

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Úloha Adenylát kinázy 1 v aktivaci
a metabolismu imunitních buněk
larev *Drosophila melanogaster***

Diplomová práce

Bc. Nikola Kaislerová

Vedoucí práce: doc. Mgr. Tomáš Doležal, Ph.D.

Odborný konzultant: Mgr. Pavla Nedbalová

České Budějovice 2022

Kaislerová N., 2022: Úloha Adenylát kinázy 1 v aktivaci a metabolismu imunitních buněk larev *Drosophila melanogaster* [Role of Adenylate kinase 1 in activation and metabolism of immune cells of *Drosophila melanogaster* larvae. Mgr. Thesis, in Czech.] – 47 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this thesis was to study the role of Adenylate kinase 1 (Ak1) in the immune system of *Drosophila melanogaster* larvae upon the infection by parasitoid wasp *Leptopilina boulardi*. Using the immune specific *Ak1* RNA interference, it was analyzed the effect of Ak1 reduction on the immune response and viability of *Drosophila*. The importance of Ak1 was also evaluated within the metabolism of immune cells. It has been shown that Ak1 is crucial in energy metabolism of immune cells and important for the proper functioning of immune system.

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

V Českých Budějovicích dne 12. 4. 2022

.....

Bc. Nikola Kaislerová

Poděkování:

Srdečně bych ráda tímto poděkovala svému školiteli doc. Mgr. Tomášovi Doležalovi, Ph.D. za příležitost pracovat v jeho laboratoři, ale hlavně za jeho věcné rady a odborné vedení mé práce.

Zvláštní poděkování pak patří Mgr. Pavle Nedbalové za cenné rady a připomínky v rámci mé práce, ale hlavně za věnovaný čas, ochotu, trpělivost a morální podporu v průběhu mé práce v laboratoři. Byla a je mi neuvěřitelnou oporou a vždy mě dokázala namotivovat zpět k práci. Kromě toho měla vždy pochopení pro můj časový harmonogram a nikdy v něm neviděla problém, ale naopak jsme vždy společně našly řešení. Proto jí tímto ze srdce děkuji.

Mimoto bych ráda poděkovala všem ostatním členům laboratoře, a to zejména Mgr. Gabriele Krejčové a Mgr. Adamovi Bajgarovi, Ph.D. Neváhali mi vždy se vším poradit a v laboratoři tvořili všichni vždy milou a přátelskou atmosféru. Dále pak chci zvláště poděkovat Lucii Hrádkové, jež se starala o chov vosiček a přípravu věcí potřebných k práci, za významné usnadnění práce v laboratoři.

Mé poděkování také patří všem členům Laboratoře analytické biochemie a metabolomiky (ENTÚ, BC AV ČR), a to zejména Ing. Martinovi Moosovi, Ph.D. a Janě Járové.

Nakonec bych chtěla mnohokrát poděkovat mé rodině a partnerovi za trpělivost a velkou psychickou podporu nejen při psaní této práce, ale především v průběhu celého studia.

Seznam použitých zkratek

Ado = adenosin

ADP = adenosindifofát

AMP = adenosinmonofosfát

AMPdeam = AMP deamináza

AMPK = AMP-aktivovaná protein kináza

AMPs = antimikrobiální peptidy

ATP = adenosintrifosfát

Atila = gen Atila specifický pro lamelocyty

Ak = adenylát kináza

Ak1 = adenylát kináza 1

Ak2 = adenylát kináza 2

Ak3 = adenylát kináza 3

ArgK = arginin kináza

cDNA = komplementární DNA

CK = kreatin kináza

Ctrl = kontrola

DIC = diferenciální interferenční kontrast

dNTPs = deoxyribonukleotid trifosfát

EDTA = kyselina ethylendiamintetraoctová

Gal4 = transkripční aktivátor vázající se na UAS

Gal80 = teplotně senzitivní transkripční represor vázající se na Gal80

Hml = gen Hemolektin specifický pro plasmatocyty

hpi = z angl. „hours post infection“ neboli hodin po infekci

IMP = inosin monofosfát

NADH = nikotinamidadenindinukleotid

OXFOS = oxidativní fosforylace

PBS = fosfátový pufr

PCR = polymerázová řetězová reakce

PPO (1-3) = profenoloxidáza

RD = retikulární dygeneze

RNAi = RNA interference

ROS = z angl. „reactive oxygen species“ neboli volné kyslíkové radikály

Rp49 = ribozomální protein 49

RT-qPCR = kvantitativní PCR spojená s reverzní transkripcí

SCID = vážná kombinovaná imunodeficience

Srp = gen Serpent specifický pro hemocyty

TBE = tris-borát-kyselina ethylendiamintetraoctová

TCA cyklus = citrátový cyklus

UAS = z angl. „upstream activation sequence“ neboli „upstream“ aktivační sekvence

Obsah

1.	ÚVOD	1
1.1.	<i>Drosophila melanogaster</i> jako modelový organismus	2
1.2.	Imunitní systém <i>D. melanogaster</i> a její obranné mechanismy	3
1.2.1.	Hematopoéza	3
1.2.2.	Přirozená imunita <i>D. melanogaster</i>	5
1.2.3.	Aktivace imunitního systému a jeho reakce na infekci parazitoidem	7
1.3.	Metabolismus imunitních buněk.....	8
1.3.1.	Warburg efekt a teorie „sobeckého“ imunitního systému	9
1.3.2.	Adenylát kináza a její úloha v energetickém metabolismu	10
1.4.	Adenylát kináza a <i>Drosophila melanogaster</i>	13
2.	CÍLE PRÁCE	16
3.	MATERIÁLY A METODY	17
3.1.	Chov <i>Drosophila melanogaster</i>	17
3.2.	Křížení	17
3.2.1.	Výchozí linie	18
3.2.2.	Křížení A	18
3.2.3.	Křížení B	19
3.3.	Infekce	20
3.4.	Kvantitativní PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-qPCR)	20
3.4.1.	Příprava a sběr vzorků	20
3.4.2.	Izolace RNA	21
3.4.3.	Reverzní transkripce	21
3.4.4.	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)	22
3.5.	Počítání lamelocytů.....	23
3.6.	Test přežití	23
3.7.	Metabolomická analýza (MA).....	23

3.7.1.	Příprava a sběr vzorků	24
3.7.2.	Metabolomická analýza množství ATP, ADP a AMP	24
3.8.	Statistické testy a zpracování dat	25
4.	VÝSLEDKY	27
4.1.	Ověření efektivity RNA interference	27
4.2.	RNA interference <i>Akl</i> má negativní vliv na aktivaci imunitního systému <i>D. melanogaster</i>	28
4.3.	RNA interference <i>Akl</i> má negativní vliv na přežití <i>D.melanogaster</i>	29
4.4.	Expres genů mitochondriálních izoform <i>Ak</i> a <i>ArgK</i> se u kontrol a <i>Akl</i> RNA interference neliší	30
4.5.	<i>Akl</i> RNAi ovlivňuje hladiny ATP a ADP v hemocytech <i>D. melanogaster</i> .	31
5.	DISKUZE.....	33
6.	ZÁVĚR.....	38
7.	SEZNAM LITERATURY	39
8.	PŘÍLOHY.....	47

1. ÚVOD

Drosophila melanogaster neboli octomilka představuje jeden z nejčastějších modelových organismů ve vědě. Její nenáročný a rychlý chov, relativně jednoduchá organizace biologických dějů a snadná genetická manipulace z ní činí velmi cenný nástroj pro studium nejrůznějších biologických jevů (Jennings, 2011).

Vhodná je mimo jiné pro studium molekulární integrativní fyziologie (Folkow, 1994), jež se naše laboratoř zabývá. Toto odvětví biologie se soustředí zejména na fungování jednotlivých orgánů, orgánových soustav a celého těla jako celku, a jeho schopnosti přizpůsobit se měnícím se podmínkám. Integrace na tyto měnící se podmínky pak probíhá pomocí různých molekulárních signálů, jež pak ovlivňují dané systémy. Naše laboratoř se pak především zaměřuje na metabolismus imunitních buněk a na jeho změny po aktivaci imunitního systému (Dolezal *et al.*, 2019).

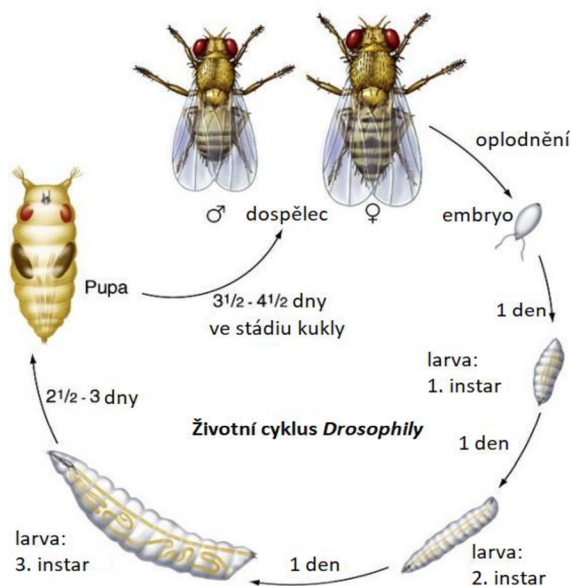
Imunitní systém vyžaduje po aktivaci velké množství rychle dostupné energie. Za normálních podmínek jsou primárním zdrojem energie mitochondrie, kde probíhá oxidativní fosforylace (OXFOS). OXFOS poskytuje sice relativně velký výtěžek energie ve formě ATP (adenosintrifosfát), nicméně rychlost této produkce je poměrně pomalá a nedostačující pro efektivní imunitní reakci. Proto aktivované imunitní buňky upřednostňují k produkci ATP podstatně rychlejší glykolýzu, a přesouvají tak svůj energetický metabolismus z mitochondrií do cytoplazmy. Dochází tak k metabolickému přesmyku neboli Warburg efektu, jež byl poprvé popsán u nádorových buněk (Warburg *et al.*, 1927; Kelly a O'Neill, 2015).

Přestože je glykolýza rychlá, oproti OXFOS poskytuje buňce podstatně méně ATP. Z jedné molekuly glukózy činí celkový výtěžek pouze 2 molekuly ATP. Spolu s přesmykem na glykolýzu se tak zvyšují nároky na glukózu. Naše laboratoř již potvrdila, že k Warburg efektu dochází i u aktivovaných imunitních buněk *D. melanogaster*. Tyto buňky pak pomocí adenosinové signalizace regulují systémový metabolismus a inhibují spotřebu glukózy vývojovými orgány a periferními tkáněmi. Tuto nespoteřovanou glukózu poté využívá právě imunitní systém a imunitním buňkám je tak zajištěn dostatek substrátu pro glykolýzu (Bajgar *et al.*, 2015; Bajgar a Dolezal, 2018; Krejčová *et al.*, 2019). Tomuto jevu říkáme „sobecký“ imunitní systém (Dolezal, 2015; Straub a Schradin, 2016).

