržování homeostáze metabolismu při různých vývojových stupních a stavu živin. Ačkoli analýza jednotlivých mutantů ukázala, že žádný Dilp není nezbytný a ostatní Dilps nahradí jeho roli (Grönke et al., 2010), což znesnadňuje zjištění jejich účinku. Hlavní místo syntézy Dilps jsou IPCs (insulin producing cells) v mozku, kde jsou exprimované *Dilp 1-3,5* (Brogiolo et al., 2001). Zde už ztráta IPCs ale způsobí letalitu nebo zvýšenou koncentraci glukózy a pokles zásob trehalózy, glykogenu a tuku (Grönke et al., 2010). Exprese a sekrece Dilps je řízena více mechanismy (Nässel et al., 2015). IPCs měří přímo hladinu glukózy v hemolymfě, ale IPCs jsou regulovány i signály ze střev, tuku nebo adipokinetickým hormonem (Mattila & Hietakangas, 2017).

Dilps signalizují skrz jediný InR (insulin-like receptor), což znamená, že regulace růstu a metabolismu je dosaženo stejnou signalizační kaskádou (Fernandez, Tabarini, Azpiazu, Frasch, & Schlessinger, 1995). Výjimkou je Dilp 8, který reaguje skrz receptor Lgr3 (leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 3) za účelem koordinace růstu orgánů při dospívání larvy (Colombani et al., 2015).

Po navázání ligandu je InR autofosforylovaný a váže se k IRS (insulin receptor substrate) Chico (Böhni et al., 1999) a adaptorovému proteinu Lnk (Werz, Köhler, Hafen, & Stocker, 2009). Aktivace InR vede k fosforylaci Chico, který naváže lipidovou kinázu PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), která způsobí akumulaci PIP3 (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) v buněčné membráně (Werz et al., 2009). Akumulace PIP3 váže Akt (PKB, protein kinase B) a PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) k plazmatické membráně (Teleman, 2010). Akt je poté aktivován fosforylací z PDK1, částečně i TOR-C2 (TOR complex 2) (Hietakangas & Cohen, 2007; Rintelen, Stocker, Thomas, & Hafen, 2001). Negativně je Akt regulován i lipidovou fosfatázou PTEN (phosphatase and tensin homolog on chromosome 10) a fosfatázou PP2A (protein phosphatase 2A) (Vereshchagina, Ramel, Bitoun, & Wilson, 2008).

Aktivovaný Akt fosforyluje velké množství proteinů zahrnutých do kontroly metabolismu, a proto hraje klíčovou roli v inzulinové signalizaci. Důležitým cílem Akt je například nejznámější transkripční faktor inzulinové signalizace FOXO (Forkhead Box O) (Puig, 2003). Fosforylace FOXO vede k jeho zanechání v cytoplazmě a zablokování FOXO jaderné transkripční aktivity (Puig, 2003). FOXO jako jeden z hlavních transkripčních faktorů má výrazný dopad na metabolismus. Anabolický efekt inzulinu je ze značné části důsledkem

blokace FOXO aktivity. Při nízké inzulínové signalizaci se FOXO v jádře váže na promotory stovek genů pro katabolismus, rezistenci proti stresu a imunitě (Alic et al., 2011). Jeden z typických cílů FOXO je translační represor 4E-BP (4E-binding protein, Thor), který se po aktivaci váže na eIF4E (eukaryotický iniciační faktor 4E) a blokuje nasednutí ribozomu na 5 konci mRNA (Puig, 2003). Další cíl FOXO je např. PEPCCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase), čímž indukuje glukoneogenezi. Akt kromě fosforylace FOXO dále například fosforyluje a inaktivuje GSK-3 $\beta$  (glycogen sythase kinase 3 $\beta$ , Shaggy), což vede k defosforylaci a aktivaci glykogensyntázy (Mattila, Kallijarvi, & Puig, 2008).

Ovlivnění těchto i dalších mechanismů může vést k inzulínové rezistenci, kde i zvýšené množství inzulínu není schopné aktivovat kaskádu inzulínové signalizace. Například bylo ukázáno, že vysokocukerná strava vyvolá inzulínovou rezistenci přes NlaZ protein z tukového tělesa (Hull-Thompson et al., 2009).

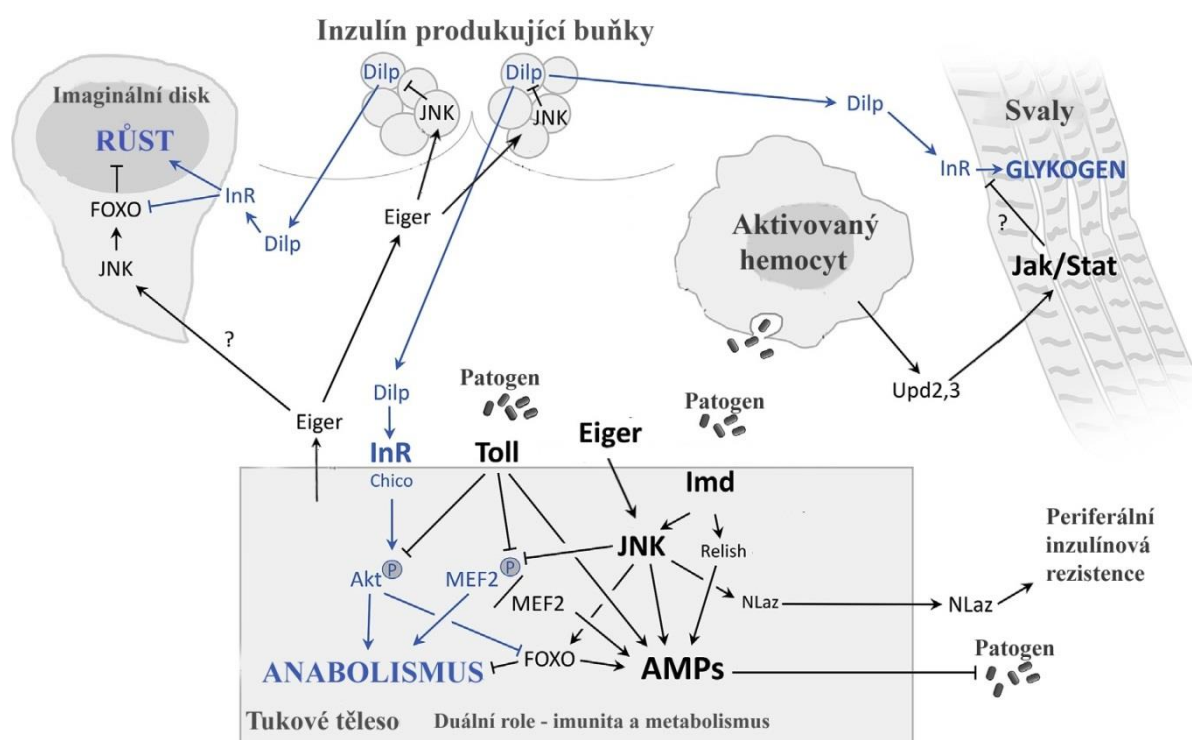
#### **1.4.1. Inzulínová signalizace a regulace metabolismu při imunitní reakci**

Molekulární regulace metabolismu při infekci není zcela prozkoumána. Ukazuje se ale, že právě inzulínová signalizace hraje centrální roli při metabolickém přesmyku při infekci. Bez infekce inzulínová signalizace stimuluje ukládání energie a růst (Mattila & Hietakangas, 2017). Při infekci ale dochází k popsanému systemickému metabolickému přesmyku, kdy je potlačen růst a upřednostňováno uvolňování energie ze zásob (Bajgar et al., 2015). Z toho vyplývá, že systemický metabolický přesmyk by mohl být spojen se systemickým snížením inzulínové signalizace. Potlačení inzulínové signalizace v periferních tkáních při infekci by proto mohlo být cestou, jak imunitní systém získává energii.

První důkazy přinesl Dionne et al. (2006). Kromě poklesu množství tuku a glykogenu v tukovém tělese při infekci *Mycobacterium marinum* pozorovali snížení inzulínové signalizace. Snížení detekovali na redukcii aktivace Akt a následné aktivaci FOXO. Při použití mutace ve *FOXO* při infekci pozorovali více glykogenu a tuku, čímž doložili, že pozorovaný fenotyp při infekci závisí na snížení inzulínové aktivity. Potlačení aktivity inzulínové signalizaci při bakteriální infekci (*M. luteus*, *B. bassiana*) spolu se snížením ukládáním energie do tukových zásob zaznamenal i DiAngelo, Bland, Bambina, Cherry, & Birnbaum (2009). Snížení aktivity inzulínové signalizace pozorovali opět na úrovni fosforylace Akt.

Další výsledky s potlačením inzulínové signalizace při infekci byly přineseny při zkoumání mechanismů, které indukují metabolické změny při infekci (Obr. 2). Při infekci jsou

vysílány různé signály k potlačení systemického metabolismu přes inzulínovou signalizaci k poskytnutí energie buněčné imunitě ale i k přepnutí z anabolismu k indukci humorální imunity v tukovém tělese (Dolezal et al., 2019). Propojení anabolismu a humorální imunity demonstruje duální role transkripčního faktoru Mef2 (Clark et al., 2013). Za neinfekčních podmínek je Mef2 fosforylovaný a zvyšuje transkripci anabolický genů. Při infekci dojde ale k defosforylaci Mef2 a nefosforylovaný Mef2 zvýší expresi AMPs.



**Obr. 2: Základní schéma molekulárních interakcí mezi imunitními signalizacemi a inzulínovou signalizací.** Signalizace při infekci je značena černě, bez infekce modře. Šipky reprezentují indukci, pruhy značí potlačení, otazník s šipkou/pruhem značí navrhanou indukci/potlačení. Více informací v textu včetně vysvětlení zkratk. Upraveno podle Dolezal et al. (2019).

Například Toll signalizace, která je indukována při bakteriální infekci, redukuje inzulínovou signalizaci v tukovém tělese. DiAngelo et al. (2009) ukázali, že po genetické aktivaci Toll signalizace v tukovém tělese dojde k redukcii inzulínové signalizace a snížení zásob tuku. Aktivace Toll signalizace v tukové tkáni také neautonomně způsobí systemickou redukcii inzulínové signalizace a zpomalení růstu, což ukazuje, že by Toll signalizace mohla zprostředkovávat systemický metabolický přesmyk. Roth, Bitterman, Birnbaum, & Bland (2018) poté ukázali, že v tukové tkáni je potlačení inzulínové signalizace na úrovni fosforylace Akt. Navrhli také, že potlačení růstu je asi z důvodu periferní inzulínové rezistence, jelikož se množství Dilp 2 v hemolymfě nemění při aktivaci Toll. Suzawa, Muhammad, Joseph, & Bland (2019) ale zjistili, že bakteriální infekce i genetická aktivace Toll redukuje syntézu Dilp 6 a snížené množství Dilp 6 v cirkulaci ovlivnilo růst larvy.

Navíc obnovení exprese *Dilp 6* v tuku potlačilo vliv Toll signalizace na zpomalení růstu. Závěrem je tedy, že potlačení inzulínové signalizace není z důvodů vzniku inzulínové rezistence.

Důvodem, proč imunitní signalizace jako Toll snižují aktivitu inzulínové signalizace, může být kromě potlačení metabolismu v systemickém metabolickém přesmyku i to, že inaktivace inzulínové signalizace zvyšuje expresi *AMPs* (Becker et al., 2010). Konstitutivní aktivace FOXO i bez přítomnosti patogenu je totiž dostatečná k indukci exprese *AMPs* v tukové tkáni, jelikož se transkripční faktor FOXO naváže na Foxo-binding část v promotoru *AMPs* (Becker et al., 2010). Podle tradičního pohledu je ale indukce produkce *AMPs* při infekci regulována Toll a Imd (Immunodeficiency) signalizacemi přes Mef2 (Clark et al., 2013).

Prerozdělení energie z anabolických procesů při infekci může ovlivňovat i Eiger. Bylo ukázáno, že při nedostatku bílkovin ve stravě se z tuku sekretovaný Eiger váže na IPCs a skrz JNK (c-Jun N-terminal kinase) inhibuje expresi *Dilp 2* a *Dilp 5*, čímž inhibuje růst (Agrawal et al., 2016). Kromě snížení exprese *Dilps* v IPCs v mozku, Eiger je schopný indukovat přes JNK signalizaci expresi *Neural Lazarillo (NLaz)* v tukovém tělese (Hull-Thompson et al., 2009). NLaz poté indukuje periferní inzulínovou rezistenci při vysokocukerné stravě (Pasco & Léopold, 2012). Kromě výsledků, že Eiger ovlivňuje metabolismu (inzulínovou signalizaci), bylo také ukázáno, že ovlivňuje i infekci a je pravděpodobně dalším spojovacím signálem. Mabery & Schneider (2010) ukázali, že *Eiger* je při infekci *Salmonella typhimurium* exprimován v tukovém tělese a je potřeba pro imunitní reakci.

Další zkoumaná imunitní signalizace ve spojitosti s inzulínovou signalizací byla Imd, ale DiAngelo et al. (2009) expresí konstitutivně aktivní formy transkripčního faktoru Relish (komponentu Imd signalizace) v tukové tkáni nezjistili změnu inzulínové signalizace (fosforylaci Akt). Nicméně exprese konstitutivně aktivního formy Imd v tuku potlačilo systemickou inzulínovou signalizaci (Davoodi et al., 2019). Navíc došlo k hyperglykemii, zmenšení zásob tuku a zpomalení růst. Na základě těchto dat lze předpokládat, že Imd potlačí inzulínovou signalizaci upstream od Relish, možná přes JNK. JNK přes FOXO potlačí inzulínovou signalizaci a růst (Wang, Bohmann, & Jasper, 2005).

Další signalizací, u které je pravděpodobná interakce s inzulínovou signalizací je Jak-Stat signalizace. Jak-Stat signalizace je relativně jednoduchá. Skládá se ze třech ligandů – Unpaired 1 (Upd1) (Harrison, McCoon, Binari, Gilman, & Perrimon, 1998), Unpaired 2

(Upd2) (Hombría, Brown, Häder, & Zeidler, 2005), Unpaired 3 (Upd3) (Agaisse, Petersen, Boutros, Mathey-Prevot, & Perrimon, 2003), receptoru Domeless (Dome) (Brown, Hu, & Hombría, 2001), Jak homologu – tyrozinové kinázy Hopscotch (Hop) (Binari & Perrimon, 1994) a jednoho STAT transkripčního faktoru Stat92E (Yan, Small, Desplan, Dearolf, & Darnell, 1996).

Yang, Kronhamn, Ekstrom, Korkut, & Hultmark (2015) ukázali, že Jak-Stat signalizace je aktivována při vosí infekci ve svalech kvůli Upd2 a Upd3 z aktivovaných hemocytů. Dle jejich výsledků je aktivovaná Jak-Stat signalizace ve svalech nezbytná pro buněčnou imunitu proti parazitoidní vosičce. Poté Yang & Hultmark (2017) krátce na to ukázali, že inzulínová signalizace je redukována ve svalech a tukovém tělese po delší době po infekci parazitoidní vosičkou. Propojení mezi Jak-Stat signalizací a inzulínovou signalizací ve svalech ale přes snahu prokazatelně neukázali. Propojení pravděpodobně existuje, jelikož aktivovaná Jak-Stat signalizace ve svalech je schopná indukovat potlačení inzulínové signalizace (Woodcock et al., 2015). Toto zjištění však bylo provedeno při vysokotučné dietě, kdy Upd3 z hemocytů aktivoval Jak-Stat signalizaci a způsoboval inzulínovou rezistenci.

Na těchto příkladech je ukázáno, že imunitní signály po rozpoznání patogenu neregulují jen imunitní funkce, ale regulují i metabolismus periferních tkání přes inzulínovou signalizaci. Dále příklady demonstrují, že vliv jednotlivých signalizací na ovlivnění inzulínové signalizace se liší podle tkáně a podle infekce. Málo prozkoumaný je dopad infekce parazitoidní vosičkou na systemický metabolismus. Nebylo zde ani jasně popsáno systemické snížení inzulínové signalizace při infekci. Cíle mé diplomové práce proto spočívaly v zjištění, zda i při této infekci dochází k potlačení inzulínové signalizace v periferních tkáních a případně jestli je snížení inzulínové signalizace ve svalech indukováno aktivovanou Jak-Stat signalizací.