Jak je vidno, aktivaci imunitního systému dochází v organismu k významným metabolickým změnám a značné energetické dysbalanci. Zásadní roli v udržení buněčné energetické homeostázy má enzym zvaný Adenylát kináza (Ak). Tento enzym katalyzuje interkonverzi 2 molekul ADP v ATP a AMP a naopak. Adenylát kináza má hned několik různě lokalizovaných izoforem (Dzeja a Terzic, 2009). Nicméně, jak již bylo řečeno, energetický metabolismus v aktivovaných imunitních buňkách probíhá především v cytoplazmě prostřednictvím glykolýzy (Krejčová *et al.*, 2019). Proto bylo logické zaměřit se na Adenylát kinázu 1 (Ak1) nacházející se v cytoplazmě. Cílem této práce bylo tedy prověřit úlohu cytoplazmatické Ak1 v aktivaci a metabolismu imunitních buněk.

1.1. *Drosophila melanogaster* jako modelový organismus

Životní cyklus drozofily se skládá z vajíčka, larev 1. až 3. instaru, kukly a dospělého a trvá za standardních podmínek (25 °C) přibližně 10 dní (Obr. 1). Její genom se skládá pouze ze 4 párů chromozomů. Jednoho páru pohlavních chromozomů a tří párů autozomů. Poměrně rychlý životní cyklus a tato relativní jednoduchost genomu činí z drozofily unikátní genetický model, jenž je studován už více jak sto let (Jennings, 2011).



Obr. 1: Životní cyklus *D. melanogaster*. (Převzato a upraveno z <https://www.creative-diagnostics.com/Drosophila.htm>).

Jedním z hojně využívaných genetických nástrojů u *D. melanogaster* je pak UAS-Gal4 systém. Ten pomocí transkripčního faktoru Gal4, jež je původně z kvasinek, umožňuje

modulovat tkáňově specifickou expresi genů (Brand a Perrimon, 1993). Variace vycházející z tohoto systému je pak UAS-Gal4Gal80 systém. Využitím teplotně senzitivního inhibičního proteinu Gal80 nám tak tento systém umožňuje regulovat expresi cílového genu nejen v rámci specifické tkáně, ale i v rámci času (Zeidler *et al.*, 2004). Za použití právě tohoto systému byly pak provedeny i všechny experimenty této práce a celý jeho princip je podrobněji vysvětlen v metodologické části.

1.2. Imunitní systém *D. melanogaster* a její obranné mechanismy

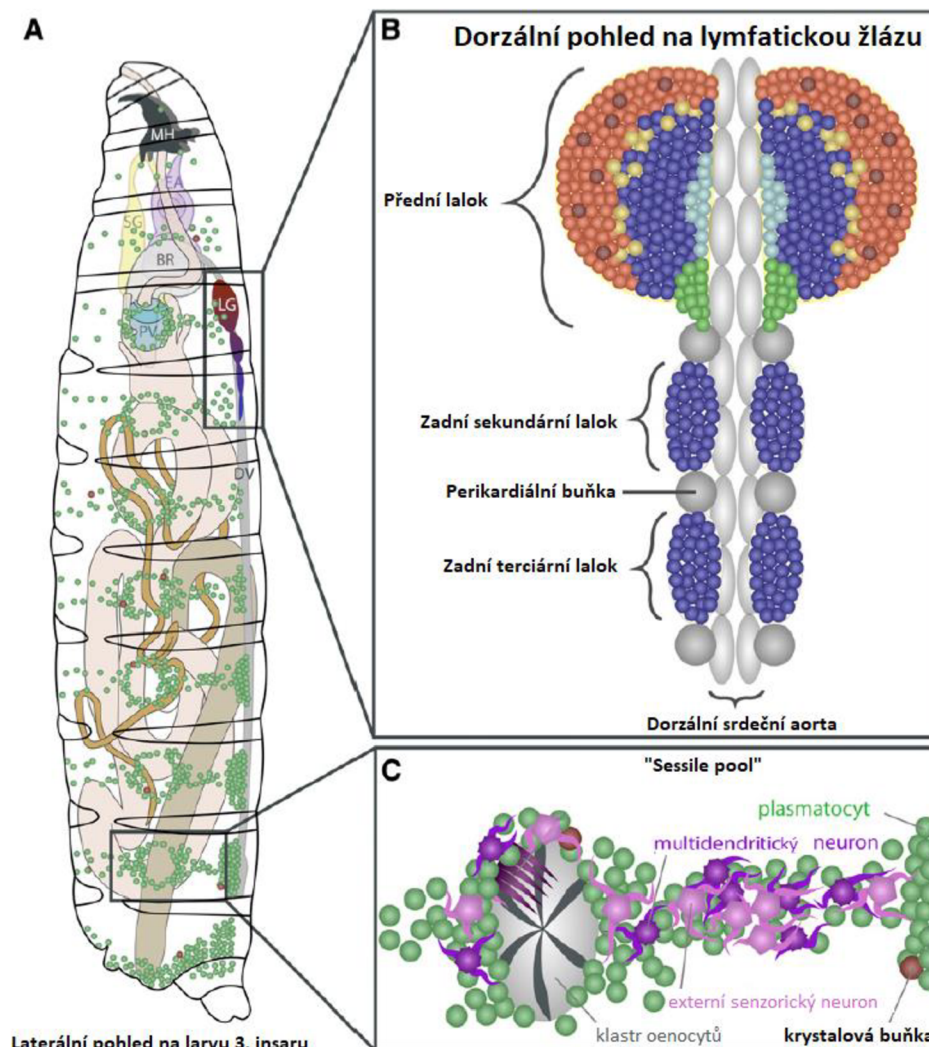
Jakákoliv změna vnějších či vnitřních podmínek představuje pro organismus stres, se kterým se musí vyrovnat. Jedním ze stěžejních systémů, jež pomáhá organismu reagovat na takovou změnu podmínek, je imunitní systém. Ten zajišťuje obranyschopnost organismu před škodlivými exogenními či endogenními látkami a spolu s nervovým a endokrinním systémem udržuje integritu organismu (Sattler, 2017).

Imunitní systém hmyzu, tedy i *D. melanogaster*, je založen zejména na přirozené imunitě. Nemá žádné plazmatické a paměťové B buňky, jako je tomu u obratlovců, a chybí mu proto tzv. protilátkami zprostředkovaná specifická imunita. Nicméně, již dříve bylo prokázáno, že i u bezobratlých se v rámci přirozené imunity vyvinuly i jisté formy specifické neboli adaptivní imunity. Přirozená imunita tak zřejmě disponuje určitou imunologickou pamětí, a je tak mnohem robustnější, než se předpokládalo (Müller *et al.*, 2008; Cooper a Eleftherianos, 2017). Hlavními elementy imunitního systému drozofily jsou imunitní buňky hemolymfy, jež souhrnně označujeme jako hemocyty. Samotný hematopoetický vývoj těchto imunitních buněk pak probíhá již od embrya (Banerjee *et al.*, 2019).

1.2.1. Hematopoéza

Hematopoéza *D. melanogaster* probíhá ve dvou vlnách. První probíhá v embryu v procefalickém neboli hlavovém mezodermu a vznikají při ní cirkulující hemocyty a ostrůvky přisedlých hemocytů, které tvoří tkáň připomínající hematopoetický orgán tzv. „sessile pools“ (Obr. 2, C). Tyto „sessile pools“ se pak nacházejí ve všech 4 stádiích drozofily. Druhá vlna pak probíhá v dorzálním mezodermu za vzniku dorzální srdeční aorty kontrolující otevřený cirkulační systém a hlavního specializovaného hematopoetického orgánu larvy označovaného jako lymfatická žláza (Müller *et al.*, 2008; Banerjee *et al.*, 2019).

Tato lymfatická žláza se vyvíjí až do 3. instaru larvy a skládá se z jednoho páru velkých anteriorních primárních laloků a tří párů menších posteriorních laloků, které se rozprostírají podél přední části dorzální aorty (Obr. 2, B). Každý lalok je pak rozdělen perikardiálními buňkami. Anteriorní primární laloky lze funkčně rozdělit na několik částí. Dřeň sestávající z progenitorových hemocytů, kůru obsahující dospívající hemocyty a posteriorní signální centrum regulující proliferaci a diferenciaci progenitorových hemocytů ve zralé hemocyty. Posteriorní laloky lymfatické žlázy pak svou ultrastrukturou připomínají dřeň a obsahují převážně nediferenciované progenitorové hemocyty (Banerjee *et al.*, 2019). Lymfatická žláza tedy představuje jakýsi rezervoár progenitorových hemocytů, které jsou za specifických zátěžových situací, jako je stres, infekce či metamorfóza, rychle mobilizovány pro adekvátní reakci (Lanot *et al.*, 2001).



Obr. 2: Hematopoetické orgány larvy *D. melanogaster*. A: larva 3. instaru. B: lymfatická žláza – posteriorní signální centrum (zelená), dřeň (modrá) a kůra (čeveno-žlutá) anteriorního primárního laloku a posteriorní laloky (modrá) rozdělené perikardiálními buňkami. C: „sessile pool“. Převzato a upraveno dle Banerjee *et al.* (2019).

Na počátku zakuklení tato lymfatická žláza prochází rozsáhlými změnami. Diferenciované hemocyty se masivně uvoňují do hemolymfy a lymfatická žláza se rozpadá (Banerjee *et al.*, 2019). Poměrně dlouhou dobu se myslelo, že hemocyty dospělé tvoří pouze tyto uvolněné larvální hemocyty spolu s cirkulujícími hemocyty z první hematopoetické vlny (Lanot *et al.*, 2001). Nicméně se zjistilo, že část těchto hemocytů se soustřeďuje v tzv. „hubs“ podél stěny abdomenu a slouží tak zřejmě jako hematopoetický orgán dospělé (Ghosh *et al.*, 2015).

Celkový počet hemocytů se v drozofile liší v závislosti na vývojovém stádiu a vlivu prostředí. V embryu se celkový počet hemocytů pohybuje v řádu stovek. V průběhu larválních stádií pak tento počet mohutně narůstá a v průběhu stádia kukly, kdy larva prochází masivní restrukturalizací tkání v průběhu metamorfózy, dosahuje více jak 5000 hemocytů. V dospělci se pak celkový počet hemocytů pravděpodobně pohybuje okolo 1000 až 2000 (Petraiki *et al.*, 2015; Banerjee *et al.*, 2019).