#### **1.4.2. Důležitost inzulínové signalizace pro imunitní reakci**

Přestože byla prokázána důležitost systemického metabolického přesmyku pro imunitní odpověď (Bajgar et al., 2015) stejně tak jako potlačení inzulínové signalizace při imunitní reakci v periferních tkáních při různých infekcích (1.4.1.), důležitost potlačení inzulínové signalizace pro energeticky náročnou buněčnou imunitní reakci nebyla dosud jasně ukázána. Důležitost potlačení inzulínové signalizace pro efektivitu buněčné imunitní je složitě testovatelná, jelikož manipulace v inzulínové signalizaci často přímo ovlivní humorální imunitu, například přes FOXO v tukovém tělese (Becker et al., 2010). Těžko se pak

dokazuje, že snížená rezistence proti patogenu není z důvodu snížení indukce imunitní odpovědi, ale z nevzniknutí metabolického přesmyku. Také je problém, pokud byla genetická manipulace aktivní od začátku vývoje, mohlo tak dojít ovlivnění metabolismu před infekcí (Yang & Hultmark, 2017). Pro tyto účely je výborný nástroj infekce parazitoidní vosičkou, kde je možné se víceméně vyhnout vlivu humorální imunity a tak vlivu inzulínové signalizace na modulaci indukce imunitní odpovědi.

Důležitost potlačení inzulínové signalizace při infekci nebyla stanovena ani u člověka, kde je opět problém, že metabolické a imunitní reakce jsou velmi provázané. U člověka se navíc předpokládá, že snížení inzulínové signalizace v periferních tkáních je z důvodu vzniku inzulínové rezistence, jelikož je inzulínová rezistence spojována se zánětem (de Luca & Olefsky, 2008). To je v souladu s teoretickým konceptem Sobecký imunitní systém (Straub, 2014), podle kterého je inzulínová rezistence v periferních tkáních cestou, jak zajistit dostatek glukózy imunitním buňkám při infekci. Je pravděpodobné, že podobná situace je i u octomilek.

Z tohoto důvodu v dosavadním výzkumu u octomilky také často chybí důvod potlačení inzulínové signalizace v periferních tkáních. Zda je důvodem vznik inzulínové rezistence nebo nedostatek ligandů ke stimulaci inzulínové signalizace. Stanovení je důležité i proto, že by se dal použitý systém využít jako model cukrovky 1. nebo 2. typu.

V experimentální části jsem se zaměřil na některé zmíněné nejasnosti či mezery v současném výzkumu.

## 2. Cíle práce

- Zjistit, zda je inzulínová signalizace ovlivněna v periferních tkáních larev octomilek při infekci parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi*
- Zjistit, zda je případné ovlivnění inzulínové signalizace způsobeno inzulínovou rezistencí
- Otestovat důležitost inzulínové rezistence v periferních tkáních pro efektivitu akutní imunitní odpovědi proti parazitoidní vosičce *Leptopilina boulardi*
- Ověřit, jestli se Jak-Stat signalizace podílí na případné indukci inzulínové rezistence ve svalech při infekci parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi*

### 3. Materiál a metody

#### 3.1. Chov a manipulace s octomilkou

Octomilky byly chovány na standardní stravě (Tab. 1) ve skleněných vialkách uzavřených vatovou zátkou v prostředí s 12 hodinovým střídáním světla a tmy, konstantní vlhkostí okolo 60 % a teplotě 25 °C.

Pro potřeby experimentů vyžadující velký počet larev byly octomilky chovány v plastových válcích na standardní stravě a při stejných podmínkách. V experimentech bylo dbáno i na to, aby nakladených vajíček bylo stále přibližně stejně. Bylo totiž ukázáno, že hustota larev ovlivňuje množství glukózy v hemolymfě (Ugrankar et al., 2015).

Larvy obsahující FB-Gal4Gal80 a 24B-Gal4Gal80 byly při experimentech chovány nejdříve v 18 °C a 24 hodin před infekcí byly přeneseny do 29 °C za účelem degradace teplotně senzitivního Gal80. Po infekci byly přeneseny do 25 °C pro standardní průběh infekce. Larvy obsahující Srp-Gal4Gal80 byly při experimentech opět chovány nejdříve v 18°C, avšak již 36 hodin před infekcí byly přeneseny do 25 °C, kde zůstaly i po infekci. Při 25 °C nedochází k úplné degradaci Gal80 a Gal80 je schopný inhibovat Srp-Gal4 aktivitu pouze v tkáních mimo hematopoetickou linii. Už 36 h v 25 °C tak zajistí vyšší zamýšlenou specifčnost exprese Srp-Gal4 v hematopoetické linii (nepublikováno – ústně od člena laboratoře).

**Tab. 1: Recept na standardní stravu.**

Voda	1500 ml
Kukuřičná mouka	120 g
Agar (Ambresco, J637)	15 g
Instantní kvasnice	60 g
Sacharóza	75 g
Vařit 14 min při 100 °C, pak 50 min při 90 °C a poté zchladit na 60 °C.	
10% Metyparaben	25 ml



### 3.2. Výchozí linie octomilek

V Tab. 2 jsou vedeny genotypy výchozích linií octomilek použitých v mé diplomové práci.

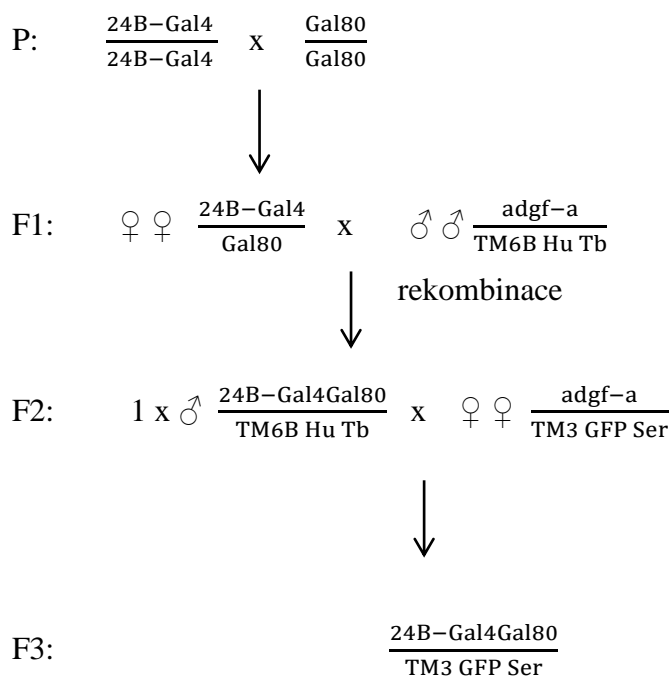
**Tab. 2: Seznam výchozích linií octomilek.**

Název linie	Genotyp
UAS-InR <sup>CA</sup>	<i>y[1] w[1118]; P{w[+mC]=UAS-InR.A1325D}2</i>
FB-Gal4Gal80	<i>w; P{GAL4}fat; P{tubP-GAL80ts}</i>
UAS-GFP	<i>w; P{UAS-2xEGFP}AH2</i>
adgf-a/TM3 GFP Ser	<i>w; +/+; adgf-a[kar]/TM3 GFP Ser</i>
adgf-a/TM6B Hu Tb	<i>w; +/+; adgf-a[kar]/TM6B Hu Tb</i>
Gal80	<i>w; +/+; P{tubP-GAL80ts}/TM6B Hu Tb</i>
24B-Gal4	<i>w; +/+; P{GawB}how24B</i>
W	<i>w</i>
Srp-Gal4Gal80	<i>w; +/+; P{srpD-GAL4.C} P{tubP-GAL80ts}/TM6B Hu Tb</i>
TRIP	<i>y[1]v[1]; P{y[+t7.7]=CaryP}attP2</i>
UAS-Upd3 RNAi	<i>y1 v1; P{TRiP.HM05061}attP2</i>

### 3.3. Křížení

Níže jsou uvedeny schémata křížení, kterými jsem získal linie s potřebnými genotypy. Pro křížení byli vybíraní samci a panny uspávány pomocí CO<sub>2</sub> Flowbuddy Flow Regulator (Genesee Scientific, 7 l/min).

Křížení č. 1: Chovná linie 24B-Gal4Gal80





F4: 
$$\frac{24B-Gal4Gal80}{24B-Gal4Gal80}$$

Křížení č. 2: Kontrolní linie 24B-Gal4Gal80 x UAS-GFP.

P:  $1 \times \text{♂} \frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{24B-Gal4Gal80}{TM6B Hu Tb} \times \text{♀} \frac{w}{w}; \frac{UAS-GFP}{UAS-GFP}; \frac{+}{+}$



F1: 
$$\frac{w}{(w)}; \frac{+}{UAS-GFP}; \frac{24B-Gal4Gal80}{+}$$

Křížení č. 3: Kontrolní linie FB-Gal4Gal80 x UAS-GFP.

P:  $\frac{w}{w}; \frac{FB-Gal4}{FB-Gal4}; \frac{Gal80}{Gal80} \times \frac{w}{/}; \frac{UAS-GFP}{UAS-GFP}; \frac{+}{+}$



F1: 
$$\frac{w}{(w)}; \frac{FB-Gal4}{UAS-GFP}; \frac{Gal80}{+}$$

Křížení č. 4: Experimentální linie 24B-Gal4Gal80 x UAS-InR<sup>CA</sup>

P:  $\frac{w}{w}; \frac{+}{+}; \frac{24B-Gal4Gal80}{24B-Gal4Gal80} \times \frac{y[1] w[1118]}{/}; \frac{UAS-InR^{CA}}{UAS-InR^{CA}}; \frac{+}{+}$



F1: 
$$\frac{w}{(y[1]w[1118])}; \frac{+}{UAS-InR^{CA}}; \frac{24B-Gal4Gal80}{+}$$

Křížení č. 5: Experimentální linie FB-Gal4Gal80 x UAS-InR<sup>CA</sup>

P:  $\frac{w}{w}; \frac{FB-Gal4}{FB-Gal4}; \frac{Gal80}{Gal80} \times \frac{y[1] w[1118]}{/}; \frac{UAS-InR^{CA}}{UAS-InR^{CA}}; \frac{+}{+}$



F1: 
$$\frac{w}{(y[1]w[1118])}; \frac{FB-Gal4}{UAS-InR^{CA}}; \frac{Gal80}{+}$$

Křížení č. 6: Kontrolní linie W x UAS-InR<sup>CA</sup>

$$P: \frac{w}{w}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+} \times \frac{y[1]w[1118]}{y[1]w[1118]}; \frac{UAS-InR^{CA}}{UAS-InR^{CA}}; \frac{+}{+}$$

↓

$$F1: \frac{w}{(y[1]w[1118])}; \frac{+}{UAS-InR^{CA}}; \frac{+}{+}$$

Křížení č. 7: Experimentální linie Srp-Gal4Gal80 x UAS-Upd3 RNAi

$$P: \frac{Srp-Gal4Gal80}{Srp-Gal4Gal80} \times \frac{UAS-Upd3 RNAi}{UAS-Upd3 RNAi}$$

↓

$$F1: \frac{Srp-Gal4Gal80}{UAS-Upd3 RNAi}$$

Křížení č. 8: Kontrolní linie Srp-Gal4Gal80 x TRIP

$$P: \frac{Srp-Gal4Gal80}{Srp-Gal4Gal80} \times \frac{TRIP}{TRIP}$$

↓

$$F1: \frac{Srp-Gal4Gal80}{TRIP}$$

### 3.4. Infekce

Pro měření genové exprese, detekci proteinů a počítání hemocytů byly časné třetí instary larev (larvy přibližně 72 hodin staré při růstu v 25 °C, 96 hodin staré při růstu 72 h v 18 °C a 24 h v 29 °C, 108 hodin staré při růstu 72 h v 18 °C a 36 h v 25 °C) infikovány parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi*. Přibližně 90 larev časného třetího instaru bylo přemístěno na Petriho misku se standardní stravou. Pro indukci silné imunitní odpovědi bylo k larvám přidáno okolo 100 samic vos a necháno 35 minut v plastovém válci. Síla imunitní odpovědi byla vždy ověřena při pitvání larev v PBS pod binokulární lupou (Olympus SZX12). Pouze larvy se 4-10 vajíčky byly použity pro přípravu vzorků.

### 3.5. Měření genové exprese

Expres genů byla měřena pomocí kvantitativní real-time PCR (q-RT-PCR).

#### 3.5.1. Příprava vzorků

Potřebné tkáně byly vypitvány z larev v PBS a přeneseny do mikrozkušavky s 200  $\mu$ l TRIzol reagent (Ambion). Až byl přenesen celkový počet tkání patřící do jednoho vzorku, vzorek se zhomogenizoval pomocí plastového drtítka a uskladnil v  $-80$  °C. Na jeden vzorek byly použity mozky z přibližně deseti larev/tuková tělesa ze čtyř larev nebo svaly (společně s kutikulou) ze sedmi larev. Vzorky byly připraveny z pěti nezávislých experimentů.

#### 3.5.2. Izolace RNA

Izolace RNA byla provedena podle protokolu k sadě Direct-zol™ RNA MicroPrep (Zymoresearch) avšak s drobnými změnami:

Zhomogenizované tkáně v 200  $\mu$ l TRIzol reagent (Ambion) byly přemístěny do pokojové teploty a centrifugovány (10 min, 12 000 x g). Supernatant byl přenesen do nové mikrozkušavky, kam se přidalo stejné množství etanolu (96%). Promíchaný mix byl přenesen do kolonky (Zymo-Spin™ IC Column) ve sběrné zkumavce (Collection Tube) a centrifugován (1 min, 12 000 x g). Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky a odpadní filtrát vylit. 400  $\mu$ l promývacího pufru (RNA Wash Buffer) bylo přidáno do kolonky a centrifugováno (1 min, 12 000 x g). Do mikrozkušavky bylo přidáno 5  $\mu$ l DNase I (6 U/ $\mu$ l) a 35  $\mu$ l DNA Digestion Buffer a promícháno. Mix byl přidán přímo na povrch membrány v kolonce a inkubován při pokojové teplotě 15 minut. Poté bylo do kolonky přidáno 400  $\mu$ l promývacího pufru (Direct-zol™ RNA PreWash) a centrifugováno (1 min, 12 000 x g). Odpadní filtrát byl odstraněn a krok byl zopakován. Dále bylo do kolonky přidáno 700  $\mu$ l promývacího roztoku a centrifugováno (3 min, 12 000 x g). Kolonka byla pečlivě přenesena do nové mikrozkušavky. K eluaci RNA bylo do kolonky přidáno 23  $\mu$ l DNase/RNase-Free Water a vše se centrifugovalo (90 s, 12 000 x g). Koncentrace a čistota RNA byla zkontrolována na spektrofotometru NanoDrop (UVS-99 ACTGene).

### 3.5.3. Reverzní transkripce

K 8  $\mu$ l RNA z každého vzorku byl přidán 1  $\mu$ l 50  $\mu$ M oligo(dT) primeru (5' d(TTTTTTTTTTTTTTTTTT) 3') a 1  $\mu$ l 10 mM dNTPs. Promíchaný vzorek byl poté přemístěn do 65 °C na dobu 5 min a pak hned zchlazen na ledu. Pak bylo ke každému vzorku přidáno 4  $\mu$ l 5X PrimeScript pufru, 0,5  $\mu$ l PrimeScript reverzní transkriptázy a 5,5  $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O (vše od TaKaRa). Vzorky byly poté inkubovány 10 minut v 30 °C, 60 minut v 42 °C, 15 minut v 75 °C a pak ochlazeny na ledu. Ke každému vzorku z reverzní transkripce se nakonec přidalo 230  $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O a kvalita cDNA byla zkontrolována na spektrofotometru NanoDrop (UVS-99 ACTGene).

### 3.5.4. q-RT-PCR

Ke 3  $\mu$ l cDNA každého vzorku byla přidána směs obsahující 6  $\mu$ l TP 2x SYBR Master Mix (Top-Bio), 0,25  $\mu$ l 20 $\mu$ M forward primeru (KRD), 0,25  $\mu$ l 20  $\mu$ M reverse primeru (KRD) a 2,5  $\mu$ l PCR ultra H<sub>2</sub>O (Top-Bio). Každý vzorek byl měřen v triplicátech v 96 jamkové destičce (Bio-Rad) pokryté folií Microseal® 'C' Film (Bio-Rad) a polytetrafluoroethylenovou těsnicí podložkou (Bio-Rad) v přístroji CFX 1000 Touch Real-Time Cycler (Bio-Rad) při následujícím protokolu:

95 °C	3 min		
94 °C	15 s denaturace	40x	}
60*/63 °C	30 s nasedání primerů		
72 °C	40 s elongace		
Detekce fluorescence			

Analýza křivky tání k ověření specificity reakce byla provedena v rozmezí 65 – 85 °C/cyklus 0,5 °C.

\* pouze amplifikace genu *Dilp 2*

Data z q-RT-PCR byla analyzována použitím double delta Ct analýzy. Expresí cílových genů byla normalizovaná expresí *Ribozomálního proteinu 49 (Rp49)*. V grafech je relativní exprese cílových genů prezentována jako násobná změna (fold)

change) vzhledem k úrovni relativní exprese stejného genu v odpovídající kontrole, která byla uměle stanovena jako 1.

Sekvence použitých primerů jsou zaznamenány v Tab. 3.

**Tab. 3: Seznam použitých primerů.**

Název primeru	Sekvence primeru	Citace
Dilp 2 Forward	5'TCCCGTGATTCCACACAAAGC3'	*
Dilp 2 Reverse	5'CAGGAAAGAGGGCACTTCGC3'	*
Dilp 3 Forward	5'GTCCAGGCCACCATGAAGTTGTGC3'	(Matsuda et al., 2015)
Dilp 3 Reverse	5'CTTTCCAGCAGGGAACGGTCTTCG3'	(Matsuda et al., 2015)
Dilp 5 Forward	5'TGTTTCGCCAAACGAGGCACCTTGG3'	(Matsuda et al., 2015)
Dilp 5 Reverse	5'CACGATTTGCGGCAACAGGAGTCG3'	(Matsuda et al., 2015)
Dilp 6 Forward	5'TGCTAGTCCTGGCCACCTTGTTTCG3'	(Matsuda et al., 2015)
Dilp 6 Reverse	5'GGAAATACATCGCCAAGGGCCACC3'	(Matsuda et al., 2015)
4E-BP Forward	5'TGATCACCAGGAAGGTTGTCATCTC3'	(Matsuda et al., 2015)
4E-BP Reverse	5'GAGCCACGGAGATTCTTCATGAAAG3'	(Matsuda et al., 2015)
Rp49 Forward	5'AAGCTGTCGCACAAATGGCG3'	(Bajgar et al., 2015)
Rp49 Reverse	5'GCACGTTGTGCACCAGGAAC3'	(Bajgar et al., 2015)

\* nepublikováno, navrhuto a ověřeno členem laboratoře.

Efektivitu reakcí byly zkontrolovány standartní křivkou z desítkového ředění larvální cDNA (dostupné v laboratoři) podle výše popsaného postupu q-RT-PCR.

### 3.6. Detekce proteinů

Proteiny byly detekovány pomocí western blotu.

#### 3.6.1. Příprava vzorků

Potřebné tkáně byly vypitvány z larev v PBS na ledu a přeneseny do mikrozkušavky se 70 µl lyzačního pufru (2% SDS, 60 mM Tris-HCl pH 6.8, 1x mix inhibitorů proteáz (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Sigma-Aldrich) a 1x mix inhibitorů fosfatáz (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific)). Mixy

inhibitorů byly přidány čerstvě před experimentem. Na jeden vzorek byly použity svaly ze šesti larev nebo tuková tělesa z deseti larev. Až byl přenesen celkový počet tkání patřící do jednoho vzorku, vzorek se zhomogenizoval pomocí plastového drtítka a centrifugoval (15 min, 15 000 x g, 4 °C). 50 µl lyzátu bez zbytku tkání bylo přenesen do nové zkumavky. Z 50 µl lyzátu se odebralo 5 µl k stanovení množství proteinů podle BCA protein assay (He, 2011) použitím BCA Protein Assay Kit (Sigma-Aldrich) a protokolu k sadě. 33 µl ze zbytku lyzátu bylo smícháno s 11 µl 4x koncentrovaným nanášecím pufrem (8% SDS, 40% glycerol, 0,010% bromfenolová modř, 20% merkaptoetanol, 250 mM Tris HCl, pH 6,8) v poměru 4:1, zahřáto (70 °C, 10 min) a uskladněno v -20 °C.

### **3.6.2. SDS-PAGE**

Vzorky z -20 °C byly zahřáto (70 °C, 5 min) a přemístěny na led. Stejně množství proteinů v maximálně 20 µl (8 µg z extraktu z tukového tělesa a 15 µg z extraktu ze svalů) a 8 µl proteinového markeru (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad) bylo separováno pomocí SDS-PAGE (elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného). Elektroforéza probíhala na 10% separačním gelu a 5% zaostřovacím gelu v 1x Tris-glycine-SDS pufru (25 mM Tris, 192 mM glycine a 0,1% SDS a pH přibližně 8,3) při napětí 70-120 V po dobu 120-180 minut.

Každý vzorek byl nanesen v duplikátech, jelikož každá sada se později inkubovala s jinou primární protilátkou.

### **3.6.3. Western blot**

Gel z SDS-PAGE byl použit pro elektroforetický transfer mokrou cestou, s použitím transferového pufru (15 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>). Přenos proteinů z gelu na nitrocelulóзовou membránu (Amersham™Protran™0,45 µm NC) probíhal ve 4 °C při konstantním proudu 200 mA 120 minut na magnetické míchačce, kde celá aparatura zůstala přes noc.

Po rozmontování transferové jednotky byly membrány rozděleny na dvě poloviny (každá obsahovala jednu sadu stejných vzorků) pro následnou imunodetekci. Nejdříve ale byly membrány inkubovány 1 h v blokovacím roztoku (5% netučné sušené mléko a 5% BSA v 1x TBST). Poté už byly membrány rozděleny a inkubovány zvlášť 120 minut na parafilmem potaženém sklem ve vlhké komoře

s primárními protilátkami ředěnými v blokovacím roztoku. Jedna polovina membrán byla inkubována s primární králičí protilátkou anti-Akt, 1:1000 (9272, Cell Signaling Technology) a primární krysí protilátkou anti-alfa-*katenin*, 1:1000 (DCAT-1, Development Studies Hybridoma Bank). Druhá polovina membrán byla inkubována s primární králičí protilátkou anti-fosfoSer505-Akt, 1:1000 (4054, Cell Signaling Technology) a primární krysí protilátkou anti-alfa-*katenin*, 1:1000 (DCAT-1, Development Studies Hybridoma Bank). Poté byly membrány promývány třepáním 5 x 5 minut v TBST. Následně byly všechny membrány inkubovány 1 h s kozí anti-králičí sekundární protilátkou konjugovanou s HRP, 1:4000 (Thermo Fisher Scientific). Dále se membrány opět omývaly třepáním 5 x 5 minut v TBST a 1 x 5 minut v H<sub>2</sub>O. K detekci signálu byly membrány inkubovány s chemiluminiscenčním substrátem (SuperSignal ECL substrate, Thermo Fisher Scientific) minimálně jednu minutu a poté se membrány vyfotily na přístroji LAS-3000 Imager (Fujifilm). Poté byly membrány opět omývány třepáním 5 x 5 minut v TBST. Následně byly obě membrány inkubovány 1 h s oslí anti-krysí sekundární protilátkou konjugovanou s HRP, 1:4000 (Thermo Fisher Scientific) a opět se omývaly třepáním 5 x 5 minut v TBST a 1 x 5 minut v H<sub>2</sub>O. K detekci signálu byly membrány inkubovány s chemiluminiscenčním substrátem (SuperSignal ECL substrate, Thermo Fisher Scientific) minimálně jednu minutu a poté se membrány vyfotily na přístroji LAS-3000 Imager (Fujifilm).

Roztok 1x TBST měl složení: 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 150 mM NaCl; 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,1% TWEEN-20.

Kvantifikace proteinů z western blotů byla provedena densitometricky v programu Image J podle pokynů vývojáře programu (Schindelin et al., 2012). Normalizace hodnot pAkt a Akt nanášecí kontrolou spočívala ve vydělení získané hodnoty pro pAkt a Akt získanou hodnotou pro alfa-*katenin*.

### **3.7. Počítání hemocytů**

Larvy v 19 hpi (hodinách po infekci) byly omyty v PBS a každá larva byla přemístěna do 15  $\mu$ l PBS, kde byla pomocí pinzety roztržena. Kutikula byla obrácena pro zajištění vyplavení všech hemocytů do PBS. Aby bylo zabráněno usazení, suspenze s hemocyty byla promáchnuta a 10  $\mu$ l bylo přeneseno do Neubauerova zlepšeného hemocytometru (Assistant). Sklíčko se nechalo v klidu 10 minut, aby se mohly usadit hemocyty. Lamelocyty a



plazmatocyty byly nakonec klasifikovány na základě jejich morfologie a spočteny pod mikroskopem (Leica DM2500 LED) s DIC (diferenciálním interferenčním kontrastem).

### 3.8. Statistika a zpracování dat.

Veškerá statistická analýza a tvorba grafů bylo provedena v programu GraphPad Prism 8. Statistická významnost je v grafech značena: p-hodnota  $\leq 0,05$  jedna hězdička (\*), p-hodnota  $\leq 0,01$  dvě hvězdičky (\*\*), p-hodnota  $\leq 0,001$  tři hvězdičky (\*\*\*). Obrázky western blotů byly upraveny pomocí Zoner Photo Studio 14.

Statistické porovnání množství proteinů na western blotu u infikovaných a kontrolních vzorků nebylo provedeno kvůli malému počtu dat. Pro statistické porovnání infikovaných a kontrolních vzorků při měření genové exprese byl použit nepárový t-test, pouze u porovnání exprese *Dilp 5* v 28 hpi a *4E-BP* v tukovém tělese v 8 hpi byl použit nepárový t-test s Welschovo korekcí na narušení homogenity variancí. Normalita dat byla ověřena Shapiro-Wilkovým testem a homogenita variancí F-testem.

Pro statistické porovnání počtu hemocytů (lamelocytů i plazmatocytů) mezi experimentálním a kontrolním genotypem byla zkontrolována normalita dat D'Agostino-Pearsonovým a Shapiro-Wilkovým testem a homogenita variancí F-testem. Porovnání počtu hemocytů mezi *Srp-Gal4Gal80 x UAS-Upd3 RNAi* a *Srp-Gal4Gal80 x TRIP*; lamelocytů mezi *FB-Gal4Gal80 x UAS-InR<sup>CA</sup>* a *W x UAS-InR<sup>CA</sup>*; plazmatocytů mezi *24B-Gal4Gal80 x UAS-InR<sup>CA</sup>* a *W x UAS-InR<sup>CA</sup>* bylo otestováno pomocí nepárového t-testu. Porovnání počtu lamelocytů mezi *24B-Gal4Gal80 x UAS-InR<sup>CA</sup>* a *W x UAS-InR<sup>CA</sup>* bylo otestováno pomocí nepárového t-testu s Welschovo korekcí na narušení homogenity variancí. Nakonec porovnání počtu plazmatocytů mezi *FB-Gal4Gal80 x UAS-InR<sup>CA</sup>* a *W x UAS-InR<sup>CA</sup>* bylo otestováno pomocí Mann-Whinteyova neparametrického testu.

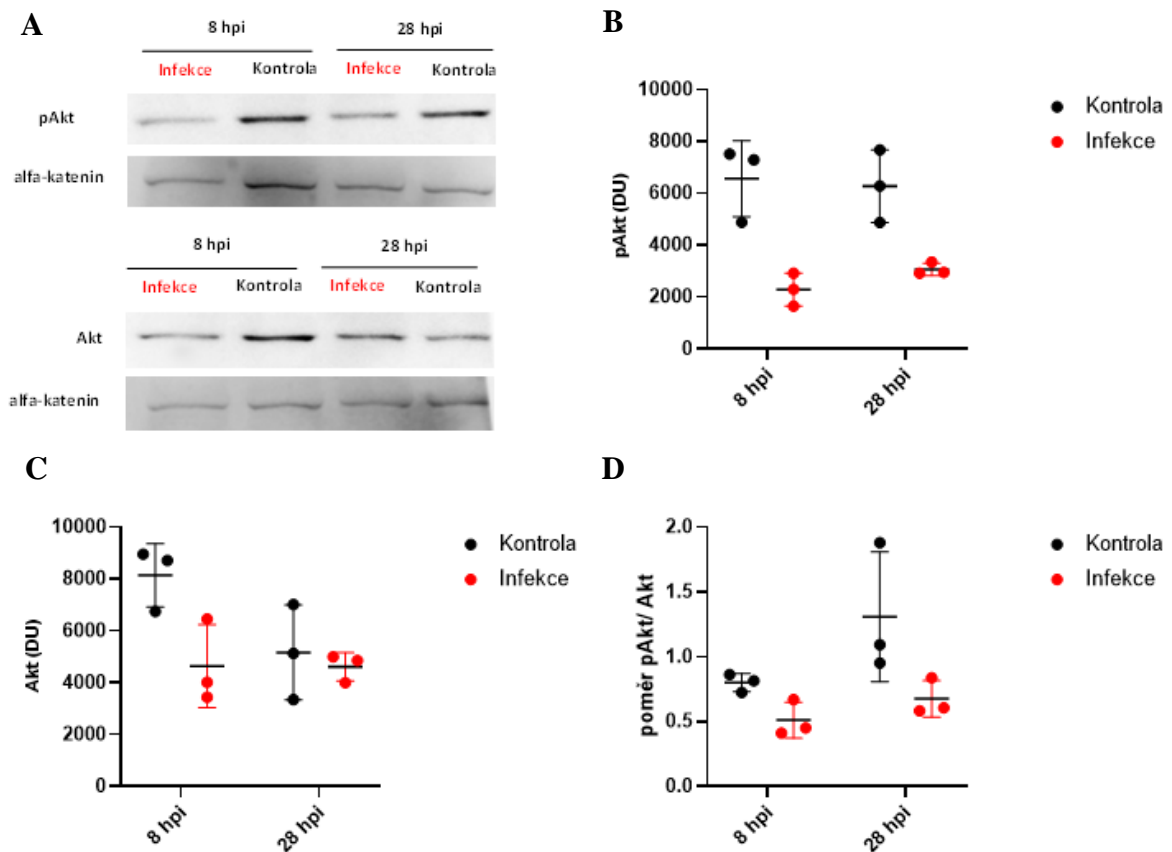
## 4. Výsledky

### 4.1. Inzulínová signalizace je potlačena ve svalech a tukovém tělese larev octomilek při infekci parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi*

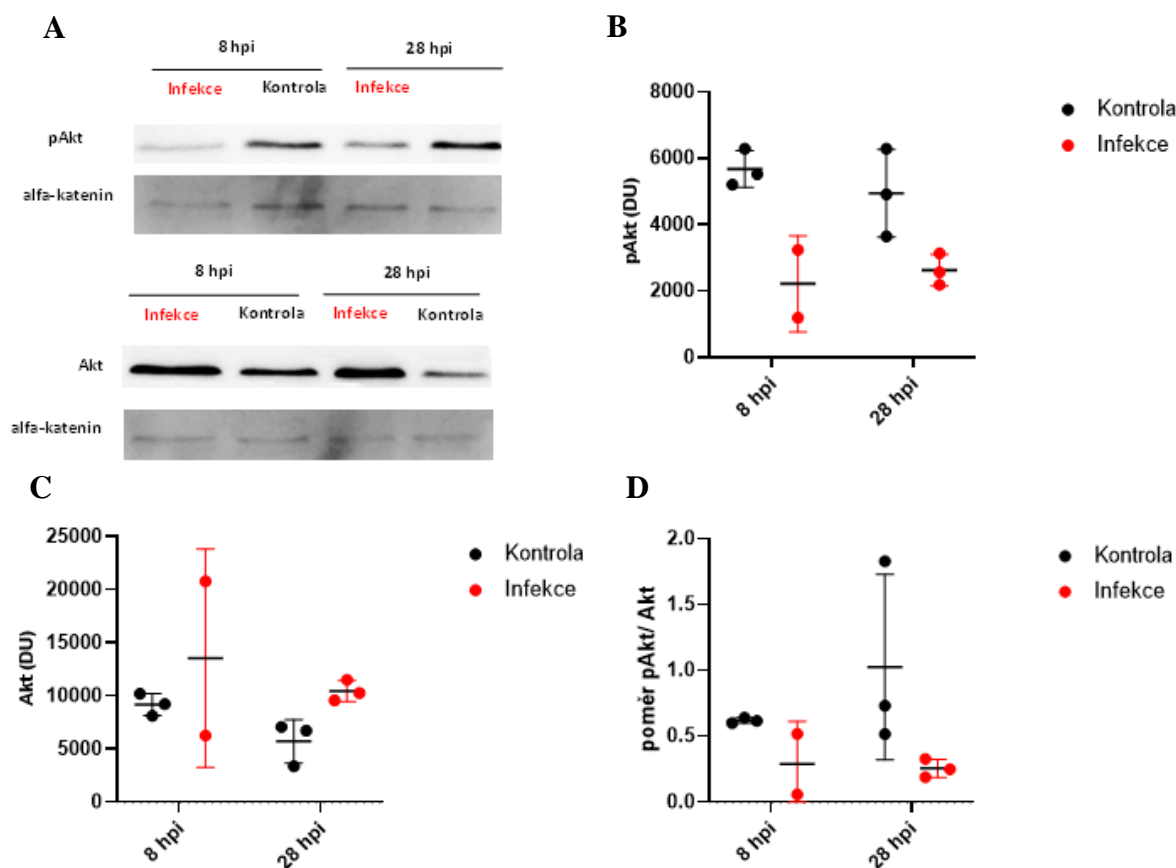
Prvním cílem bylo ověřit hypotézu, že infekce parazitoidní vosičkou u larev octomilek způsobí systemické potlačení inzulínové signalizace. Za tímto účelem byly vybrány dvě periferní tkáně důležité pro systemický metabolismus – larvální tukové těleso a svaly. K sledování aktivity inzulínové signalizace jsem využil metodu western blot umožňující detekci fosforylace proteinu Akt. Míra fosforylace Akt se používá jako marker pro studium inzulínové signalizace, kdy snížení fosforylace značí snížení aktivity inzulínové signalizace (Yang & Hultmark, 2017). Periferní tkáně reprezentované larválním tukovým tělesem a svaly jsou v této kapitole z kontrolní linie W.