1.2.2. Přirozená imunita *D. melanogaster*

Jak již bylo řečeno, *Drosophila* se spoléhá zejména na přirozenou imunitu. Kromě fyzikální bariéry v podobě chitinózního exoskeletu či tracheálního a intestinálního endotelu, který chrání organismus před průnikem potenciálního patogenu, se přirozená imunita skládá ze dvou složek - buněčné a humorální imunity (Sackton *et al.*, 2007; Vanha-aho *et al.*, 2016). Navzdory tomuto dělení je však třeba zmínit, že obě složky jsou vzájemně propojené na mnoha úrovních a nelze je tak striktně od sebe oddělit (Rosales, 2017; Dolezal *et al.*, 2019).

Buněčná imunita je zprostředkována hemocyty. Ty svým vývojem a funkcí připomínají savčí myeloidní linii imunitních buněk (Müller *et al.*, 2008). Dle ultrastruktury a funkce pak lze hemocyty drozofily rozdělit na 3 základní typy – plasmatocty, krystalové buňky a lamelocyty (Banerjee *et al.*, 2019). Plasmatocty jsou fagocytující buňky připomínající savčí makrofágy. Je to nejpočetnější skupina hemocytů a vyjma ranného embrya tvoří ve všech vývojových stádiích 90-95 % všech hemocytů (Gold a Brückner, 2015; Banerjee *et al.*, 2019). Kromě eliminace patogenů fagocytózou také napomáhají při parazitoidní imunitní odpovědi a plní významnou funkci v odstraňování buněčné debris či v humorální imunitě produkcí tzv. antimikrobiálních peptidů (AMPs) a srážecích faktorů (Vanha-aho *et al.*, 2016). Krystalové buňky na rozdíl od plasmatoctů nejsou schopné fagocytózy a tvoří pouze 2-5 % všech

hemocytů. Nicméně hrají významnou roli při melanizaci, srážení hemolymfy a imunitní reakci na infekci. Jak již název napovídá, krystalové buňky obsahují krystalické inkluze s enzymem zvaným profenoloxidáza (PPO) (Banerjee *et al.*, 2019). Uvolněním PPO do hemolymfy se spouští proteolytická kaskáda za vzniku nerozpustného melaninu v místě zranění nebo infekce (Eleftherianos a Revenis, 2011; Vanha-aho *et al.*, 2016). Jako odpadní produkt při melanizační kaskádě vznikají i tzv. volné kyslíkové radikály (*reactive oxygen species*, ROS), které mají cytotoxický účinek a podílejí se tak na eliminaci patogenu (Dudzic *et al.*, 2015; Banerjee *et al.*, 2019). Lamelocyty jsou specializované buňky, jež se vyskytují pouze v larválním stádiu, ale za normálních podmínek se ve zdravých larvách téměř neobjevují. Objevují se pouze v reakci na nějaký stres jako je např. parazitoidní infekce, zranění či přítomnost abnormální nebo zničené tkáně (Banerjee *et al.*, 2019). Jsou to velké, ploché buňky nepravidelného tvaru s malým jádrem v porovnání s cytoplasmou (Shrestha a Gateff, 1982). Spolu s krystalovými buňkami pak mají určitou funkční podobnost s lidskými krevními destičkami a tzv. „giant cells“, což jsou zfúzované buňky makrofágů, monocytů aj (Banerjee *et al.*, 2019). Ačkoliv lamelocyty oproti plasmatocytům obsahují více lysozomů a fagocytických vakuol, lamelocyty postrádají schopnost fagocytózy (Banerjee *et al.*, 2019). Na druhou stranu ale exprimují gen pro PPO3 kódující enzym PPO a jsou tak podobně jako krystalové buňky (exprimující gen PPO1 a PPO2) schopné melanizace a tvorby velkého množství kyslíkových radikálů (Dudzic *et al.*, 2015; Banerjee *et al.*, 2019).

Humorální imunita *D. melanogaster* je založená na produkci látek jako jsou antimikrobiální peptidy (AMPs), ale také zahrnuje například produkci volných kyslíkových a dusíkatých radikálů (ROS, RNS) nebo již zmíněnou melanizační kaskádu (Lavine a Strand, 2002; Dolezal *et al.*, 2019). Kromě plasmatocytů a epitelii většinu těchto látek produkuje tukové těleso, které je jakýmsi centrem humorální imunity (Vanha-aho *et al.*, 2016). Ve své podstatě je tukové těleso analogem savčích jater a kromě imunitní funkce má i významný podíl na metabolismu a plní tak určitou duální roli (Dolezal *et al.*, 2019). Produkce AMPs je kontrolována zejména Toll a IMD signalizační dráhou. Přičemž v závislosti na rozdílném složení buněčné stěny patogenu je Toll dráha aktivována při infekci houbami či gram-pozitivními bakteriemi a IMD dráha při infekci gram-negativními bakteriemi (Leclerc a Reichhart, 2004). AMPs tak díky tomuto způsobu rozpoznání buněčné stěny patogenu zajišťují určitou specifičnost imunitní reakce (Vanha-aho *et al.*, 2016).

Imunitní odpověď larvy se vzhledem k patogenu může lišit. Patogen může být eliminován fagocytózou, nodulací, mechanismem podobným savčí NETóze (neutrofilní extracelulární past) nebo enkapsulací spojenou s melanizací (Dolezal *et al.*, 2019). Fagocytóza je zprostředkována plasmatomy, které mohou pomocí receptorů patogen rozpoznat buď přímo dle povrchu buňky, nebo nepřímo přes tzv. opsoniny produkované samotnými plasmatomy. Pokud se larva potřebuje vypořádat s větší dávkou patogenu, kdy fagocytóza na toto množství nestačí, využije nodulaci. Při nodulaci aktivované hemocyty vytváří mnohobuněčné agregáty okolo většího množství patogenu a následně tento útvar melanizují (Rosales, 2017). Podobně jako tomu je u savců, hemocyty hmyzu mohou zřejmě zprostředkovat tzv. neutrofilní extracelulární past (NETózu) a uvolněním nukleových kyselin zachytit a zneškodnit patogen (Altincicek *et al.*, 2008; Dolezal *et al.*, 2019). V případě, že drozofila musí bojovat proti prostorově většímu patogenu jako je vajíčko parazitoida, prvek nebo hlístice, uskuteční tzv. enkapsulaci (viz níže 1.2.3.) (Rosales, 2017).

1.2.3. Aktivace imunitního systému a jeho reakce na infekci parazitoidem

Proces enkapsulace je doposud nejlépe popsán při infekci vajíčkem parazitoidní vosičky *Leptopilina boulardi*. Jelikož je tato vosička přirozeným parazitoidem drozofily i v přírodě, stala se tak ve vědě výborným modelovým systémem pro aktivaci imunitního systému drozofily (Fellowes a Godfray, 2000).

Pomocí kladélka, jímž do larvy může zároveň vypouštět chemické látky potlačující imunitní reakci, klade *Leptopilina* do hoemocoelu larvy svá vajíčka. Z vajíčka se pak buď vylíhne larva vosičky, která se do dovršení dospělosti živí tkáněmi drozofily, nebo larva drozofily zvítězí nad touto infekcí a zničí vajíčko enkapsulací spojenou s melanizací (Labrosse *et al.*, 2003; Schlenke *et al.*, 2007; Banerjee *et al.*, 2019).

Po naklazení vajíčka dochází k aktivaci imunitního systému již samotným porušením kutikuly. Toto poškození totiž způsobuje lokální změny, které pak posteriorní signální centrum lymfatické žlázy díky ROS a jiným signalizačním molekulám vnímá jako stres. Posteriorní signální centrum pak následně reguluje proliferaci a diferenciaci progenitorových hemocytů v lymfatické žláze (Sinenko *et al.*, 2012). V larvě se tak po infekci zvyšuje hladina cirkulujících hemocytů. Zjistilo se, že kromě hemocytů z lymfatické žlázy se do oběhu však mnohem dříve uvolňují i hemocyty z již zmíněných „sessile pools“ (Márkus *et al.*, 2009).

Jako první vajíčko rozpoznávají cirkulující plasmatocyty. Plasmatocyty se na toto vajíčko navážou a vytvoří tak první vrstvy vznikající kapsule (Banerjee *et al.*, 2019). Ty se zde objevují již po 2 hodinách po infekci (Bajgar *et al.*, 2015).

Během 18 hodin po infekci se v hemolymfě objevují již první lamelocyty (Bajgar *et al.*, 2015). Stejně jako plasmatocyty se lamelocyty navážou na již mnohovrstevnou kapsuli a vytvoří mezi sebou velmi těsné spoje oddělující vajíčko od hoemocoelu (Banerjee *et al.*, 2019). Kromě progenitorových buněk lymfatické žlázy či „sessile pools“ mohou lamelocyty vznikat i z plasmatocytů tzv. transdiferenciací (Anderl *et al.*, 2016).

Nakonec je vajíčko asi po 48 hodinách po infekci zničeno melanizací pomocí PPO produkované lamelocyty (PPO3) a krystalovými buňkami (PPO2) (Dudzic *et al.*, 2015; Bajgar *et al.*, 2015; Banerjee *et al.*, 2019).

1.3. Metabolismus imunitních buněk

Úlohou imunitních buněk je zajistit integritu vnitřního prostředí daného organismu. Dalo by se tak říct, že mají dvě hlavní funkce. Za prvé musí být schopny bojovat proti potenciálním patogenům a eliminovat je. Zároveň však musí být schopny pomáhat obnovit poškozené tkáně a včas odstraňovat již odumřelé buňky a jiné látky endogenní povahy, které by následně mohly být pro organismus toxické. Obě tyto funkce v imunitním systému savců zastávají fagocytující buňky přirozené imunity - makrofágy. Lze říci, že makrofágy mají bipolární povahu svého metabolického nastavení, kdy M2 (uzdravující) makrofágy pomáhají obnovit poškozené tkáně a odstranit odumřelé, a naopak M1 (prozánětlivé/zabíjející) makrofágy pomáhají bojovat proti patogenu (Mills *et al.*, 2015). Zatímco pro aktivaci M1 makrofágů je velmi důležitá glykolýza, M2 makrofágy jsou závislé na OXFOS. Inhibicí OXFOS M2 makrofágy ztrácí svůj fenotyp a přeměňují se na M1 makrofágy, a naopak podpořením oxidativního metabolismu M1 ztrácí svůj prozánětlivý charakter (Ganeshan a Chawla, 2014). Úpravou metabolismu jsou tak makrofágy v případě infekce schopné rychle přepnout z M2 do M1 prozánětlivého nastavení (Ganeshan a Chawla, 2014; Mills *et al.*, 2015).

Ekvivalentem lidských makrofágů jsou u *D. melanogaster* plasmatocyty (Gold a Brückner, 2015). Vzhledem k významné podobnosti molekulárních mechanismů aktivující makrofágy drozofily a lidí, lze předpokládat, že i jejich nastavení metabolismu a jeho změny budou podobné. To také dokázala Krejčová *et al.* (2019), když potvrdila, že u aktivovaných

hemocytů dospělé drozofily dochází k metabolickému přesmyku na aerobní glykolýzu, a tedy tzv. Warburg efektu (viz níže 1.3.1). Dá se tedy říct, že se energetický metabolismus aktivovaných hemocytů přesouvá z mitochondrií spíše do cytoplasmy, kde je dále energetická rovnováha buňky kontrolována právě Ak1 (viz níže 1.3.2).