Na Obr. 3A je vidět reprezentativní western blot z extraktu ze svalů infikovaných a kontrolních larev z celkem třech western blotů. V rámci jednoho western blotu byla použita jedna sada biologických replikátů, a to v duplikátech. Duplikáty byly použity k stanovení množství fosforylovaného Akt (pAkt) a celkového Akt (Akt) ve stejném vzorku na dvou membránách. Ze všech western blotů jsem kvantifikoval množství pAkt, Akt a stanovil relativní poměr pAkt/Akt pro každý vzorek. Z kvantifikace fosforylovaného Akt (Obr. 3B) a poměru pAkt/Akt (Obr. 3D), který zohledňuje množství celkového Akt ve vzorku (Obr. 3C), vyplývá, že množství fosforylovaného Akt je nižší ve svalech infikovaných larev oproti neinfikovaným kontrolám, a to jak v 8 hodinách po infekci (hpi), tak v 28 hpi. Obdobné výsledky byly získány i v případě kvantifikace množství alfa-keninu, který sloužil jako nanášecí kontrola a kterým bylo normalizováno množství pAkt a Akt (Obr. P1).

Reprezentativní western blot z extraktu z tukového tělesa z celkem třech nezávislých experimentů je vidět na Obr. 4A. Opět jsem z jednotlivých experimentů kvantifikoval množství fosforylovaného Akt, celkového Akt a stanovil relativní poměr pAkt/Akt pro každý vzorek. Z kvantifikace fosforylovaného Akt (Obr. 4B) a poměru pAkt/Akt (Obr. 4D), který zohledňuje množství celkového Akt ve vzorku (Obr. 4C), je opět patrné, že množství fosforylovaného Akt je nižší v tukovém tělese infikovaných larev oproti neinfikovaným kontrolám v 8 hpi i 28 hpi. Podobné výsledky byly získány i v případě kvantifikace množství alfa-keninu, který sloužil jako nanášecí kontrola a kterým bylo normalizováno množství pAkt a Akt (Obr. P2).



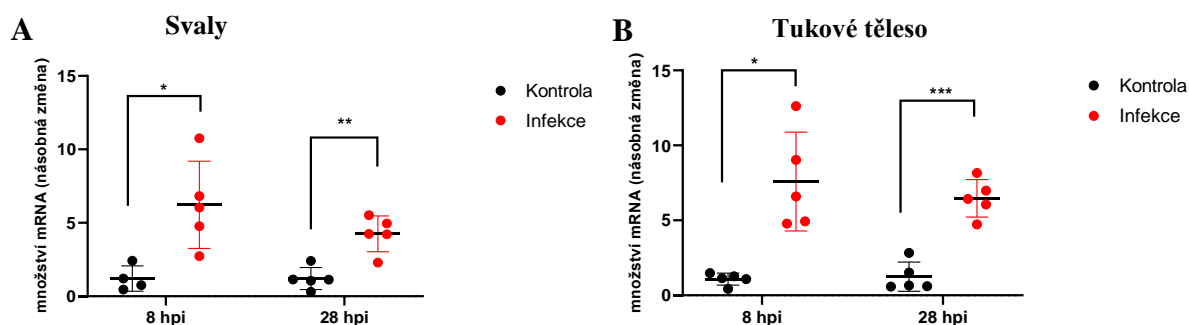
**Obr. 3: Reprezentativní western blot (A) a kvantifikace western blotů (B-D) z extraktu ze svalů z infikovaných larev W v 8 hpi a 28 hpi v porovnání s neinfikovanými kontrolami.** (A) Membrány se stejnými vzorky byly inkubovány s anti-fosfoAkt/anti-Akt protilátkami a anti-alfa-katenin protilátkami sloužícími jako nanášecí kontrola. (B-D) Na ose X jsou zapsány jednotlivé časy po infekci. (B-C) Na ose Y je vyneseno množství fosforylovaného Akt (pAkt) (B) a celkového Akt (Akt) (C) v densitometrických jednotkách (DU) získaných densitometrickou kvantifikací western blotů v programu ImageJ. (D) Na ose Y je vyneseno relativní poměr pAkt/Akt. (B-D) Vodorovné linie ukazují průměr a směrodatnou odchylku. Body v grafu reprezentují biologické replikáty. Na každý biologický replikát byly použity svaly ze šesti larev.



**Obr. 4: Reprezentativní western blot (A) a kvantifikace western blotů (B-D) z extraktu z tukového tělesa z infikovaných larev W v 8 hpi a 28 hpi v porovnání s neinfikovanými kontrolami.** (A) Membrány se stejnými vzorky byly inkubovány s anti-fosfoAkt/anti-Akt protilátkami a anti-alfa-katenin protilátkami sloužícími jako nanášecí kontrola. (B-D) Na ose X jsou zapsány jednotlivé časy po infekci. (B-C) Na ose Y je vyneseno množství fosforylovaného Akt (pAkt) (B) a celkového Akt (Akt) (C) v densitometrických jednotkách (DU) získaných densitometrickou kvantifikací western blotů v programu ImageJ. (D) Na ose Y je vyneseno relativní poměr pAkt/Akt. (B-D) Vodorovné linie ukazují průměr a směrodatnou odchylku. Body v grafu reprezentují biologické replikáty. Na každý biologický replikát byly použity tuková tělesa z deseti larev.

Dohromady tyto data na základě porovnání množství aktivního (fosforylovaného) Akt mezi kontrolou a infekcí ukazují, že inzulínová signalizace je potlačena při infekci v tukovém tělese a svalech. Jelikož bylo stejného výsledku dosaženo opakovaně, lze ho považovat za významný, nicméně z důvodu malého počtu opakování a očekávané variability v kvantifikaci proužků z western blotu nemělo smysl použít statistickou analýzu. Proto jsem se rozhodl tento výsledek ověřit změřením exprese genu *4E-BP* použitím přesněji kvantifikovatelné kvantitativní PCR. Exprese genu *4E-BP* se používá jako marker pro studium IS, kdy zvýšená exprese poukazuje na snížení IS (Pasco & Léopold, 2012). Z výsledků je patrné, že exprese genu *4E-BP* je signifikantně zvýšena jak ve svalech

(Obr. 5A), tak v tukovém tělese (Obr. 5B) v 8 hpi i 28 hpi, a lze tak konstatovat, že naše hypotéza byla ověřena.

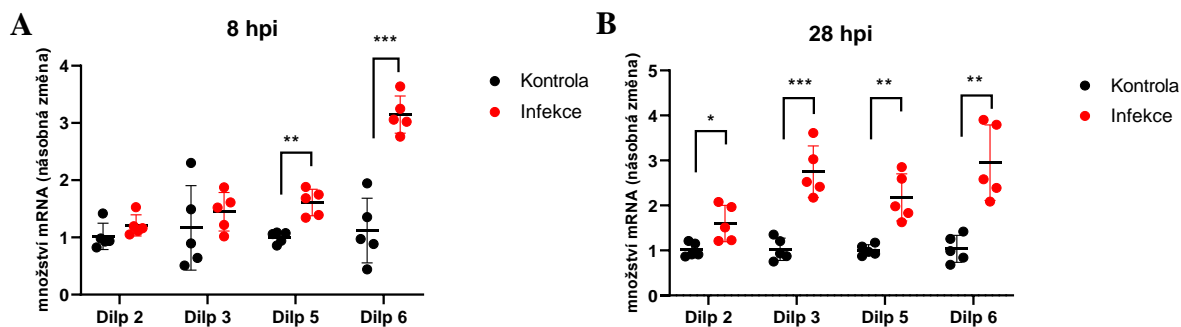


**Obr. 5: Relativní míra exprese genu *4E-BP* ve svaích (A) a tukovém tělese (B) infikovaných W larev v 8 a 28 hpi (červené body) v porovnání s neinfikovanými kontrolami (černé body).** Na ose X jsou zapsány jednotlivé časy po infekci a na ose Y je násobná změna (fold change) relativní exprese genu *4E-BP* vzhledem k úrovni relativní exprese *4E-BP* v neinfikované kontrole v daném čase, která byla uměle stanovena jako 1. Body v grafu reprezentují biologické replikáty. Na každý biologický replikát byly použity tuková tělesa ze čtyř larev/svaly ze šesti larev. Vodorovné linie ukazují průměr a směrodatnou odchylku. P-hodnoty byly získány použitím nepárového t-testu, pouze p-hodnota  $\leq 0,01$  (\*) u tukového tělesa v 8 hpi byla získána nepárovým t-testem s Welschovo korekcí. Statistická významnost značena hvězdičkami: (\*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,01$ ; \*\*\*  $\leq 0,001$ ).

#### 4.2. Inzulínová signalizace je potlačena z důvodu vzniku inzulínové rezistence

Dalším cílem bylo zjistit, zda objevené potlačení inzulínové signalizace ve svaích a tukovém tělese larev po infekci parazitoidní vosičkou je způsobené vznikem inzulínové rezistence, nebo inzulínové deficeince. Rozhodl jsem se proto změřit expresi *Dilps* (*Drosophila insulin-like peptides*) exprimovaných v larválním stádiu pomocí kvantitativní PCR u larev W opět v časech 8 a 28 hpi.

Na základě dostupných dat o síle a místě exprese *Dilps* v larválním stádiu z online databáze flybase.org jsem se rozhodl změřit expresi *Dilp 2*, *Dilp 3* a *Dilp 5* v mozku a *Dilp 6* v tukovém tělese. Z analýzy mRNA jsem zjistil, že v 8 hpi (Obr. 6A) i 28 hpi (Obr. 6B) není exprese žádného zkoumaného *Dilps* nižší u infikovaných larev oproti kontrole. Navíc kromě exprese *Dilp 2* a *Dilp 3* v 8 hpi, exprese ostatních *Dilps* je signifikantně vyšší při infekci oproti kontrole. Na základě těchto dat lze usoudit, že by inzulínová signalizace měla být potlačena v tukovém tělese a svaích při infekci z důvodu vzniku inzulínové rezistence a ne z důvodu nedostatku inzulínu.



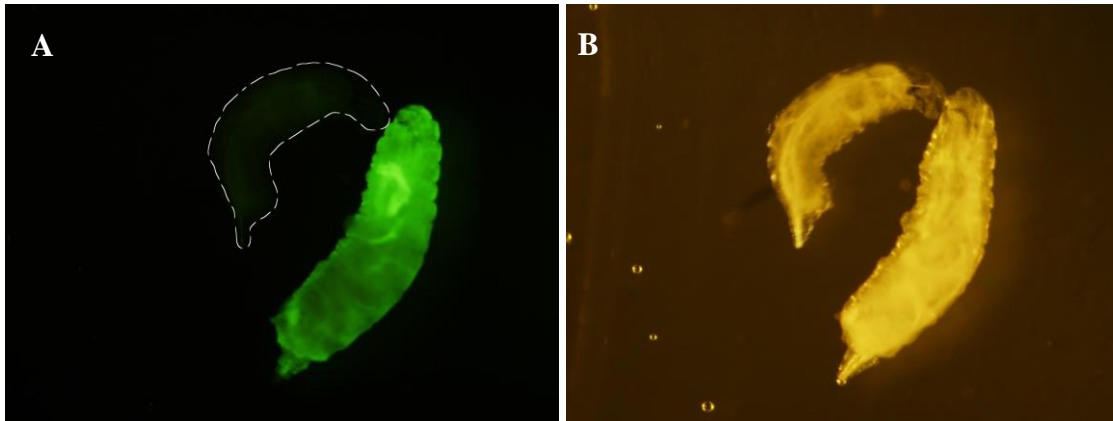
**Obr. 6:** Relativní míra exprese genů *Dilp 2*, *Dilp 3* a *Dilp 5* v mozku a genu *Dilp 6* v tukovém tělese infikovaných *W* larev (červené body) v 8 hpi (A) a 28 hpi (B) v porovnání s neinfikovanými kontrolami (černé body). Na ose X jsou zapsány jednotlivé měřené geny a na ose Y je násobná změna (fold change) relativní exprese určitého genu vzhledem k úrovni relativní exprese stejného genu v neinfikované kontrole, která byla uměle stanovena jako 1. Body v grafu reprezentují biologické replikáty. Na každý biologický replikát byly použity tuková tělesa ze čtyř larev/mozek z deseti larev. Vodorovné linie ukazují průměr a směrodatnou odchylku. P-hodnoty byly získány použitím nepárového t-testu, pouze p-hodnota  $\leq 0,01$  (\*\*) u *Dilp 5* v 28 hpi byla získána nepárovým t-testem s Welschovo korekcí. Statistická významnost značena hvězdičkami: (\*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,01$ ; \*\*\*  $\leq 0,001$ ).

### 4.3. Inzulínové rezistence je důležitá v periferních tkáních pro efektivitu akutní

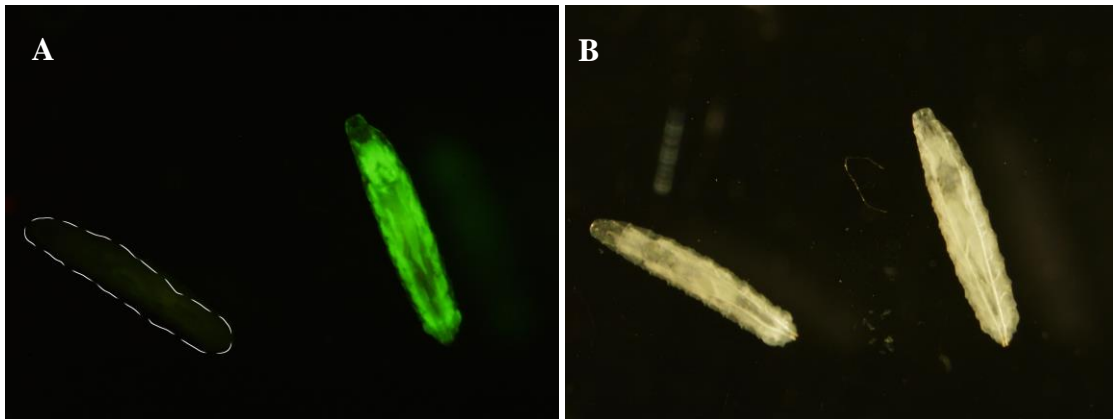
#### imunitní odpovědi proti parazitoidní vosičce *Leptopilina boulardi*

Dalším cílem bylo zjistit, zda je infekcí indukovaná inzulínová rezistence (IR) v periferních tkáních důležitá pro akutní efektivní imunitní reakci. K testování této důležitosti vzniku IR jsem použil neutralizaci IR pomocí exprese konstitutivně aktivní formy inzulínového receptoru (*InR<sup>CA</sup>*) v periferních tkáních. Efektivita akutní imunitní odpovědi byla poté analyzována na základě porovnání počtu lamelocytů u infikovaných larev s konstitutivně aktivním inzulínovým receptorem v periferních tkáních oproti kontrole. Pro tkáňově a časově specifickou expresi konstitutivně aktivního inzulínového receptoru byl použit UAS-Gal4Gal80 systém.

Pro možnost indukovat expresi *InR<sup>CA</sup>* pouze ve svalech a jen v určitý čas jsem vytvořil linii 24B-Gal4Gal80, u které jsem ověřil přítomnost teplotně senzitivního proteinu Gal80 skřížením s linií UAS-GFP. Linie 24B-Gal4Gal80 x UAS-GFP vykazovala svalově specifickou fluorescenci GFP po 24 hodinách v 29 °C a téměř nedetekovatelnou při vývoji v 18 °C (Obr. 7). Podobně byla u linie FB-Gal4Gal80 také ověřena tkáňová specifita a přítomnost Gal80 skřížením s linií UAS-GFP. Linie FB-Gal4Gal80 x UAS-GFP vykazovala opět silnou tukově specifickou fluorescenci GFP po 24 hodinách v 29 °C a téměř nedetekovatelnou při vývoji v 18 °C (Obr. 8).



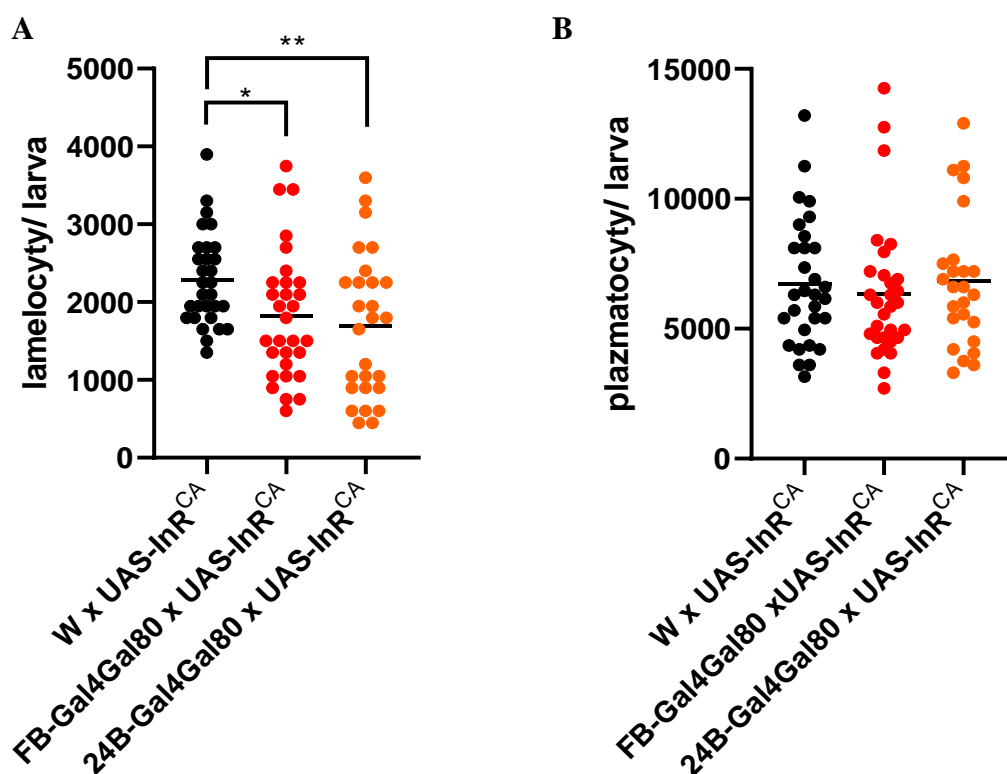
**Obr. 7: Ověření funkčnosti *24B-Gal4Gal80* konstruktů.** Pro tyto účely byla vytvořena linie *24B-Gal4Gal80 x UAS-GFP*. Na fluorescenčním snímku (A) je patrná fluorescence GFP ve svalech jen u larev přesunutých na 24 h do 29 °C (vpravo) a ne u larev vyvíjejících se pouze při 18 °C (vlevo – čárkovane ohraničené). Ohraničení vzniklo na základě fotky larev ve světelném poli (B). Larvy jsou staré přibližně 96 h.



**Obr. 8: Ověření funkčnosti *FB-Gal4Gal80* konstruktů.** Pro tyto účely byla vytvořena linie *FB-Gal4Gal80 x UAS-GFP*. Na fluorescenčním snímku (A) je patrná silná fluorescence GFP v tuku jen u larev přesunutých na 24 h do 29 °C (vpravo) a ne u larev vyvíjejících se pouze při 18 °C (vlevo – čárkovane ohraničené). Ohraničení vzniklo na základě fotky larev ve světelném poli (B). Larvy jsou staré přibližně 96 h.

Po ověřovacích experimentech jsem při vlastních experimentech studoval efektivitu imunitní odpovědi u larev přesunutých 24 h před infekcí z 18 °C do 29 °C k indukci exprese *InR<sup>CA</sup>*. Z těchto experimentů jsem zjistil (Obr. 9A), že larvy s konstitutivně aktivním inzulínovým receptorem ve svalech (*24B-Gal4Gal80 x UAS-InR<sup>CA</sup>*) i larvy s konstitutivně aktivním inzulínovým receptorem v tukovém tělese (*FB-Gal4Gal80 x UAS-InR<sup>CA</sup>*) vykazují signifikantně nižší počet lamelocytů než kontrolní genotyp (*W x UAS-InR<sup>CA</sup>*), ale nesignifikantní rozdíl v počtu plazmatocytů (Obr. 9B). Nižší počet lamelocytů a srovnatelný počet plazmatocytů u larev s geneticky neutralizovanou inzulínovou rezistencí v periferních

tkáních značí, že inzulínová rezistence je pravděpodobně nutná pro správnou funkci imunitního systému a že neovlivňuje hematopoézu.



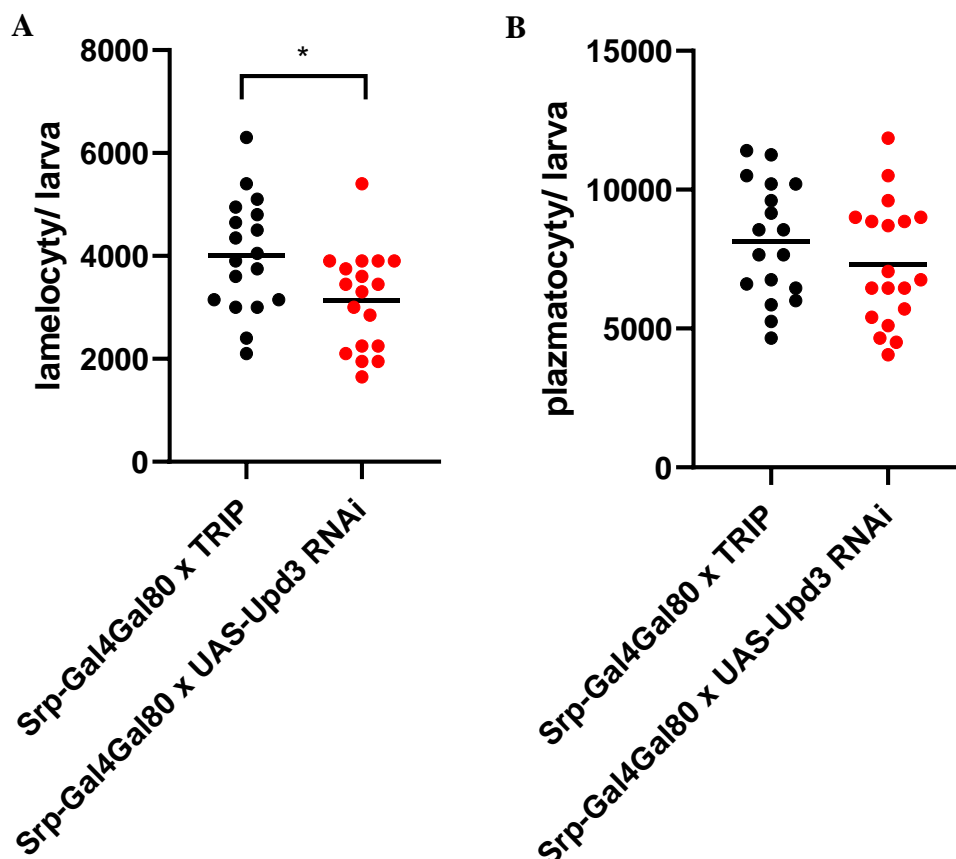
**Obr. 9:** Počet lamelocytů (A) a plazmatocytů (B) u infikovaných larev s konstitutivně aktivním inzulínovým receptorem v tukovém tělese (červené body), ve svalech (oranžové body), a jejich kontroly (černé body) v 19 hpi. Na ose X jsou zapsány jednotlivé genotypy, na ose Y je vynesena počet hemocytů. Každý bod reprezentuje počet hemocytů v jedné larvě. Graf kombinuje výsledky ze dvou nezávislých experimentů. Vodorovná linie ukazuje průměrnou hodnotu. P-hodnota  $\leq 0,05$  (\*) byla získána použitím nepárového t-testu, p-hodnota  $\leq 0,01$  (\*\*) byla získána nepárovým t-testem s Welschovo korekcí.

#### 4.4. Vliv Jak-Stat signalizace na indukci inzulínové rezistence ve svalech při infekci parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi*

Ke splnění posledního cíle, čili ke zjištění, zda se na vzniku inzulínové rezistence ve svalech po infekci parazitoidní vosičkou podílí Jak-Stat signalizace, jsem sledoval pomocí western blotu hlavní marker aktivity inzulínové signalizace (fosforylaci Akt) u larev s potlačenou expresí ligandu Jak-Stat signalizace *Upd3* specificky v hemocytech pomocí *Srp-Gal4* a *UAS-Upd3 RNAi*. K potlačení exprese genu *Upd3* až při infekci byl použit *UAS-Gal4Gal80* systém. Záměrem bylo porovnat po infekci množství fosforylovaného Akt u larev se sníženou aktivitou Jak-Stat signalizace a kontrolním genotypem.



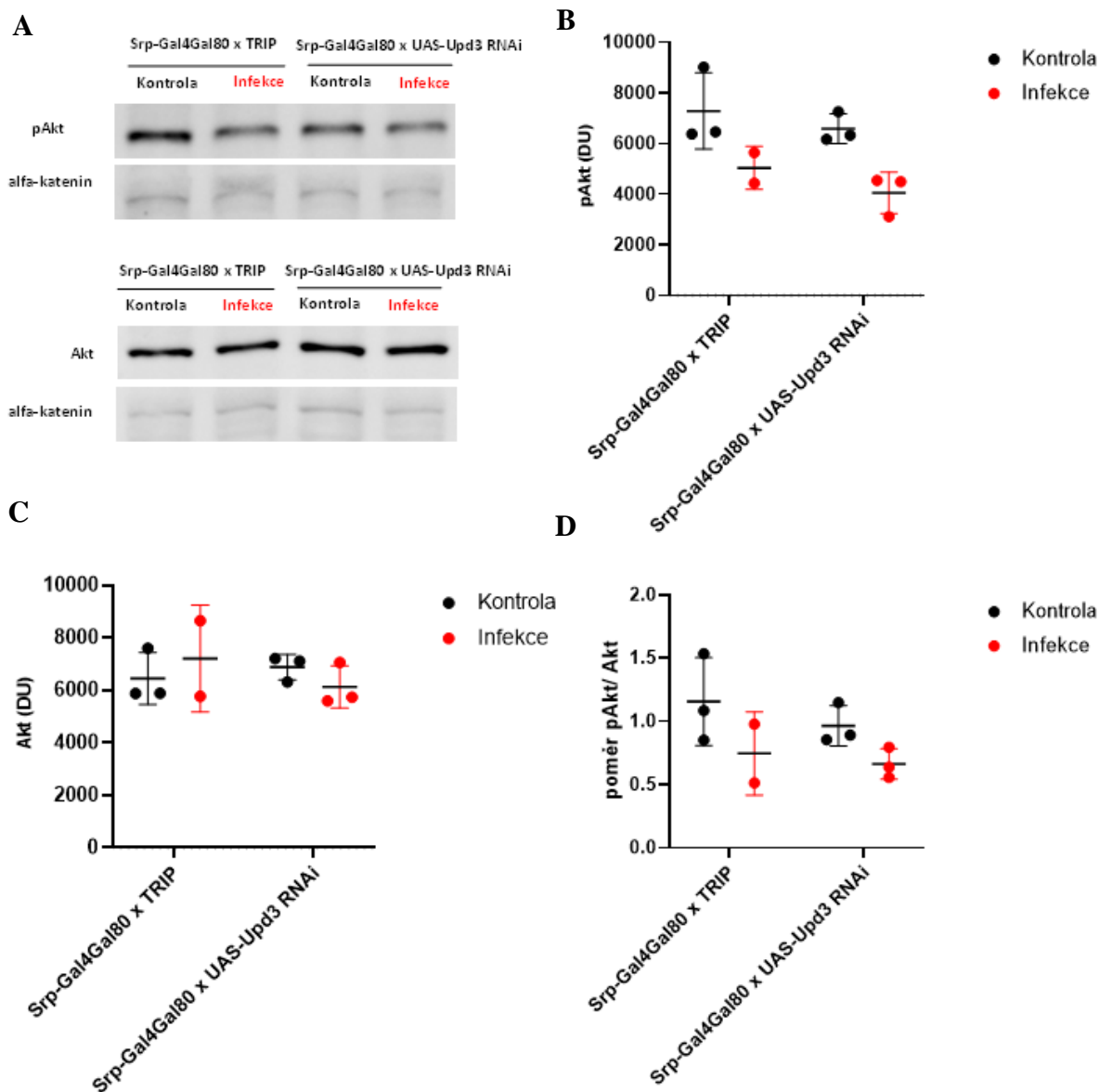
Funkčnost RNAi u larev *Srp-Gal4Gal80 x UAS-Upd3 RNAi* byla ověřena na základě důležitosti *Upd3* pro imunitní odpověď (Yang et al., 2015). Zjistil jsem, že infikované larvy *Srp-Gal4Gal80 x UAS-Upd3 RNAi* nevykazují signifikantní rozdíl v počtu plazmatocytů, ale vykazují signifikantně nižší počet lamelocytů, ve srovnání s larvami z kontrolního genotypu *Srp-Gal4Gal80 x TRIP* (Obr. 10).



**Obr. 10:** Počet lamelocytů (A) a plazmatocytů (B) u infikovaných larev s potlačenou expresí genu *Upd3* v hemocytech (červené body) a její kontroly (černé body) v 19 hpi. Na ose X jsou zapsány jednotlivé genotypy, na ose Y je vynesena počet hemocytů. Každý bod reprezentuje počet hemocytů v jedné larvě. Graf kombinuje výsledky ze dvou nezávislých experimentů. Vodorovná linie ukazuje průměrnou hodnotu. P-hodnota  $\leq 0,05$  (\*) byla získána použitím nepárového t-testu.

Na Obr. 11A je vidět reprezentativní western blot z extraktu ze svalů z larev *Srp-Gal4Gal80 x UAS-Upd3 RNAi* a *Srp-Gal4Gal80 x TRIP* v 8 hpi a odpovídajících neinfikovaných kontrol. Ze třech biologických replikátů jsem kvantifikoval množství fosforylovaného Akt (pAkt), celkového Akt (Akt) a stanovil relativní poměr pAkt/Akt pro každý vzorek. Z kvantifikace fosforylovaného Akt (Obr. 11B) a poměru pAkt/Akt (Obr. 11D), který zohledňuje množství celkového Akt ve vzorku (Obr. 11C), vyplývá, že množství fosforylovaného Akt je nižší ve svalech infikovaných larev oproti neinfikovaným kontrolám,

a to u obou genotypů. Poměr pAkt/Akt a množství pAkt ale neukazuje, že množství fosforylovaného Akt je víc ve svalech infikovaných larev Srp-Gal4Gal80 x UAS-Upd3 RNAi oproti Srp-Gal4Gal80 x TRIP. Na základě těchto dat proto nelze potvrdit, že se Jak-Stat signalizace podílí na indukci IR ve svalech při akutní fázi infekce parazitoidní vosičkou.



**Obr. 11: Reprezentativní western blot (A) a kvantifikace western blotů (B-D) ukazujících množství pAkt a Akt ve svalech larev s potlačenou Jak-Stat signalizací v 8 hpi a kontrolách.** Larvy s potlačenou Jak-Stat signalizací jsou genotypu Srp-Gal4Gal80 x UAS-Upd3 RNAi a larvy kontrolního genotypu Srp-Gal4Gal80 x TRIP. (A) Membrány se stejnými vzorky byly inkubovány s anti-fosfoAkt/anti-Akt protilátkami a anti-alfa-katenin protilátkami sloužícími jako nanášecí kontrola. (B-D) Na ose X jsou zapsány jednotlivé genotypy. (B-C) Na ose Y je vyneseno množství fosforylovaného Akt (pAkt) (B) a celkového Akt (Akt) (C) v densitometrických jednotkách (DU) získaných densitometrickou kvantifikací western blotů v programu ImageJ. (D) Na ose Y je vyneseno relativní poměr pAkt/Akt. (B-D) Vodorovné linie ukazují průměr a směrodatnou odchylku. Body v grafu reprezentují biologické replikáty. Na každý biologický replikát byly použity svaly ze šesti larev.