1.3.1. Warburg efekt a teorie „sobeckého“ imunitního systému

V klidovém stavu metabolismus imunitních buněk spoléhá zejména na OXFOS. Pyruvát z glykolýzy je tak primárně směřován do mitochondrie do TCA cyklu, kde kromě ATP současně vznikají NADH redukční síly. Tyto síly jsou následně využity jako zdroj elektronů v elektron transportním řetězci (OXFOS) na intermembráně mitochondrie za spotřeby O_2 a vzniku ATP a H_2O (Palsson-Mcdermott a O'Neill, 2013).

Aktivací imunitního systému však dochází ke zvýšené poptávce po energii. Imunitní odpověď je totiž spojena s řadou energeticky náročných procesů, jako je např. mobilizace buněk, rychlá *de novo* syntéza molekul pro humorální i buněčnou imunitu, masivní proliferace a diferenciace buněk aj. (Lochmiller a Deerenberg, 2000; Dolezal *et al.*, 2019). OXFOS je sice velmi efektivní způsob zpracování glukózy s relativně velkým výtěžkem (téměř 36 molekul ATP na jednu molekulu glukózy). Nicméně samotný proces získání těchto ATP je velmi pomalý. Proto se pro aktivované imunitní buňky stává výhodnější glykolýza. Její výtěžek na jednu molekulu glukózy sice činí pouze 2 molekuly ATP, avšak je mnohonásobně rychlejší. Díky tomu tak celkový výtěžek energie je za krátký časový úsek mnohem vyšší než při OXFOS, a to je při imunitní reakci zásadní. Proto i když mají buňky k dispozici kyslík, tak po aktivaci imunitního systému imunitní buňky přesouvají svůj metabolismus z mitochondrií do cytoplasmy a dávají přednost aerobní glykolýze (Palsson-Mcdermott a O'Neill, 2013; Dolezal *et al.*, 2019). V podstatě totožný proces, kdy dochází k metabolickému přesmyku a buňky namísto OXFOS preferují glykolýzu a to i za aerobních podmínek, poprvé popsal na kvasinkách a nádorových buňkách pan Otto Warburg (Warburg *et al.*, 1927). Po něm pak také tento jev nese název Warburg efekt. Jak se však ukázalo, tuto metabolickou adaptaci využívají i savčí neutrofily, dendritické buňky, makrofágy (Palsson-Mcdermott a O'Neill, 2013; Mills *et al.*, 2015), ale i hemocyty dospělé drozofily infikované *Streptococcus pneumoniae* (Krejčová *et al.*, 2019). Po infekci parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi* byla u hemocytů larev drozofily naměřena zvýšená exprese glykolytických genů (Bajgar *et al.*, 2015), a mimo to i zvýšená produkce laktátu (odpadní produkt glykolytické dráhy při recyklaci NAD^+) jejich

lymfatickými žlázami (Dolezal *et al.*, 2019). Předpokládá se tak, že i po parazitoidní infekci prochází imunitní buňky *D. melanogaster* touto metabolickou změnou.

Kromě Warburg efektu dochází i k mohutnému systemickému přesmyku v celém organismu, kdy většina energie, a tedy glukózy, je směřována směrem k imunitnímu systému, přičemž tuto systemickou změnu indukují samotné imunitní buňky (Bajgar *et al.*, 2015; Bajgar a Dolezal, 2018). Tento koncept zvýhodňování imunitního systému na úkor organismu byl již dříve formulován jako „sobecký“ imunitní systém (Straub, 2014). Bylo prokázáno, že imunitní buňky při metabolickém stresu uvolňují různé signalizační molekuly, jako je např. extracelulární adenosin (Ado) (Bajgar *et al.*, 2015; Bajgar a Dolezal, 2018). Adenosin je nukleosid tvořící základní strukturu molekul jako je ATP, ADP a AMP a je přítomný jak intracelulárně, tak extracelulárně. Tento důležitý metabolit signalizuje stres a jak již bylo prokázáno slouží jako molekula indukující a řídící tento systemický metabolický přesmyk (Bajgar *et al.*, 2015).

1.3.2. Adenylát kináza a její úloha v energetickém metabolismu

Ak katalyzuje interkonverzi 2 molekul ADP na jednu molekulu ATP a AMP. Poměr ATP:AMP je za normálních podmínek přibližně 100:1. Buňky si tedy udržují vysoké hladiny ATP, a naopak velmi nízké hladiny AMP (Hardie *et al.*, 2003). Proto v závislosti na této reakci i malý pokles hladiny ATP (spotřeba energie) vede k relativně velkému vzrůstu hladiny AMP. Tato změna hladiny AMP pak následně pomocí AMP-senzitivních metabolických senzorů a enzymů, jako je AMP-aktivovaná protein kináza (AMPK), zprostředkovává úpravu metabolismu (Dzeja a Terzic, 2009). Aktivovaná AMPK totiž tlumí energeticky náročné anabolické procesy a pro získání ATP indukuje katabolismus, což je pro imunitní buňky nežádoucí (Hardie, 2003). Proto je AMP pravděpodobně využíváné Ak, AMP deaminázou, popř. cytozolickými nukleotidázami (Dzeja a Terzic, 2009). Ak má tak důležitou roli reflektující energetický stav buňky.

Adenylát kináza má hned několik izoform lišící se strukturou, molekulární hmotností, kinetickými vlastnostmi a intracelulární distribucí. Jednotlivé izoformy adenylát kinázy pak díky své lokalizaci vytváří síť, v rámci které pak za neustálé přeměny ATP, AMP a ADP distribuují vysokoenergetické fosfáty a vytváří tak tzv. adenylát kinázový „shuttle“ (Dzeja a Terzic, 2009). Mezi hlavní izoformy adenylát kinázy patří – Ak1, Ak2 a Ak3. Ak1 se

nachází v cytozolu a Ak2 a Ak3 v mitochondriích, přičemž Ak2 je v jejich intermembránovém prostoru a Ak3 se nachází v jejich matrix (Dzeja a Terzic, 2009; Panayiotou *et al.*, 2014).

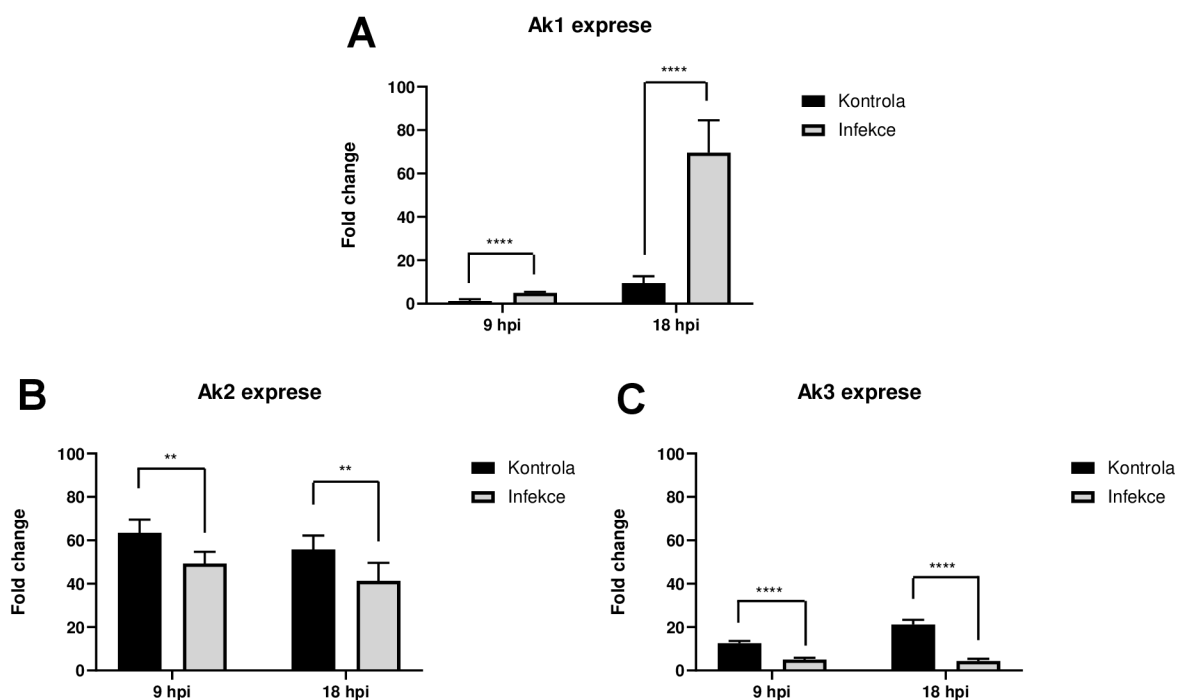
Expres Ak roste při svalové námaze, hypoxii a celkově metabolickém stresu (Linossier *et al.*, 1997). Význam Ak1 v energetické homeostáze je tak vzhledem k její lokalizaci doposud studován převážně v energeticky náročných orgánech, jako je srdce či kosterní svaly. *Ak1* „knock-out“ v těchto tkáních u myši ukázal, že při, že při Ak1 deficienci je při stresové odpovědi snížena AMP signalizace, jež se za normálních podmínek zvyšuje (Hancock *et al.*, 2006; Dzeja, Bast, *et al.*, 2007). Na myším modelu se dále zjistilo, že snížená exprese a aktivita Ak1 je spojená se svalovou dystrofií (Ge *et al.*, 2003). Naopak významně zvýšená exprese a aktivita Ak1 je spojována ku příkladu s obezitou. Vysoká aktivita Ak1 tak zřejmě u obézních lidí způsobuje nerovnováhu v AMP signalizaci podporující metabolický syndrom (Hittel *et al.*, 2005).

Experimenty na svalových buňkách *Ak1* „knock-out“ myši ukázaly, že v případě Ak1 deficiencie jsou za normálních podmínek buňky schopny udržet energetickou homeostázu a stále fungovat. Jejich energetický metabolismus je tak zřejmě přeměřován a kompenzován ostatními izoenzymy Ak, kreatin kinázou (CK) a glykolytickými enzymy (Pucar *et al.*, 2000; Janssen *et al.*, 2000; Janssen *et al.*, 2003). CK katalyzuje fosfotransferovou přeměnu kreatinu na kreatinfosfát za spotřeby ATP. V případě nedostatku energie však reakce probíhá opačně a za současné výroby ATP CK spotřebovává hromadící se ADP a pomáhá tak Ak vyrovnat poměr metabolitů (Dzeja *et al.*, 1996). Také glykolytické enzymy mají schopnost přenosu a distribuce vysokoenergetických fosfátů, díky čemuž umožňují podobnou kompenzaci (Dzeja, Chung, *et al.*, 2007). Tuto enzymatickou spolupráci také podporuje samotná distribuce Ak v kosterních svalech. Ak se zde totiž nachází v lineárních seskupeních spolu s CK a glykolytickými enzymy (Wegmann *et al.*, 1992). Ačkoliv tyto alternativní CK-fosfotransferové a glykolytické kompenzační systémy fungují při Ak1 deficienci za fyziologických podmínek, jakmile je organismus vystaven metabolickému stresu, tak však selhávají (Pucar *et al.*, 2000; Janssen *et al.*, 2000; Janssen *et al.*, 2003).