## 5. Diskuze

Infekce larev octomilek *Drosophila melanogaster* parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi* se ukazuje jako důležitý model ke studiu imunometabolismu. Právě na tomto modelu byl poprvé experimentálně ověřen nový teoretický koncept sobeckého imunitního systému (Straub, 2014), podle kterého je imunitní systém zvýhodňován při přerozdělování energie při infekci, jelikož funkce imunitního systému je při této stresové reakci životně důležitá. Důkazy přinesl Bajgar et al. (2015) zjištěním, že systemický metabolický přesmyk je opravdu nezbytný pro efektivní imunitní reakci a že imunitní buňky při imunitní reakci, která je energeticky náročný proces, potřebují zvýšený příjem energie. Toho je dosaženo snížením příjmu energie periferními tkáněmi a uvolňováním energie ze zásob (Bajgar et al., 2015). Nedávno v naší laboratoři byla také popsána změna metabolismu imunitních buněk (Krejčová et al., 2019) a pomocí zmíněného modelu byl objeven signál z imunitních buněk zprostředkovávající systemický metabolický přesmyk (Bajgar et al., 2015). Dále model slouží k zjišťování, jak imunitní buňky získávají energii. Avšak potlačení metabolismu periferních tkání při infekci zůstalo málo prozkoumané, a proto jsem se na toto téma zaměřil v mé práci. Jelikož je hlavním zdrojem energie při imunitní reakci pro imunitní systém glukóza (Bajgar et al., 2015) a u octomilky i trehalóza (dosud nepublikováno), soustředil jsem se na inzulínovou signalizaci, jednu z hlavních signalizací podílející se na metabolismu sacharidů.

### **5.1. Inzulínová signalizace je potlačena ve svalech a tukovém tělese larev octomilek při infekci parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi***

Prvním cílem bylo zjistit, zda je v časně fázi imunitní odpovědi proti parazitoidní vosičce u larev octomilek nižší příjem glukózy periferními tkáněmi (Bajgar et al., 2015) způsoben systemickým potlačením inzulínové signalizace (IS). Snížení IS v periferních tkáních bylo popsáno u řady infekcí octomilky (DiAngelo et al., 2009; Dionne et al., 2006; Libert, Chao, Zwiener, & Pletcher, 2008), navíc potlačení IS v tukovém tělese i svalech po infekci parazitoidní vosičkou v pozdních časech už ukázal Yang & Hultmark (2017). Zajímavý je ale brzký čas po infekci (<<48h), kdy dochází k rozpoznání vajíčka, tvorbě lamelocytů a kdy je potřeba systemický metabolický přesmyk (Bajgar et al., 2015). Protože imunitní odpověď je dynamický proces, byly vybrány 2 časy k lepšímu popisu – 8 hodin po infekci (hpi) a 28 hpi.

K analýze inzulínové signalizace při infekci jsem použil markery aktivity IS jako je fosforylace kinázy Akt a aktivita transkripčního faktoru FOXO. Pomocí western blotu je ale

problematické detekovat množství fosforovaného Akt (pAkt) a celkového Akt (Akt) na jedné membráně, protože rozdíl ve velikost v kDa mezi fosforylovanou a nefosforylovanou formu Akt je nepatrný a na membráně by se obě formy detekovaly ve stejné oblasti. Proto byly identické sady vzorků nanášeny v duplikátech na SDS-PAGE. Po přenosu proteinů z gelu na membránu byla membrána rozstřížena na polovinu. Polovina membrány se inkubovala s primárními protilátkami anti-Akt a polovina s protilátkami anti-pAkt. Obě poloviny se také inkubovaly s primárními protilátkami proti alfa-*kateninu*, který byl zvolen jako nanášecí kontrola.

Data z western blotů ukázaly, že při infekci je v periferních tkáních reprezentovaných larválním tukovým tělesem a svaly méně fosforylovaného Akt. Menší míra fosforylace značí menší aktivitu inzulínové signalizace mohla být viděna jak z reprezentativních western blotů, tak především z kvantifikace pAkt a poměru pAkt/Akt. To vše navíc i v případě normalizace množství pAkt a Akt alfa-*kateninem*. Tyto výsledky byly nakonec ale zahrnuty do přílohy a upřednostněny byly výsledky bez normalizace. Není totiž jisté, že se množství alfa-*kateninu* nemění, ačkoli byl alfa-*katenin* již použit jako nanášecí kontrola pro western blot (Peterson-Nedry et al., 2008). Navíc se takto do grafů porovnávaných kvantifikované množství proteinů ze třech western blotů (třech nezávislých experimentů) další kvantifikací vnáší kromě biologické variability i větší míra variability pocházející z technického provedení western blotů. Jelikož množství nanášených proteinů bylo ale sjednoceno měřením koncentrace proteinů ve vzorku a množství pAkt bylo ještě i porovnáno s množstvím celkového Akt ve stejném vzorku, výsledky bez normalizace jsou věrohodné. Navíc korelují se získanými výsledky s normalizací.

Získané výsledky i přes různé možnosti kvantifikace ukázaly, že inzulínová signalizace je potlačena ve svalech a larválním tukovém tělese již v 8 hpi a 28 hpi. Tyto data doplňují, ale jsou i částečně v rozporu s výsledky Yang & Hultmark (2017), kteří ukázali pomocí western blotu a poměru pAkt/Akt, že IS je při vosí infekci signifikantně potlačena až v 50 hpi ve svalech. Dále Yang & Hultmark (2017) pomocí fluorescenčního reportéru IS ukázali, že IS je při vosí infekci potlačena až v 50 hpi i v tukovém tělese. Důvodem neobjevení časného potlačení by mohla být slabší nebo jinak nastavená infekce. Např. podle předchozí práce (Yang et al., 2015) nechávali vosy infikovat delší dobu (2 h), při vyšší teplotě (29 °C) a především na mladších larvičkách (časný druhý instar). Larva je ale schopna reagovat tvorbou lamelocytů až ve třetím instaru (Bajgar et al., 2015).

Přestože výsledky opakovaně ukázaly nižší fosforylaci Akt po infekci, kvůli obtížnému statistickému vyhodnocení byly výsledky ověřeny měřením exprese genu *4E-BP*, jedním z cílů inzulín dependentního transkripčního faktoru inhibovaného kinázou Akt – FOXO (Puig, 2003). Detekovaná zvýšená exprese *4E-BP* je charakteristickým znakem pro snížení IS (Levitin et al., 2007), a proto byla ověřena hypotéza, že inzulínová signalizace je potlačena ve svalech a tukovém tělese larev octomilky při infekci parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi*.

## **5.2. Inzulínová signalizace je potlačena z důvodu vzniku inzulínové rezistence**

Dalším cílem bylo potvrdit, že systemické snížení inzulínové signalizace při vosí infekci je způsobeno vznikem inzulínové rezistence, a ne nedostatkem inzulínu (Dilps). Tato hypotéza vychází z předpokladu z teoretického konceptu (Straub, 2014), podle kterého by přenechání energie imunitnímu systému mělo být alespoň částečně způsobeno vznikem inzulínové rezistence (IR) v periferních tkáních.

Pomocí měření exprese hlavních *Dilps* exprimovaných v larválním stádiu (Grönke et al., 2010) ve stanovených časech 8 a 28 hpi jsem se pokusil vyvrátit, že by potlačení IS bylo způsobeno nedostatkem Dilps. Důvodem potlačení IS by pak zůstával vznik IR. Jelikož exprese *Dilps* je relativně nízká v rámci celé larvy (Nässel et al., 2015), byla exprese změřena v tkáních s nejvyšší expresí a z více jedinců. Zjistil jsem, že exprese žádného *Dilp* nebyla snížena, naopak kromě exprese *Dilp 2* a *Dilp 3* v 8 hpi byly exprese všech *Dilps* po infekci zvýšené. Nesignifikantnost exprese *Dilp 3* vychází pravděpodobně proto, že exprese *Dilp 3* u kontroly v 8 hpi vykazuje velkou variabilitu. Důvodem by mohlo být, že exprese *Dilp 3* stejně jako exprese *Dilp 6* není konstantní ve vývoji larvy, a to i okolo studovaných časů (Slaidina, Delanoue, Gronke, Partridge, & Léopold, 2009) a běžná časová synchronizace larev nestačí.

Mé zjištění se také shoduje s charakteristickými znaky IR, kdy jeden z nich je, že dochází k vyšší produkci inzulínu. Mimo to je IR charakterizována u octomilky potlačením inzulínové signalizace (ukázáno v minulé kapitole) a hyperglykemií (Bajgar et al., 2015). Mnou zjištěná zvýšená exprese *Dilps* u infikovaných jedinců se shoduje i s analýzami *Dilp 2*, *Dilp 3* a *Dilp 5* u octomilky s IR indukovanou vysokocukernou dietou (Musselman et al., 2017; Pasco & Léopold, 2012), které ukazují zvýšenou expresi *Dilp 2*, *Dilp 3* a *Dilp 5*. Na základě získaných výsledků jsem tedy vyvodil závěr, že snížení inzulínové signalizace

není pravděpodobně z důvodu nedostatku inzulínu (Dilps), ale díky necitlivosti k inzulínu (Dilps) – vzniku inzulínové rezistence.

K jednoznačnému potvrzení je ovšem nutné vyloučit blokovanou sekreci Dilps do hemolymfy např. pomocí ELISA jako Musselman et al. (2017), Pasco & Léopold (2012). V těchto pracích se zaměřili pouze na Dilp 2 a Dilp 5, ale nárůst exprese *Dilp 2* a *Dilp 5* byl srovnatelný s nárůstem množstvím Dilp 2 a Dilp 5 v hemolymfě. Pro ověření vzniku IR se také nabízí experiment, kdy by se pomocí western blotu ověřovalo, zda exogenně podaný inzulín dokáže méně fosforylovat Akt v infikovaných jedincích než kontrolách (Woodcock et al., 2015).

I přes tato následná nutná ověření jsem poskytl první věrohodná data ukazující, že by snížení IS v periferních tkáních v larvě octomilky v časně fázi imunitní reakce po infekci parazitoidní vosičkou mělo být z důvodu vzniku IR. Poprvé jsem mimo to také změřil expresi *Dilps* larev po infekci parazitoidní vosičkou.

I když jsem se v této sekci zaměřil na měření *Dilps* k vyloučení inzulínové deficiencie, vyšší exprese *Dilp 6* v tukovém tělese infikovaných larev potvrzuje výsledek z předchozí kapitoly, že dochází k snížení inzulínové signalizace v tukovém tělese po infekci. *Dilp 6* je pozitivně regulován transkripčním faktorem FOXO (Slaidina et al., 2009), jako například 4E-BP z předchozí kapitoly.

### **5.3. Inzulínové rezistence je důležitá v periferních tkáních pro efektivitu akutní imunitní odpovědi proti parazitoidní vosičce *Leptopilina boulardi***

Třetím cílem bylo zjistit důležitost inzulínové rezistence v larválních svalech a tukovém tělese pro efektivitu imunitní reakce proti parazitoidní vosičce. Nedávno se Yang & Hultmark (2017) pokusili dozvědět něco o roli potlačení inzulínové signalizace ve svalech při infekci parazitoidní vosičkou, ale použitím overexprese *InR* neukázali změny v úspěšnosti enkapsulace vajíčka, ukazatele efektivitu imunitní reakce. Důvodem může být to, že overexprese *InR* nestačí k neutralizování IR. *InR* je řazen mezi cílová místa FOXO a je stejně jako 4E-BP více exprimován při potlačení IS (Hull-Thompson et al., 2009; Pasco & Léopold, 2012). K neutralizování potlačení IS by měla ale sloužit konstitutivně aktivní forma inzulínového receptoru  $InR^{CA}$  (DiAngelo et al., 2009).

Moje data s použitím konstitutivně aktivního inzulínového receptoru specificky jen ve svalech nebo tuku ukázala, že se tvoří méně lamelocytů a tím pádem se imunitní odpověď

stává méně efektivní. Kromě použití Gal4/UAS systému stejně jako Yang & Hultmark (2017) jsem použil Gal4/UAS systém s Gal80 umožňující teplotně regulovatelnou indukci až před infekcí, což umožňuje vyhnout se vývojovým defektům, které komplikovaly interpretaci výsledků (Yang & Hultmark, 2017). Ze získaných dat lze taky vyloučit, že by pokles v počtu lamelocytů byl způsoben nižším počtem plazmatocytů, jelikož jejich počet se mezi jednotlivými genotypy signifikantně nelišil.

Pro případnou publikaci, pokud by tímto směrem pokračoval výzkum, by bylo potřeba pomocí western blotu a markeru pAkt/Akt ukázat, že indukce exprese  $InR^{CA}$  je dostatečná k neutralizaci IR.  $InR^{CA}$  obecně zvyšuje množství pAkt (DiAngelo et al., 2009), ale redukce inzulinové signalizace při infekci může v signalizační kaskádě nastat mezi InR a Akt (Roth et al., 2018). Je známo, že různé imunitní signalizace regulují IS na různých úrovních.  $InR^{CA}$  by tak nemusel být schopný úplně překonat inhibici IS pod InR, což by vysvětlovalo, proč pokles v počtu lamelocytů není příliš velký.

Do budoucna by bylo také zajímavé vytvořit linii pro indukci exprese  $InR^{CA}$  v obou tkáních najednou (jak ve svalech, tak tuku), čímž by byl mohl být pozorován silnější efekt. Dále se k potvrzení výsledků s  $InR^{CA}$  nabízí další markery efektivity imunitní reakce, jako je procento úspěšné melanizace a přežití larev. Dalo by se také využít jiných genetických nástrojů k neutralizaci potlačení IS, např. hypomorfní mutace genu *FOXO* (Dionne et al., 2006). V úvahu by připadala i overexprese „phospho-mimicking“ verze Akt (Roth et al., 2018), která sice není dostupná v naší laboratoři, ale lze ji získat.

I přes nabízející se experimenty mé výsledky ukazují, že IR ve svalech a tuku je důležitá při infekci parazitoidní vosičkou. V tomto výzkumu má cenu pokračovat, jelikož důležitost potlačení IS při akutní infekci nebyla úspěšně otestována. Bylo sice například u dospělých much ukázáno, že mutace v *Chico* (substrátu InR) zvyšuje rezistenci proti infekci *P. aeruginosa* a *E. faecalis* (Libert et al., 2008), avšak mutace vyřadila funkci Chico v organismu již od začátku vývoje a nelze tak jednoznačně tvrdit, že je to potlačení IS po aktivaci imunitní odpovědi, které zvyšovalo rezistenci proti infekci.

#### **5.4. Vliv Jak-Stat signalizace na indukci inzulinové rezistence ve svalech při infekci parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi***

Posledním cílem bylo zjistit, zda se Jak-Stat signalizace podílí na vzniku IR ve svalech u larev infikovaných parazitoidní vosičkou. Tato myšlenka vznikla na základě posledních objevů při použití larev a parazitoidní vosičky, které ovšem nepřinesly jasný závěr.

V posledním článku Yang & Hultmark (2017) zjistili, že zablokování Jak-Stat signalizace ve svalech může snížit IS ve svalech. Mutace v Jak-Stat signalizaci ve svalech totiž zapříčinila také snížení příjmu potravy. Jelikož mutace byla použita po celou dobu vývoje, k omezení příjmu potravy docházelo také při celém vývoji, a tak nemohli zkusit objasnit efekt Jak-Stat signalizace na inzulínovou signalizaci po vosí infekci. Snížení IS by tak mohlo být již před infekcí, protože snížení příjmu potravy snižuje IS (Grewal, 2009).

Dříve bylo ale jasně zjištěno, že Jak-Stat signalizace je aktivována ve svalech mezi 4-8 hpi, kde zůstává aktivována dále po infekci parazitoidní vosičkou, a že aktivace je nezbytná pro imunitní odpověď. Aktivace Jak-Stat signalizace je způsobena ligandy Upd2 a Upd3 z hemocytů. Největší aktivaci ale zprostředkovává Upd3, jehož exprese nejvíce vzroste po infekci v hemocytech a mutace v *Upd3* dokáže téměř kompletně potlačit indukci Jak-Stat signalizace ve svalech. Podobného efektu bylo dosaženo i s použitím RNAi k potlačení exprese *Upd3* v hemocytech díky hemocytově specifického Hml-Gal4 (Yang et al., 2015).

V mé práci jsem použil stejnou linii s *Upd3* RNAi, avšak se Srp-Gal4 a Gal4Gal80 systémem k umlčení exprese *Upd3* až při infekci k vyloučení vývojového efektu. Srp-Gal4 byl vybrán jako pravděpodobně efektivnější cesta k potlačení exprese *Upd3* v hemocytech. Z transkriptomických dat vyplývá, že *Upd3* je exprimován z lamelocytů, či lameloblastů a Hml-Gal4 zcela nepokryje tuto subpopulaci hemocytů oproti Srp-Gal4, který pokryje veškeré hemocyty (Cattenoz et al., 2020).

Při potlačení exprese *Upd3* zmíněným systémem jsem zjistil, že počet lamelocytů byl signifikantně nižší než v odpovídající kontrole, ale efekt byl mnohem slabší než při použití mutace v *Upd3* (Yang et al., 2015). Tento výsledek byl očekávaný, jelikož RNAi nikdy není stoprocentní a mutace bude vždy mít silnější efekt. Ne tak značný pokles také může být částečně ovlivněn počítáním lamelocytů v jiný čas (19 h vs. 15 h) a rozlišováním lamelocytů podle morfologie. Jelikož se ale získaný počet plazmatocytů mezi genotypy nelišil, dohromady jsem i tak nepřímo ověřil, že linie Srp-Gal4Gal80 x UAS-*Upd3* RNAi je schopná potlačit expresi *Upd3*.

Pomocí zavedeného markeru aktivity inzulínové signalizace z této práce (množství fosforylovaného Akt) jsem se ale neúspěšně pokusil ověřit, že se Jak-Stat signalizace podílí na indukci IR ve svalech při akutní fázi infekce parazitoidní vosičkou. Poměr pAkt/Akt a množství pAkt neukazují, že by fosforylovaného Akt bylo víc ve svalech infikovaných larev Srp-Gal4Gal80 x UAS-*Upd3* RNAi oproti Srp-Gal4Gal80 x TRIP. Nelze ani stanovit závěr,



že se Jak-Stat signalizace nepodílí na indukci IR ve svalech, jelikož efekt Upd3 RNAi na pokles lamelocytů není příliš výrazný. Bude proto nutné ověřit efektivitou RNAi proti *Upd3* ve spojení se Srp-Gal4Gal80 přímo pomocí q-RT-PCR, která v této práci ještě nebyla provedena. Efektivita RNAi proti *Upd3* ve spojení Hml-Gal4 nebyla ověřena ani v původní publikaci Yang et al. (2015), ale Upd3 RNAi vykazovala téměř stejný zmíněný efekt na potlačení indukce Jak-Stat signalizace ve svalech jako mutace v *Upd3*. Z poměru pAkt/Akt a množství pAkt mezi neinfikovanými kontrolami a infekcí je ale opět patrné, že bez ohledu na genotyp dochází ke snížení fosforylace Akt při infekci ve svalech. Při tomto experimentu nebyla použita normalizace alfa-kateninem, protože alfa-katenin byl obtížně kvantifikovatelný. Výsledky jsou i tak použitelné, jelikož množství nanášených proteinů bylo opět sjednoceno měřením koncentrace proteinů ve vzorku.

K výraznějšímu efektu plánujeme vyzkoušet dvojitou RNAi pro Upd2/Upd3 a také vynechat GAL80. *Upd2,3* jsou exprimovány v hemocytech bez infekce jen minimálně a výrazně se zvedají až po infekci (Yang et al., 2015). Nemuselo by proto dojít k ovlivnění hematopoezy a efekt RNAi by mohl být silnější. Do budoucna by bylo vhodné podívat se i na pozdější čas 28 hpi, případně použít jiný marker, např. expresi *4E-BP*. Pro ověření hypotézy, že infekcí zvýšená produkce Upd3 vede k potlačení inzulínové signalizace ve svalech, bylo do budoucna také navrženo vytvoření experimentální linie 24B-Gal4Gal80 x Upd3Δ, UAS-InR<sup>DN</sup>. Záměrem tohoto pokusu je, že při použití mutace v *Upd3* nedojde k potlačení inzulínové signalizace. Pokud ale zároveň potlačíme IS ve svalech expresí dominant-negativ mutací inzulínového receptoru (*InR*<sup>DN</sup>), tak by se efekt mohl vykompenzovat.

## 6. Závěr

Úspěšně jsem prokázal, že v periferních tkáních (svalech a tukovém tělese) larev octomilek *D. melanogaster* infikovaných parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi* dochází ke snížení inzulínové signalizace, jelikož jsem zde detekoval sníženou fosforylaci Akt a zvýšenou expresi *4E-BP*. Z vyšší exprese *Dilps* při infekci jsem vyvodil závěr, že snížení inzulínové signalizace je z důvodu vzniku inzulínové rezistence a ne z důvodu inzulínové deficience. Následně jsem na počtu lamelocytů ukázal, že inzulínová rezistence jak ve svalech, tak tukovém tělese je potřeba pro efektivní imunitní odpověď. Pokud se tyto výsledky podaří ověřit doplňujícími experimenty, představovaly by jedno z prvních experimentálních ověření důležitosti inzulínové rezistence pro efektivitu imunitní odpovědi. Nakonec se ale nepodařilo prokázat, zda by Jak-Stat signalizace mohla být jednou ze signalizací indukujících inzulínovou rezistenci ve svalech larev octomilek *D. melanogaster* po infekci parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi*. Tento experiment bude třeba opakovat v jiném nastavení, jelikož použitá genetická manipulace vedla k příliš slabému efektu.

## 7. Literatura

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., ... Venter, J. C. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science (New York, N.Y.)*, 287(5461), 2185–2195.
- Agaisse, H., Petersen, U.-M., Boutros, M., Mathey-Prevot, B., & Perrimon, N. (2003). Signaling Role of Hemocytes in *Drosophila* JAK/STAT-Dependent Response to Septic Injury. *Developmental Cell*, 5(3), 441–450.
- Agrawal, N., Delanoue, R., Mauri, A., Basco, D., Pasco, M., Thorens, B., & Léopold, P. (2016). The *Drosophila* TNF Eiger Is an Adipokine that Acts on Insulin-Producing Cells to Mediate Nutrient Response. *Cell Metabolism*, 23(4), 675–684.
- Alic, N., Andrews, T. D., Giannakou, M. E., Papatheodorou, I., Slack, C., Hoddinott, M. P., ... Partridge, L. (2011). Genome-wide dFOXO targets and topology of the transcriptomic response to stress and insulin signalling. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 502.
- Anderl, I., Vesala, L., Ihalainen, T. O., Vanha-aho, L.-M., Andó, I., Rämetsä, M., & Hultmark, D. (2016). Transdifferentiation and Proliferation in Two Distinct Hemocyte Lineages in *Drosophila melanogaster* Larvae after Wasp Infection. *PLOS Pathogens*, 12(7), e1005746.
- Arnold, P. A., Johnson, K. N., & White, C. R. (2013). Physiological and metabolic consequences of viral infection in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 216(17), 3350–3357.
- Bajgar, A., & Dolezal, T. (2018). Extracellular adenosine modulates host-pathogen interactions through regulation of systemic metabolism during immune response in *Drosophila*. *PLOS Pathogens*, 14(4), e1007022.
- Bajgar, A., Kucerova, K., Jonatova, L., Tomcala, A., Schneedorferova, I., Okrouhlik, J., & Dolezal, T. (2015). Extracellular Adenosine Mediates a Systemic Metabolic Switch during Immune Response. *PLOS Biology*, 13(4), e1002135.
- Banerjee, U., Girard, J. R., Goins, L. M., & Spratford, C. M. (2019). *Drosophila* as a Genetic Model for Hematopoiesis. *Genetics*, 211(2), 367–417.

- Becker, T., Loch, G., Beyer, M., Zinke, I., Aschenbrenner, A. C., Carrera, P., ... Hoch, M. (2010). FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature*, *463*(7279), 369–373.
- Binari, R., & Perrimon, N. (1994). Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes & Development*, *8*(3), 300–312.
- Böhni, R., Riesgo-Escovar, J., Oldham, S., Brogiolo, W., Stocker, H., Andrus, B. F., ... Hafen, E. (1999). Autonomous Control of Cell and Organ Size by CHICO, a *Drosophila* Homolog of Vertebrate IRS1–4. *Cell*, *97*(7), 865–875.
- Brand, A. H., & Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development (Cambridge, England)*, *118*(2), 401–415.
- Brogiolo, W., Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., & Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current Biology*, *11*(4), 213–221.
- Brown, S., Hu, N., & Hombria, J. C.-G. (2001). Identification of the first invertebrate interleukin JAK/STAT receptor, the *Drosophila* gene *domeless*. *Current Biology*, *11*(21), 1700–1705.
- Burns, J., & Manda, G. (2017). Metabolic Pathways of the Warburg Effect in Health and Disease: Perspectives of Choice, Chain or Chance. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(12), 2755.
- Carton, Y., & Nappi, A. J. (1991). The *Drosophila* immune reaction and the parasitoid capacity to evade it: genetic and coevolutionary aspects. *Acta Oecologica*, *12*, 89–104.
- Cattenoz, P. B., Sakr, R., Pavlidaki, A., Delaporte, C., Riba, A., Molina, N., ... Giangrande, A. (2020). Temporal specificity and heterogeneity of *Drosophila* immune cells. *The EMBO Journal*, *39*(12).
- Chambers, M. C., Song, K. H., & Schneider, D. S. (2012). *Listeria monocytogenes* infection causes metabolic shifts in *Drosophila melanogaster*. *PloS One*, *7*(12), e50679.

- Cho, B., Yoon, S.-H., Lee, D., Koranteng, F., Tattikota, S. G., Cha, N., ... Shim, J. (2020). Single-cell transcriptome maps of myeloid blood cell lineages in *Drosophila*. *Nature Communications*, *11*(1), 4483.
- Clark, R. I., Tan, S. W. S., Péan, C. B., Roostalu, U., Vivancos, V., Bronda, K., ... Dionne, M. S. (2013). MEF2 Is an In Vivo Immune-Metabolic Switch. *Cell*, *155*(2), 435–447.
- Colinet, D., Dubuffet, A., Cazes, D., Moreau, S., Drezen, J.-M., & Poirié, M. (2009). A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase cascade. *Developmental & Comparative Immunology*, *33*(5), 681–689.
- Colombani, J., Andersen, D. S., Boulan, L., Boone, E., Romero, N., Virolle, V., ... Léopold, P. (2015). *Drosophila* Lgr3 Couples Organ Growth with Maturation and Ensures Developmental Stability. *Current Biology*, *25*(20), 2723–2729.
- Cooper, D., & Eleftherianos, I. (2017). Memory and Specificity in the Insect Immune System: Current Perspectives and Future Challenges. *Frontiers in Immunology*, *8*.
- Davoodi, S., Galenza, A., Panteluk, A., Deshpande, R., Ferguson, M., Grewal, S., & Foley, E. (2019). The Immune Deficiency Pathway Regulates Metabolic Homeostasis in *Drosophila*. *The Journal of Immunology*, *202*(9), 2747–2759.
- de Luca, C., & Olefsky, J. M. (2008). Inflammation and insulin resistance. *FEBS Letters*, *582*(1), 97–105.
- DiAngelo, J. R., Bland, M. L., Bambina, S., Cherry, S., & Birnbaum, M. J. (2009). The immune response attenuates growth and nutrient storage in *Drosophila* by reducing insulin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(49), 20853–20858.
- Dietzl, G., Chen, D., Schnorrer, F., Su, K.-C., Barinova, Y., Fellner, M., ... Dickson, B. J. (2007). A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature*, *448*(7150), 151–156.
- Dionne, M. S., Pham, L. N., Shirasu-Hiza, M., & Schneider, D. S. (2006). Akt and foxo Dysregulation Contribute to Infection-Induced Wasting in *Drosophila*. *Current Biology*, *16*(20), 1977–1985.

- Dolezal, T., Krejcová, G., Bajgar, A., Nedbalová, P., & Strasser, P. (2019). Molecular regulations of metabolism during immune response in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *109*, 31–42.
- Dudzic, J. P., Kondo, S., Ueda, R., Bergman, C. M., & Lemaitre, B. (2015). *Drosophila* innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidasases. *BMC Biology*, *13*(1), 81.
- Duvic, B., Hoffmann, J. A., Meister, M., & Royet, J. (2002). Notch signaling controls lineage specification during *Drosophila* larval hematopoiesis. *Current Biology : CB*, *12*(22), 1923–1927.
- Fernandez, R., Tabarini, D., Azpiazu, N., Frasch, M., & Schlessinger, J. (1995). The *Drosophila* insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential. *The EMBO Journal*, *14*(14), 3373–3384.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, *391*(6669), 806–811.
- Fu, Y., Huang, X., Zhang, P., van de Leemput, J., & Han, Z. (2020). Single-cell RNA sequencing identifies novel cell types in *Drosophila* blood. *Journal of Genetics and Genomics*, *47*(4), 175–186.
- Galenza, A., & Foley, E. (2019). Immunometabolism: Insights from the *Drosophila* model. *Developmental & Comparative Immunology*, *94*, 22–34.
- Gold, K. S., & Brückner, K. (2015). Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster*. *Seminars in Immunology*, *27*(6), 357–368.
- Graham, P., & Pick, L. (2017). *Drosophila* as a Model for Diabetes and Diseases of Insulin Resistance (pp. 397–419).
- Grewal, S. S. (2009). Insulin/TOR signaling in growth and homeostasis: A view from the fly world. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *41*(5), 1006–1010.

- Grönke, S., Clarke, D.-F., Broughton, S., Andrews, T. D., & Partridge, L. (2010). Molecular Evolution and Functional Characterization of *Drosophila* Insulin-Like Peptides. *PLoS Genetics*, 6(2), e1000857.
- Harrison, D. A., McCoon, P. E., Binari, R., Gilman, M., & Perrimon, N. (1998). *Drosophila* unpaired encodes a secreted protein that activates the JAK signaling pathway. *Genes & Development*, 12(20), 3252–3263.
- He, F. (2011). BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay. *BIO-PROTOCOL*, 1(5).
- Hietakangas, V., & Cohen, S. M. (2007). Re-evaluating AKT regulation: role of TOR complex 2 in tissue growth. *Genes & Development*, 21(6), 632–637.
- Hombria, J. C.-G., Brown, S., Häder, S., & Zeidler, M. P. (2005). Characterisation of Upd2, a *Drosophila* JAK/STAT pathway ligand. *Developmental Biology*, 288(2), 420–433.
- Hull-Thompson, J., Muffat, J., Sanchez, D., Walker, D. W., Benzer, S., Ganfornina, M. D., & Jasper, H. (2009). Control of Metabolic Homeostasis by Stress Signaling Is Mediated by the Lipocalin NLaz. *PLoS Genetics*, 5(4), e1000460.
- Kennerdell, J. R., & Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-Mediated Genetic Interference to Demonstrate that frizzled and frizzled 2 Act in the Wingless Pathway. *Cell*, 95(7), 1017–1026.
- Kraaijeveld, A. R., & Godfray, H. C. J. (1997). Trade-off between parasitoid resistance and larval competitive ability in *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 389(6648), 278–280.
- Krejčová, G., Danielová, A., Nedbalová, P., Kazek, M., Strych, L., Chawla, G., ... Bajgar, A. (2019). *Drosophila* macrophages switch to aerobic glycolysis to mount effective antibacterial defense. *ELife*, 8.
- Labrosse, C., Stasiak, K., Lesobre, J., Grangeia, A., Huguet, E., Drezen, J. M., & Poirie, M. (2005). A RhoGAP protein as a main immune suppressive factor in the *Leptopilina boulardi* (Hymenoptera, Figitidae)–*Drosophila melanogaster* interaction. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(2), 93–103.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., & Meister, M. (2001). Postembryonic Hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 230(2), 243–257.

- Lee, K.-A., & Lee, W.-J. (2018). Immune–metabolic interactions during systemic and enteric infection in *Drosophila*. *Current Opinion in Insect Science*, 29, 21–26.
- Lehr Katharina. (2019). *Trehalose as an important energy source for immune cells in Drosophila melanogaster*. University of South Bohemia.
- Leitão, A. B., Bian, X., Day, J. P., Pitton, S., Demir, E., & Jiggins, F. M. (2019). Independent effects on cellular and humoral immune responses underlie genotype-by-genotype interactions between *Drosophila* and parasitoids. *PLOS Pathogens*, 15(10), e1008084.
- Letourneau, M., Lapraz, F., Sharma, A., Vanzo, N., Waltzer, L., & Crozatier, M. (2016). *Drosophila* hematopoiesis under normal conditions and in response to immune stress. *FEBS Letters*, 590(22), 4034–4051.
- Levitin, A., Marcil, A., Tettweiler, G., Laforest, M. J., Oberholzer, U., Alarco, A. M., ... Whiteway, M. (2007). *Drosophila melanogaster* Thor and Response to *Candida albicans* Infection. *Eukaryotic Cell*, 6(4), 658–663.
- Libert, S., Chao, Y., Zwiener, J., & Pletcher, S. D. (2008). Realized immune response is enhanced in long-lived puc and chico mutants but is unaffected by dietary restriction. *Molecular Immunology*, 45(3), 810–817.
- Lochmiller, R. L., & Deerenberg, C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos*, 88(1), 87–98.
- Mabery, E. M., & Schneider, D. S. (2010). The *Drosophila* TNF Ortholog Eiger Is Required in the Fat Body for a Robust Immune Response. *Journal of Innate Immunity*, 2(4), 371–378.
- Markus, R., Laurinyecz, B., Kurucz, E., Honti, V., Bajusz, I., Sipos, B., ... Ando, I. (2009). Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), 4805–4809.
- Matsuda, H., Yamada, T., Yoshida, M., & Nishimura, T. (2015). Flies without Trehalose. *Journal of Biological Chemistry*, 290(2), 1244–1255.
- Mattila, J., Kallijarvi, J., & Puig, O. (2008). RNAi screening for kinases and phosphatases identifies FoxO regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(39), 14873–14878.