Imunitní systém také představuje tkáň vyžadující velké množství energie, a to i bez jeho aktivace. Tudíž lze předpokládat velký význam Ak v rámci vývoje a funkce imunitních buněk. Zjistilo se, že mutace v *Ak2* se u lidí objevují ve vztahu s retikulární dysgenezí (RD), což je typ vážné kombinované imunodeficiency (SCID) vyznačující se mimo jiné nedostatkem polymorfonukleárů (Pannicke *et al.*, 2009; Lagresle-Peyrou *et al.*, 2009). Souvislost Ak2

s diferenciací leukocytů také potvrzuje fakt, že potlačení Ak2 u *Danio rerio* vede k narušení jejich vývoje (Pannicke *et al.*, 2009). Ak2 má také značný vliv na regulaci apoptózy buněk (Lagresle-Peyrou *et al.*, 2009). V rámci analýzy exprese Ak1 a Ak2 v buněčných populacích periferní krve a kostní dřeně se ukázalo, že všechny leukocyty silně exprimují Ak2 a pouze slabě či vůbec Ak1 (Pannicke *et al.*, 2009). Tato data tak naznačují, že Ak2 má evolučně konzervovanou úlohu v hematopoéze při diferenciaci leukocytů, a že leukocyty by tak mohly být z důvodu nedostatečné kompenzace Ak1 náchylnější k defektům způsobeným Ak2 deficitem (Dzeja a Terzic, 2009; Pannicke *et al.*, 2009). V rámci imunitního systému se pak také zjistilo, že Ak1 deficiencie v erytrocytech vyvolává vzácnou nesférocytární hemolytickou anemii a může vést i k mentální retardaci (Matsuura *et al.*, 1989; Abrusci *et al.*, 2007; Dzeja a Terzic, 2009).

Po aktivaci imunity, kdy, jak již bylo řečeno, imunitní buňky prochází metabolickým přesmykem, upřednostňují glykolýzu a přesouvají tak svůj energetický metabolismus primárně do cytoplazmy, by měla být hlavním uzlem energetické a metabolické homeostázy právě cytoplazmatická Ak1. Tuto skutečnost nám i potvrzují naše data ukazující exprese genů pro tyto izoformy adenylát kinázy v hemocytech larev drozofily po infekci vosičkou *Leptopilina boulardi*. Exprese *Ak1* totiž po infekci dramaticky roste v porovnání s mitochondriálními kinázami, jejichž exprese naopak signifikantně klesá (Obr. 3).



Obr. 3: Expres genů *Ak1-Ak3* v hemocytech wt (wildtype) larev *D. melanogaster* po infekci parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi*. A: exprese *Ak1*. B: exprese *Ak2*. C: exprese *Ak3*. Expres byla měřena v 9 hpi a 18 hpi pomocí RT-qPCR (nepublikováno, Nedbalová, 2019). Relativní exprese jednotlivých genů vyjádřená pomocí „fold change“ je v jednotlivých časech vždy vztažena vzhledem k úrovni exprese *Ak1* v neinfikované kontrole v 9 hpi, která byla uměle stanovena jako 1. Statistická významnost byla vypočtena pomocí Mann-Whitney testu a vyjádřena pomocí hvězdiček (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,001$).**

Adenylát kináza jakožto fosfotransferový enzym představuje unikátní centrum buněčné energetické homeostázy. V naší laboratoři jsme se tak rozhodli prostudovat více do detailu úlohu tohoto enzymu v rámci imunitního systému. Vzhledem k tomu, že role *Ak1* v energetickém metabolismu byla doposud studována především v kosterních a srdečních svalech náš pohled na věc je relativně nový.

1.4. Adenylát kináza a *Drosophila melanogaster*

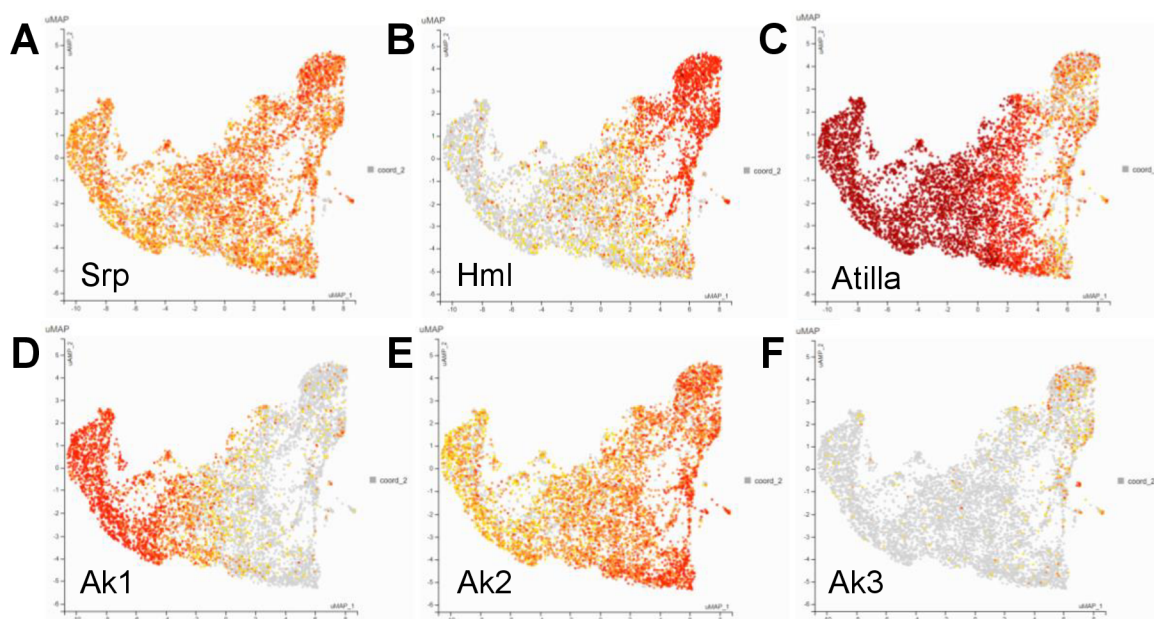
Fujisawa *et al.* (2009) provedli na drozofile podrobnější výzkum zaměřený na tři hlavní *Ak* (*Ak1*, *Ak2*, *Ak3*). Dle fylogenetické analýzy je zřejmé, že *Ak* jsou evolučně a v rámci jednotlivých izoform velmi konzervované. Prokázalo se, že *Ak1* je u drozofily exprimována od larválního stádia a její aktivita spolu s touto expresí výrazně roste od embryonálního stádia až do dospělosti. *Ak2* je exprimována již v embryonálním stádiu, avšak její exprese i aktivita do larválního stádia mírně klesá a v dospělosti opět vzroste. Expres *Ak3* se pak podobně jako u *Ak1* objevuje od larválního stádia a do dospělosti mírně roste, nicméně její aktivita s touto

expresí již nekoreluje a od embrya po larvální stádium mírně klesá a v dospělosti zase vzroste. Pomocí Western blotu byla zjištěna distribuce Ak v jednotlivých částech těla drozofily (hlava, hrudník, abdomen) a zjistilo se, že Ak1 je významně exprimována v hrudníku, jež sestává zejména ze svalů, Ak2 pak v hlavě a Ak3 byla ve všech třech kompartmentech exprimována přibližně stejně. Hlavně se však zjistilo se, že Ak2 je esenciální pro růst a vývoj drozofily a Ak2 deficiencie je u drozofily letální. Tato letalita ve spojitosti s Ak byla tak poprvé u multiceulárního organismu objevena u *D. melanogaster* (Fujisawa *et al.*, 2009). Horiguchi *et al.* (2014) nicméně ověřil, že Ak1 a Ak3 nemají na správný vývoj a životaschopnost *D. melanogaster* vliv.

Fosfotransferový enzym odpovídající savčí CK u *D. melanogaster* je Arginin kináza (ArgK). Obě tyto fosfotransferázy patří do vysoce konzervované rodiny enzymů a předpokládá se, že ArgK zastává u drozofily podobnou funkci (Wallimann a Eppenberger, 1973; Wang *et al.*, 1998). Je tak tedy možné, že podobně jako u savců CK a glykolytické enzymy kompenzují Ak1 deficienci, ArgK a glykolytické enzymy mohou zřejmě kompenzovat Ak1 a Ak3 deficienci u *D. melanogaster*.

Jelikož se ArgK nevyskytuje v intermembránovém prostoru mitochondrie, a Ak2 je tak zde jedinou fosfotransferázou, deficit Ak2 nemůže být kompenzován a Ak2 tak představuje výborný model pro studium jejího vlivu na organismus a metabolismus buněk (Wyss *et al.*, 1995; Fujisawa *et al.*, 2009; Horiguchi *et al.*, 2014). Proto je v rámci jednotlivých izoform adenylát kinázy všeobecný výzkum zaměřen spíše na mitochondriální Ak2. Nicméně vzhledem k tomu, že po aktivaci imunitního systému se energetický metabolismus buněk přesouvá z mitochondrií do cytoplazmy, jsme se rozhodli zaměřit spíše na cytoplazmatickou Ak1, jež by mohla mít za takovéto stresové situace fundamentální význam.

„Single-cell“ výzkum pomocí RNA sekvenování hemocytů po infekci parazitoidní vosičkou ukázal, že *Ak1* je silně exprimovaná v lamelocytech. *Ak2* je poté významně exprimovaná ve všech hemocytech s vyšší expresí naopak v plasmatocytech. I přestože naše data (Obr. 3) ukazují, že exprese *Ak2* po infekci signifikantně klesá, je tato izoforma ve srovnání s *Ak1* stále silně exprimovaná. Jelikož je *Ak2* jediný enzym schopný transportu ATP, ADP a AMP v mitochondriálním intermembránovém prostoru, dá se předpokládat, že bude mít svoji významnou úlohu i ve chvíli, kdy je energetický metabolismus směřován spíše do cytosolu (Obr. 4) (Tattikota *et al.*, 2020).



Obr. 4: Genová exprese v larválních hemocytech *D. melanogaster* ve 48 hpi *L. bouhardi*.
 A: *Srp* – specifický marker pro hemocyty. B: *Hml* – specifický marker pro plasmatocyty. C: *Atilla* – specifický marker pro lamelocyty. D: *Ak1*. E: *Ak2*. F: *Ak3*. Převzato a upraveno dle Tattikota *et al.* (2020).

Ve všech jednotlivých zárodečných listech, ve svalech, ve střevě, v nervové soustavě i v celém těle drozofily umlčení Ak1 neovlivňuje životaschopnost organismu (Horiguchi *et al.*, 2014). Umlčení Ak1 specificky v imunitních buňkách drozofily ovšem nebylo doposud sledováno a vzhledem k energetické náročnosti aktivovaných hemocytů by snížená exprese Ak1 tak mohla ovlivnit účinnost imunitní odpovědi. Vzhledem k jisté podobnosti kompenzačních systémů se savci by tak hypoteticky imunitní buňky drozofily měly být za normálních podmínek pomocí ArgK a glykolytických enzymů schopny kompenzace Ak1, do té doby, než je aktivován imunitní systém. Po aktivaci imunitního systému by mohla být tato snížená hladina Ak1 způsobující metabolickou nerovnováhu dle naší hypotézy pro organismus život ohrožující.

2. CÍLE PRÁCE

1. Ověření RNA interference *adenylát kinázy 1 (Ak1)* u vybraných linií *D. melanogaster*.
2. Umlčení genu *Ak1* a následné vyhodnocení jeho vlivu na aktivaci imunitního systému *D. melanogaster* a její přežití.
3. Ověření exprese *ArgK* a ostatních izoform adenylát kinázy (*Ak2* a *Ak3*) u *D. melanogaster* se sníženou expresí *Ak1*.
4. Metabolomické vyhodnocení potlačení *Ak1* u *D. melanogaster* po aktivaci imunity.

3. MATERIÁLY A METODY

3.1. Chov *Drosophila melanogaster*

Mouchy *Drosophila melanogaster* byly chovány na standardní kukuřičné dietě (Tab. I) v plastových láhách či skleněných vialkách uzavřených vatovou zátkou. Takto byly chovány v prostředí s pravidelným 12 hodinovým střídáním světla a tmy při vlhkosti 60 % a teplotě 25 °C nebo 18 °C dle potřeby. Veškerá manipulace s mouchami pak probíhala za pomoci uspání pod CO₂.

Při křížení byly mouchy *Drosophila melanogaster* chovány v plastových válcích s Petriho miskami na standardní kukuřičné stravě. Pro zvýšení efektivity kladení, byla pak ke standardní kukuřičné stravě přisypávána zrníčka instantních kvasnic.

Tab. I: Standardní kukuřičná dieta.

suroviny	množství
voda	1800 ml
kukuřičná mouka	110 g
agar (Amersco, J637)	17 g
instantní kvasnice	72 g
sacharóza	90 g
10% Methylparaben	30 ml

3.2. Křížení

Pro získání genotypů pro mé experimenty byla provedena křížení s vhodnými výchozími liniemi much, jež byly předem dostupné v naší laboratoři.

Při křížení byl pro indukci tkáňově specifické *Akl* RNA interference (RNAi) využíván UAS-Gal4Gal80 systém. Ten sestává z aktivátoru Gal4 a termosenzitivního represoru Gal80. Gal4 je exprimován pod imunitním tkáňově specifickým promotorem (Srp) a váže se na UAS sekvenci. Gal80, jež je exprimován pod univerzálním promotorem, se váže na Gal4 a blokuje tak expresi příslušných genů. K této represí exprese však dochází pouze pokud je teplota 18 °C. Pokud zvýšíme teplotu prostředí na 25 °C dojde k degradaci Gal80 a následné indukci exprese genů, jež byly v tomto případě zodpovědné za RNAi v imunitních buňkách. Tento

system tak umožňuje nechat larvy vyrůst se správnou hematopoézou a později vyhodnotit vliv RNAi pouze v ohledu aktivace imunity.

3.2.1. Výchozí linie

V následující tabulce jsou uvedeny všechny použité výchozí linie (Tab. II).

Tab. II: Seznam výchozích linií *Drosophila melanogaster*.

číslo	původ	popis	genotyp	chromozom
1666	Tomáš Doležal	Srp-Gal4Gal80	w*; Srp-Gal4 tubP-GAL80ts	3
1446	BL-51799	Ak1 RNAi č.1	y ¹ v ¹ ; P{TRiP.HMC03355}attP40	2
1447	BL-35582	Ak1 RNAi č.2	y ¹ sc* v ¹ ; P{TRiP.GL00177}attP2	3
1499	BL-36304	kontrola č. 1	y ^[1] v ^[1] ; P{y ^[+7.7] =CaryP}attP40	2
1498	BL-36303	kontrola č.2	y ^[1] v ^[1] ; P{y ^[+7.7] =CaryP}attP2	3

Číselné označení všech linií v této tabulce je námi používané označení a vychází z pořadí linií v našem chovu. Většina z těchto much (všechny kromě 1666) pochází z Bloomington *Drosophila* Stock Center (jejich originální katalogová čísla jsou uvedena v tabulce za zkratkou BL) a vychází z tzv. „Transgenic RNAi Project“ (TRiP). Tyto mouchy byly využity pro křížení a získání specifických genotypů umožňující indukovanou RNAi pomocí UAS-Gal4Gal80 systému. Pro zachování podobného genetického pozadí byly použity k dané *Ak1* RNAi i příslušné kontroly s analogickým genetickým pozadím.

3.2.2. Křížení A

V tomto křížení byla k indukci *Ak1* RNAi křížena linie č. 1666 obsahující *Srp-Gal4Gal80* a linie č. 1446 obsahující *Ak1* RNAi konstrukt.

Křížení č. 1: *Srp-Gal4Gal80* (1666) × *Akl RNAi* č.1 (1446)

P: ♀ w^* ; + ; *Srp-Gal4 tubP-GAL80ts* × ♂ $y^1 v^1$; P{TRiP.HMC03355}attP40; +



F1: $\frac{w^*}{y^1 v^1}$; P{TRiP.HMC03355}attP40; *Srp-Gal4 tubP-GAL80ts*

(v grafech psané jako *Srp* > *Akl-RNAi*)

Odpovídající kontrola byla vytvořena křížením linie č. 1666 *Srp-Gal4Gal80* a linie č. 1499 bez *Akl RNAi*.

Křížení č. 2: *Srp-Gal4Gal80* (1666) × kontrola č.1 (1499)

P: ♀ w^* ; + ; *Srp-Gal4 tubP-GAL80ts* × ♂ $y^{[1]} v^{[1]}$; P{ $y^{[+7.7]}$ =CaryP}attP40; +



F1: $\frac{w^*}{y^{[1]} v^{[1]}}$; P{ $y^{[+7.7]}$ =CaryP}attP40; *Srp-Gal4 tubP-GAL80ts*

(v grafech psané jako *Srp* > control)

3.2.3. Křížení B

V tomto křížení k indukci *Akl RNAi* byla křížena linie č. 1666 obsahující *Srp-Gal4Gal80* a linie č. 1447 obsahující *Akl RNAi* konstrukt.

Křížení č. 3: *Srp-Gal4Gal80* (1666) × *Akl RNAi* č. 2 (1447)

P: ♀ w^* ; + ; *Srp-Gal4 tubP-GAL80ts* × ♂ $y^1 sc^* v^1$; + ; P{TRiP.GL00177}attP2



F1: $\frac{w^*}{y^1 sc^* v^1}$; + ; $\frac{Srp-Gal4 tubP-GAL80ts}{P\{TRiP.GL00177\}attP2}$

(v grafech psané jako *Srp* > *Akl-RNAi*)

Křížením linie č. 1666 *Srp-Gal4Gal80* a linie č. 1498 bez *Akl RNAi* byla vytvořena odpovídající kontrola.

Křížení č. 4: *Srp-Gal4Gal80* (1666) × kontrola č. 2 (1498)

P: ♀ *w**; + ; *Srp-Gal4 tubP-GAL80ts* × ♂ *y^[1] v^[1]*; + ; *P{y^[+7.7]=CaryP}attP2*



F1: $\frac{w^*}{y[1]v[1]}; + ; \frac{Srp-Gal4\ tubP-GAL80ts}{P\{y[+7.7]=CaryP\}attP2}$
(v grafech psané jako *Srp* > *control*)

3.3. Infekce

K aktivaci imunitní odpovědi byly vždy použity infekce parazitoidními vosičkami *Leptopilina boulardi*. Larvy časného třetího instaru byly na Petriho misce se standardní kukuřičnou stravou inkubovány v plastovém válci s přibližně 120 samičkami (a 30 samečky) vos *Leptopilina boulardi*, jež naklazením vajíček infikovaly larvy. Počet larev a čas inkubace se lišil dle typu experimentu. Síla infekce byla vždy následující den před vlastním experimentem zkontrolována pod binokulární lupou při pitvání v 1× PBS.

3.4. Kvantitativní PCR spojená s reverzní transkripcí (RT-qPCR)

Pomocí dvoukrokové kvantitativní „real-time“ polymerázové řetězové reakce spojené s reverzní transkripcí (RT-qPCR) byla měřena hladina sledované RNA (resp. cDNA), a tedy exprese vybraných genů. Pro vnitřní kontrolu stejného množství vstupního materiálu byla amplifikace sledovaného genu vždy vztahována k referenčnímu „house keeping“ genu Ribozomálního proteinu 49 (Rp49), u něhož je v experimentálním i v kontrolním vzorku předpokládána shodná exprese.

3.4.1. Příprava a sběr vzorků

Na přípravu každého vzorku bylo použito 50 larev. Larvy byly nejprve omyty ve vodě a 1x PBS. Pro odebrání vzorku bylo použito podložní sklíčko pokryté parafilmem umístěné na ledu a automatická pipeta. Takto byla larvám ve 2 μl 1× PBS roztržena kutikula, a poté odebrána hemolymfa s buňkami Hemolymfa byla následně přenesena do mikrozkušavky s 200 μl TRIzol reagentem (Ambion). Každý vzorek byl pak zvortexován, stočen,

homogenizován pomocí mechanického homogenizátoru (v digestoři), opět stočen, ponechán 15 min při pokojové teplotě, a nakonec uskladněn v -80 °C před dalším použitím.

Sběr vzorků byl prováděn vždy v čase 0 hpi (*hours post infection*), tedy u neinfikovaných larev, a v 18 hpi u neinfikovaných a infikovaných larev. Pro každý čas bylo pak provedeno 5 nezávislých biologických opakování.

3.4.2. Izolace RNA

RNA byla izolována pomocí kitu Direct-zol™ RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) dle protokolu výrobce. Nakonec byla pomocí spektrofotometru UVS-99 (ACTGene) a agarózové elektroforézy (1% gel v TBE pufru) zkontrolována kvalita izolované RNA. Izolovaná RNA byla skladována při -80 °C před dalším použitím.