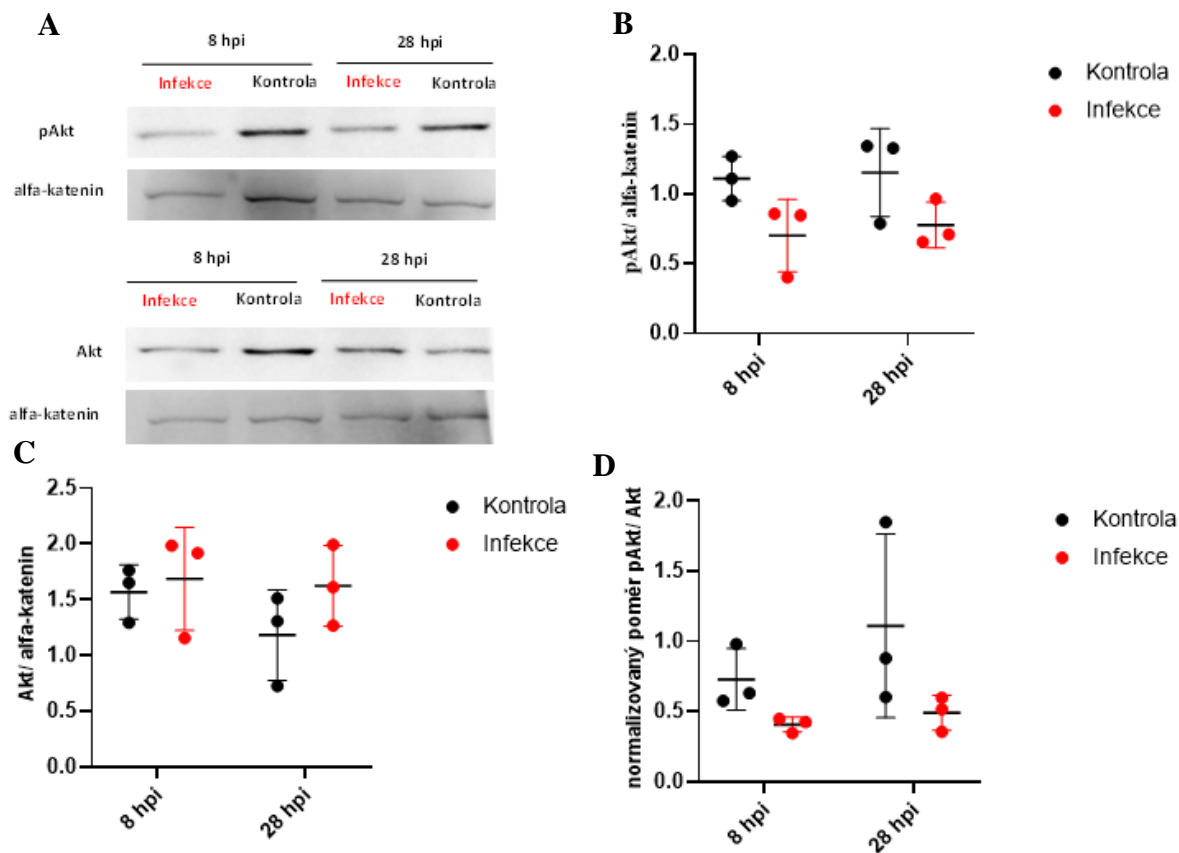
- Mattila, J., & Hietakangas, V. (2017). Regulation of Carbohydrate Energy Metabolism in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 207(4), 1231 LP – 1253.
- McKean, K. A., Yourth, C. P., Lazzaro, B. P., & Clark, A. G. (2008). The evolutionary costs of immunological maintenance and deployment. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 76.
- Melcher, K. (2001). Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete GAL gene repression. *The EMBO Journal*, 20(4), 841–851.
- Musselman, L. P., Fink, J. L., Grant, A. R., Gatto, J. A., Tuthill, B. F., & Baranski, T. J. (2017). A Complex Relationship between Immunity and Metabolism in *Drosophila* Diet-Induced Insulin Resistance. *Molecular and Cellular Biology*, 38(2).
- Nam, H.-J., Jang, I.-H., Asano, T., & Lee, W.-J. (2008). Involvement of pro-phenoloxidase 3 in lamellocyte-mediated spontaneous melanization in *Drosophila*. *Molecules and Cells*, 26(6), 606–610.
- Nässel, D. R., Liu, Y., & Luo, J. (2015). Insulin/IGF signaling and its regulation in *Drosophila*. *General and Comparative Endocrinology*, 221, 255–266.
- Olenchock, B. A., Rathmell, J. C., & Vander Heiden, M. G. (2017). Biochemical Underpinnings of Immune Cell Metabolic Phenotypes. *Immunity*, 46(5), 703–713.
- Parsons, B., & Foley, E. (2016). Cellular immune defenses of *Drosophila melanogaster*. *Developmental & Comparative Immunology*, 58, 95–101.
- Pasco, M. Y., & Léopold, P. (2012). High Sugar-Induced Insulin Resistance in *Drosophila* Relies on the Lipocalin Neural Lazarillo. *PLoS ONE*, 7(5), e36583.
- Passalacqua, K. D., Charbonneau, M.-E., & O’Riordan, M. X. D. (2016). Bacterial Metabolism Shapes the Host–Pathogen Interface. *Microbiology Spectrum*, 4(3).
- Peterson-Nedry, W., Erdeniz, N., Kremer, S., Yu, J., Baig-Lewis, S., & Wehrli, M. (2008). Unexpectedly robust assembly of the Axin destruction complex regulates Wnt/Wg signaling in *Drosophila* as revealed by analysis in vivo. *Developmental Biology*, 320(1), 226–241.
- Puig, O. (2003). Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes & Development*, 17(16), 2006–2020.

- Reiter, L. T. (2001). A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, *11*(6), 1114–1125.
- Rera, M., Clark, R. I., & Walker, D. W. (2012). Intestinal barrier dysfunction links metabolic and inflammatory markers of aging to death in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(52), 21528–21533.
- Reyes-DelaTorre, A., Teresa, M., & Rafael, J. (2012). Carbohydrate Metabolism in *Drosophila*: Reliance on the Disaccharide Trehalose. In *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. InTech.
- Rintelen, F., Stocker, H., Thomas, G., & Hafen, E. (2001). PDK1 regulates growth through Akt and S6K in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(26), 15020–15025.
- Rizki, M. T. M., & Rizki, R. M. (1959). Functional Significance of the Crystal Cells in the Larva of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, *5*(2), 235–240.
- Roth, S. W., Bitterman, M. D., Birnbaum, M. J., & Bland, M. L. (2018). Innate Immune Signaling in *Drosophila* Blocks Insulin Signaling by Uncoupling PI(3,4,5)P<sub>3</sub> Production and Akt Activation. *Cell Reports*, *22*(10), 2550–2556.
- Russo, J., Dupas, S., Frey, F., Carton, Y., & Brehelin, M. (1996). Insect immunity: early events in the encapsulation process of parasitoid (*Leptopilina bouvardi*) eggs in resistant and susceptible strains of *Drosophila*. *Parasitology*, *112*(01), 135.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682.
- Schneider, D. S. (2007). How and Why Does a Fly Turn Its Immune System Off? *PLoS Biology*, *5*(9), e247.
- Silverman, N., Paquette, N., & Aggarwal, K. (2009). Specificity and signaling in the *Drosophila* immune response. *Invertebrate Survival Journal : ISJ*, *6*(2), 163–174.

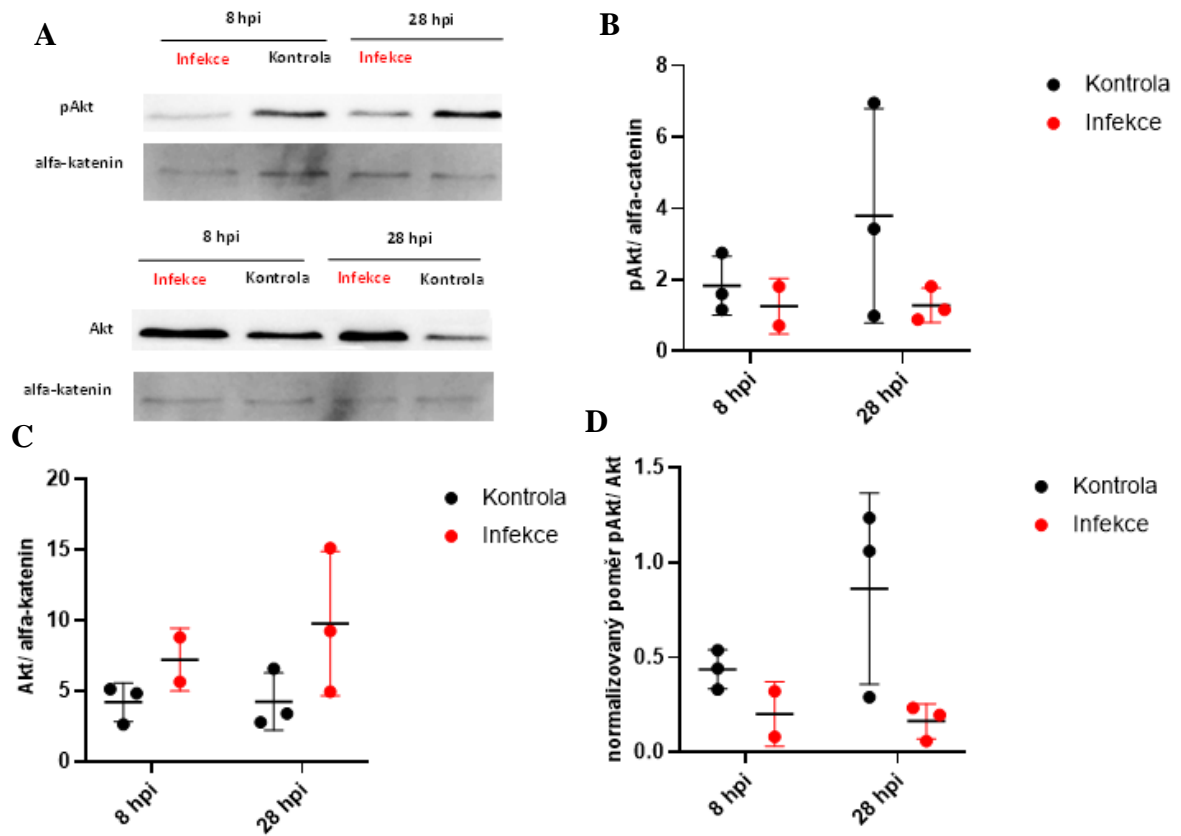
- Slaidina, M., Delanoue, R., Gronke, S., Partridge, L., & Léopold, P. (2009). A *Drosophila* Insulin-like Peptide Promotes Growth during Nonfeeding States. *Developmental Cell*, *17*(6), 874–884.
- Strasser, P. (2016). *Warburg Effect in Lymph Gland of Drosophila melanogaster upon Parasitoid Wasp Infection*. University of South Bohemia.
- Straub, R. H. (2014). Insulin resistance, selfish brain, and selfish immune system: an evolutionarily positively selected program used in chronic inflammatory diseases. *Arthritis Research & Therapy*, *16*(Suppl 2), S4.
- Suzawa, M., Muhammad, N. M., Joseph, B. S., & Bland, M. L. (2019). The Toll Signaling Pathway Targets the Insulin-like Peptide Dilp6 to Inhibit Growth in *Drosophila*. *Cell Reports*, *28*(6), 1439-1446.e5.
- Teleman, A. A. (2010). Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochemical Journal*, *425*(1), 13–26.
- Ugrankar, R., Berglund, E., Akdemir, F., Tran, C., Kim, M. S., Noh, J., ... Graff, J. M. (2015). *Drosophila* glucone screening identifies Ck1alpha as a regulator of mammalian glucose metabolism. *Nature Communications*, *6*(1), 7102.
- Vanha-aho, L.-M., Anderl, I., Vesala, L., Hultmark, D., Valanne, S., & Rämet, M. (2015). Edin Expression in the Fat Body Is Required in the Defense Against Parasitic Wasps in *Drosophila melanogaster*. *PLOS Pathogens*, *11*(5), e1004895.
- Vereshchagina, N., Ramel, M.-C., Bitoun, E., & Wilson, C. (2008). The protein phosphatase PP2A-B' subunit Widerborst is a negative regulator of cytoplasmic activated Akt and lipid metabolism in *Drosophila*. *Journal of Cell Science*, *121*(20), 3383–3392.
- Wang, M. C., Bohmann, D., & Jasper, H. (2005). JNK Extends Life Span and Limits Growth by Antagonizing Cellular and Organism-Wide Responses to Insulin Signaling. *Cell*, *121*(1), 115–125.
- Warburg, O., Wind, F., & Negelein, E. (1927). THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *The Journal of General Physiology*, *8*(6), 519–530.

- Werz, C., Köhler, K., Hafen, E., & Stocker, H. (2009). The Drosophila SH2B Family Adaptor Lnk Acts in Parallel to Chico in the Insulin Signaling Pathway. *PLoS Genetics*, 5(8), e1000596.
- Woodcock, K. J., Kierdorf, K., Pouchelon, C. A., Vivancos, V., Dionne, M. S., & Geissmann, F. (2015). Macrophage-Derived upd3 Cytokine Causes Impaired Glucose Homeostasis and Reduced Lifespan in Drosophila Fed a Lipid-Rich Diet. *Immunity*, 42(1), 133–144.
- Yan, R., Small, S., Desplan, C., Dearolf, C. R., & Darnell, J. E. (1996). Identification of a Stat Gene That Functions in Drosophila Development. *Cell*, 84(3), 421–430.
- Yang, H., Kronhamn, J., Ekstrom, J.-O., Korkut, G. G., & Hultmark, D. (2015). JAK/STAT signaling in Drosophila muscles controls the cellular immune response against parasitoid infection. *EMBO Reports*, 16(12), 1664–1672.
- Yang, H., & Hultmark, D. (2017). Drosophila muscles regulate the immune response against wasp infection via carbohydrate metabolism. *Scientific Reports*, 7(1), 15713.
- Yu, S., Zhang, G., & Jin, L. H. (2018). A high-sugar diet affects cellular and humoral immune responses in Drosophila. *Experimental Cell Research*, 368(2), 215–224.
- Zeidler, M. P., Tan, C., Bellaiche, Y., Cherry, S., Häder, S., Gayko, U., & Perrimon, N. (2004). Temperature-sensitive control of protein activity by conditionally splicing inteins. *Nature Biotechnology*, 22(7), 871–876.

## 8. Přílohy



**Obr. P1: Reprezentativní western blot (A) a kvantifikace western blotů (B-D) z extraktu ze svalů z infikovaných larev W v 8 hpi a 28 hpi v porovnání s neinfikovanými kontrolami. (A) Membrány se stejnými vzorky byly inkubovány s anti-fosfoAkt/anti-Akt protilátkami a anti-alfa-katenin protilátkami sloužícími jako nanášecí kontrola. (B-D) Na ose X jsou zapsány jednotlivé časy po infekci. (B-C) Na ose Y je vyneseno množství fosforylovaného Akt (pAkt) (B) a celkového Akt (Akt) (C) normalizovaných množstvím alfa-kateninu. (D) Na ose Y je vyneseno poměr pAkt/Akt po normalizaci na alfa-katenin. (B-D) Vodorovné linie ukazují průměr a směrodatnou odchylku. Body v grafu reprezentují biologické replikáty. Na každý biologický replikát byly použity svaly ze šesti larev.**



**Obr. P2: Reprezentativní western blot (A) a kvantifikace western blotů (B-D) z extraktu z tukového tělesa z infikovaných larev W v 8 hpi a 28 hpi v porovnání s neinfikovanými kontrolami.** (A) Membrány se stejnými vzorky byly inkubovány s anti-fosfoAkt/anti-Akt protilátkami a anti-alfa-katenin protilátkami sloužícími jako nanášecí kontrola. (B-D) Na ose X jsou zapsány jednotlivé časy po infekci. (B-C) Na ose Y je vyneseno množství fosforylovaného Akt (pAkt) (B) a celkového Akt (Akt) (C) normalizovaných množstvím alfa-kateninu. (D) Na ose Y je vyneseno poměr pAkt/Akt po normalizaci na alfa-katenin. (B-D) Vodorovné linie ukazují průměr a směrodatnou odchylku. Body v grafu reprezentují biologické replikáty. Na každý biologický replikát byly použity tuková tělesa z deseti larev.