3.4.3. Reverzní transkripce

Příprava reverzní transkripce (RT) probíhala na ledu s RNase-free pomůckami a chemikáliemi. K RNA připravené dle 3.4.2 byly nejprve přidány oligo dT primery a dNTPs (Tab. III).

Tab. III: Směs č.1 (pro 1 vzorek).

chemikálie	množství
oligo dT primer (50 μM)	1 μl
dNTPs (10 mM)	1 μl
templátová RNA	8 μl

Připravené vzorky byly pak zahřáty na 65 °C po dobu 5 min a poté zchlazeny na ledu. Dále byly přidány ke každému vzorku enzym, pufr a voda pro finální reakci (Tab. IV).

Tab. IV: Směs č. 2 (pro 1 vzorek).

chemikálie	množství
5× PrimeScript pufr (TaKaRa)	4 μl
PrimeScript reverzní transkriptáza (PSRT; TaKaRa)	0,5 μl
DEPC H ₂ O	5,5 μl

Vzorky byly inkubovány v 30°C/10 min, v 42 °C/60 min, a poté v 70°C/15 min. Nakonec byly vzorky zchlazeny na ledu a dle potřeby uskladněny ve 4 °C či v -80 °C.

3.4.4. Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

Pro qPCR byly připraveny reakční směsi jednotlivých vzorků dle následující tabulky (Tab. V).

Tab. V: Reakční směs na qPCR (pro 1 vzorek).

chemikálie	množství
TP SYBER 2x Master Mix (Top-Bio)	6 µl
PCR ultra H ₂ O (Top-Bio)	2,5 µl
primer forward (20 µM)	0,25 µl
primer reverse (20 µM)	0,25 µl
cDNA	3 µl

Seznam všech použitých primerů je uveden níže v kapitole 8. Přílohy (Tab. VII). Všechny vzorky (biologická opakování) byly vždy měřeny ve 3 technických replikátech. Vlastní qPCR tedy probíhala v 96-jamkové destičce (Bio-Rad) pokryté folií Microseal® 'C' Film (Bio-Rad) a polytetrafluoroethylenovou těsnící podložkou (Bio-Rad) v qPCR termocykleru CFX 1000 Touch Real-Time Cyclyer (Bio-Rad). Pro qPCR byl použit následující protokol (Tab. VI).

Tab. VI: Protokol qPCR.

teplota	čas	jev	počet cyklů
95 °C	3 min	pre-denaturace	1×
94 °C	15 s	denaturace	} 40 ×
60 °C	30 s	nasedání primerů	
72 °C	10 s	elongace	

K ověření specifity reakce byla provedena analýza křivky tání v rozmezí 60-95 °C/cyklus 0,5 °C. Kontrola efektivity reakcí byla pak provedena dle RT-qPCR standardní křivky z desítkového ředění larvální cDNA, jež byla dostupná v naší laboratoři.

3.5. Počítání lamelocytů

Pro posouzení efektivity imunitního systému byly počítány hemocyty larev. Lamelocyty byly počítány v intervalu 18-24 hpi (*hours post infection*), kdy jsou lamelocyty již vyplaveny do oběhu larev, ale nejsou ještě přilepené na vajíčko vosičky. Každé larvě omyté v 1× PBS byla pod binokulární lupou pomocí mikropinzet v 15 µl 1× PBS roztržena kutikula. Pro vyplavení hemolymfy s hemocyty a získání maximálního výtěžku byla takto roztržená kutikula převrácena naruby a opatrně promíchána ve vzniklé suspenzi. Pokud šlo o infikované larvy, byla ještě spočítáním vajíček zkontrolována síla infekce (4-10 vajíček pro tento experiment). Aby se předešlo sedimentaci hemocytů, byla tato suspenze pak ještě párkrát promíchána pipetou (nasátím). Následně bylo odebráno 10 µl této suspenze a přeneseno na hemocytometr (typ Neubauer improved), který byl cca po 10 min přikryt krycím sklíčkem (pro usazení hemocytů). Nakonec byly pod mikroskopem (Leica DM2500 LED) s DIC (diferenciálním interferenčním kontrastem) spočteny lamelocyty.

3.6. Test přežití

Test přežití prokazuje životaschopnost jednotlivých linií a ukazuje tak, zda jejich imunitní systém funguje dostatečně efektivně. Pro zjištění, zda *Akl* RNAi ovlivňuje životaschopnost drozofily byl tento test použit u neinfikovaných i u infikovaných larev s *Akl* RNAi a její kontroly. V případě larev s infekcí, byly pro potřeby testu použity pouze slabě infikované larvy (1-2 vajíčka na larvu).

Larvy byly rozříděny do vialek se standardní kukuřičnou stravou po 30 jedincích a nechaly se při 25 °C dorůst do dospělosti (cca 7-8 dní). Po vylíhnutí dospělců byl vyhodnocován počet přeživších.

Pro maximální přesnost testu byla ověřena infekce vylíhlých dospělců jejich vypitváním pod binolupou. Infikovaní dospělci měli v těle (abdomenu) melanizované vajíčko. Neinfikovaní dospělci byli z analýzy vyřazeni.

3.7. Metabolomická analýza (MA)

Pro lepší porozumění aktuálního stavu buněk drozofily po aktivaci imunitního systému při snížené expresi *Akl* byla provedena metabolomická analýza.

3.7.1. Příprava a sběr vzorků

Vzorky byly sbírány z infikovaných a neinfikovaných larev Ak1 RNAi line a její kontroly v 18 hpi a pro každou skupinu (s infekcí/bez infekce) bylo provedeno 5 nezávislých biologických opakování.

Na přípravu jednoho vzorku bylo použito 100 larev. Vzorky hemocytů byly sebrány stejným způsobem, jaký je popsán v kapitole (3.4.1). Sebrané hemocyty byly přeneseny do 100 μ l 1 \times PBS. Pro vymytí hemolymfy byly vzorky centrifugovány (5 min, 4 °C, 300 rcf). Po odebrání supernatantu byl buněčný pelet promíchán v 50 μ l ultračisté vody (W) vhodné pro MA analýzu. Tato buněčná suspenze byla 3 \times zamražená v tekutém dusíku a rozpuštěna v 37 °C pro zajištění dostatečné homogenizace buněk. Nakonec bylo ke vzorkům přidáno 200 μ l roztoku acetonitrilu (ACN), metanolu (MeOH) a kyseliny mravenčí (FA). Vzorky byly takto uchovány v -80 °C před dalším zpracováním. Samotné měření, probíhalo v Laboratoři analytické biochemie a metabolomiky (ENTÚ, BC AV ČR) (viz níže 3.7.2).

3.7.2. Metabolomická analýza množství ATP, ADP a AMP

Vzorek byl sonifikován 5 min při 4°C, poté centrifugován (5min, 4°C, 7000 RPM), poté byl odebrán supernatant a peleta byla re-extrahována ve 100 μ l směsi MeOH:ACN:W (2:2:1, v/v/v) za použití ultrazvuku a centrifugace za stejných podmínek. Spojené supernatanty byly odpařeny (Jouan RC 10.10 and RCT 60, Saint Herblain, Francie) a znovu rozpuštěny v 50 μ l 50% ACN. Takto připravený vzorek byl použit pro kvantitativní analýzu ATP, ADP a AMP, pro kterou byl použit kapalinový chromatograf Agilent Infinity II 1290 ve spojení s hmotnostní detektorem Agilen 6495B (vše Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornie, USA). Separace byla provedena na koloně SeQuant ZIC-pHILIC, 150mm \times 4.6 mm i.d., 5 μ m, (Merck KGaA, Darmstadt, Německo) za těchto podmínek:

Průtok mobilních fází 450 μ l/min; nástřik vzorku 5 μ l; teplota kolony 35°C; mobilní fáze A (ACN) a B (20 mmol/l uhličitan amonný o pH = 9.2; nastaven NH₄OH); gradient: 0 min, 20 % B; 20 min, 80 % B; 20.1 min, 95 % B; 23.3 min, 95 % B; 23.4 min, 20 % B; 30.0 min, 20 % B. Nastavení 6495B: parametry Jet Stream iontový zdroj provozovaný v pozitivním módu, teplota sušícího plynu 290 °C, průtok sušícího plynu 11 l/min, tlak na nebulizéru 25 psi, průtok “sheath gas” 12l/min, teplota “sheath gas” 380 °C, napětí na vstupní kapiláře

3500V, napětí na trysce 500V, „iFunnel“: vysoký tlak RF 150V, nízký tlak RF 60V. Hmotnostní spektrometr byl provozován v režimu MRM.

Data byla zabírána MassHunter Workstation verze 10.1 a procesována MassHunter Quantitative Analysis version 9.0.

3.8. Statistické testy a zpracování dat

Veškerá statistická analýza získaných dat a následná tvorba grafů probíhala v programu GraphPad Prism 8. Ve vytvořených grafech je pak statistická významnost vyjádřena pomocí hvězdiček, kdy jedna hvězdička (*) = p-hodnota $\leq 0,05$, dvě hvězdičky (**) = p-hodnota $\leq 0,01$, tři hvězdičky (***) = p-hodnota $\leq 0,001$. U všech vzniklých dat byla zkontrolována normalita a homogenita variancí a následně byla tato data vyhodnocena pomocí T-testu, popř. Mann-Whitney testu.

Z výchozích dat z RT-qPCR byla výsledná exprese genů vypočtena pomocí $\Delta\Delta Ct$ (double-delta Ct) analýzy. Z Ct (z angl. cycle threshold) hodnot jednotlivých technických triplikátů byl vytvořen aritmetický průměr, jež zastupoval Ct hodnotu jednotlivého biologického „replikátu“. Jak již bylo naznačeno (viz výše 3.4.) exprese cílových genů byla normalizována dle exprese Rp49 a u každého biologického opakování experimentální i kontrolní linie byla vypočtena hodnota ΔCt dle následujícího vzorce:

$$\Delta Ct = Ct (\text{gen zájmu}) - Ct (\text{housekeeping gen Rp49})$$

Následně byl vytvořen aritmetický průměr z ΔCt hodnot 0 hpi vzorků kontrolní linie, který byl použit jako kalibrační hodnota pro výpočet $\Delta\Delta Ct$ hodnot všech biologických opakování experimentálních i kontrolních linií. Pro výpočet $\Delta\Delta Ct$ hodnot byl tedy použit následující vzorec:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{biologické opakování}) - \Delta Ct (\text{kalibrační hodnota})$$

$\Delta\Delta Ct$ hodnoty všech biologických opakování byly pro odstranění záporných hodnot umocněním čísla 2 na $-(\Delta\Delta Ct)$ převedeny na tzv. „fold change“ neboli násobnou změnu:

$$\text{„fold change“} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

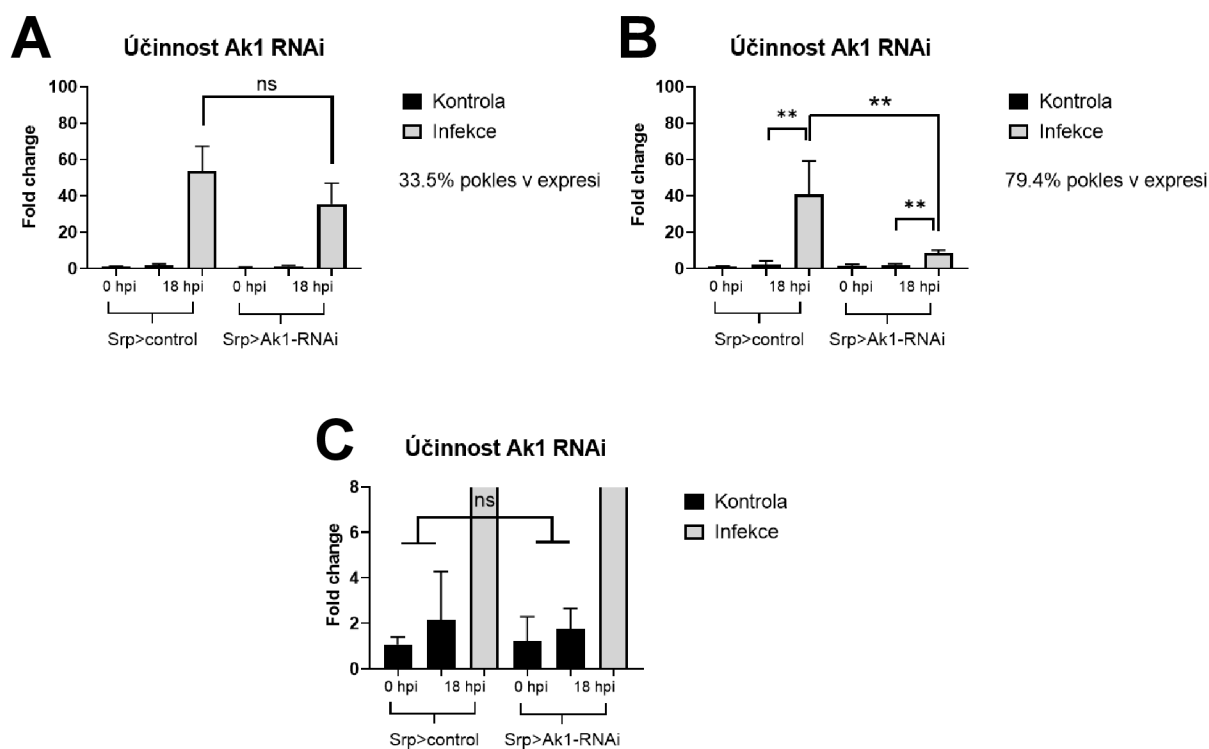
Relativní exprese genů je tak ve výsledných grafech uváděna jako právě zmíněná „fold change“ kalibrovaná dle exprese kontrolní linie v čase 0 hpi, jež se pak v grafech rovná 1. Pokud je tedy u experimentální skupiny vzorků „fold change“ rovná 1, tak relativní exprese sledovaného genu je mezi touto experimentální skupinou a kontrolní (kalibrační) skupinou shodná a nedochází k žádné změně. Hodnoty „fold change“ vyšší než 1 pak značí zvýšenou expresi, a naopak hodnoty nižší než 1 značí sníženou expresi.

Při počítání hemocytů byl výsledný počet buněk na larvu vypočten dle vzorce Neubauer improved.

4. VÝSLEDKY

4.1. Ověření efektivity RNA interference

Cílem této práce bylo vyhodnotit vliv umlčení *Ak1* na funkci imunitního systému *D. melanogaster*. Toto umlčení bylo v této práci připraveno pomocí *Ak1* RNAi, kterou bylo nutné nejprve ověřit. Naše laboratoř měla k dispozici dvě linie umožňující *Ak1* RNAi (1446, 1447). Proto byla u obou těchto genotypů s *Ak1* RNAi a jejich příslušných kontrol (křížení A a B) s odpovídajícím genetickým pozadím provedena RT-qPCR a ověřena tak její efektivita (Obr. 5).

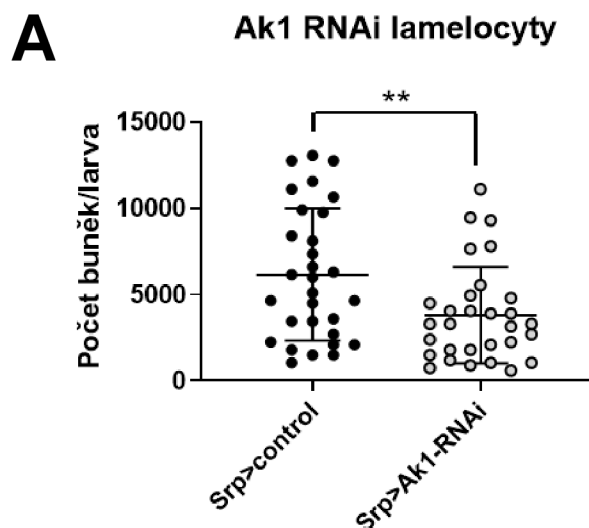


Obr. 5: Relativní množství mRNA *Ak1* u sledovaných skupin genotypů v 0 hod a 18 hod po infekci (hpi). A: *Srp > control* – křížení 1666 × 1499 v 0 hpi a 18 hpi bez infekce (černá) a v 18 hpi s infekcí (šedá); *Srp > Ak1-RNAi* – křížení 1666 × 1446 v 0 hpi a 18 hpi bez infekce (černá) a v 18 hpi s infekcí (šedá). Mezi genotypy došlo po infekci k 33,5% poklesu v expresi *Ak1*. B: *Srp > control* – křížení 1666 × 1498 v 0 hpi a 18 hpi bez infekce (černá) a v 18 hpi s infekcí (šedá); *Srp > Ak1-RNAi* – křížení 1666 × 1447 v 0 hpi a 18 hpi bez infekce (černá) a v 18 hpi s infekcí (šedá). Expresce *Ak1* mezi těmito genotypy po infekci klesla o 79,4 %. C: přibližné B. Relativní exprese genu *Ak1* vyjádřená pomocí „fold change“ je v jednotlivých časech vždy vztažena vzhledem k úrovni relativní exprese *Ak1* v neinfikované kontrole v 0 hpi, která byla uměle stanovena jako 1. Statistická signifikance, jež byla vypočtena pomocí Mann-Whitney testu, je označena hvězdičkami (** $p \leq 0,01$) a písmeny ns (no-significance).

Stejně jako naše předchozí data (viz Obr. 3) výsledky z RT-qPCR potvrdily, že exprese *Akl* se v hemocytech drozofily po infekci výrazně zvyšuje (Obr. 5). Mimo to však tyto výsledky ukázaly, že u prvního křížení A se exprese *Akl* u *Akl* RNAi much po infekci snížila pouze o 33,5 %, což pro účely mých experimentů nebylo dostačující (Obr. 5, A). V případě druhého křížení B však u *Akl* RNAi much došlo po infekci k 79,4% poklesu v expresi *Akl* (Obr. 5, B). V následujících experimentech jsem tak pro indukci *Akl* RNAi již používala pouze toto křížení (B). *Akl* RNAi u tohoto křížení (B) pak za normálních podmínek, tedy bez infekce, nesnižovala expresi *Akl* v porovnání s kontrolou (Obr. 5, C).

4.2. RNA interference *Akl* má negativní vliv na aktivaci imunitního systému *D. melanogaster*

Jak již bylo v úvodu zmíněno, pokud nedojde k aktivaci imunitního systému, tak se lamelocyty v drozofile téměř nevyskytují. Také však již víme, že imunitní odpověď je velmi energeticky náročný proces. Předpokládá se tak, že v případě selhání systémů řídicí energetickou homeostázu může proto dojít k narušení rozvoje efektivní imunitní odpovědi, které se mimo jiné projeví sníženým počtem lamelocytů. Pro vyhodnocení vlivu snížené exprese *Akl* při aktivaci imunitního systému drozofily byl tak po infekci parazitoidní vosičkou u daných genotypů sledován celkový počet lamelocytů (Obr. 6). Lamelocyty byly vždy



Obr. 6: Počet lamelocytů *Akl* RNAi (šedá) a kontrolních larev (černá) *D. melanogaster* 18-24 hodin po infekci. Každý bod reprezentuje počet lamelocytů v larvě. Horizontální čáry uprostřed pak znázorňují aritmetický průměr a jeho směrodatnou odchylku (*standard error of mean*, SEM). Statistická významnost byla vypočtena dle Mann-Whitney testu a znázorněna pomocí hvězdiček (** $p \leq 0,01$).

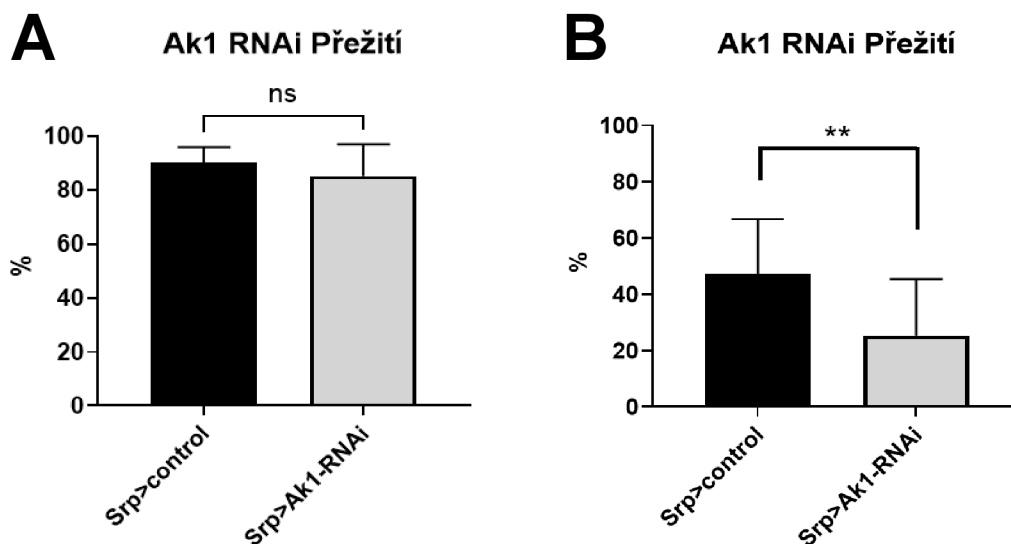
počítány v intervalu 18-24 hpi, a tedy v době kdy by se aktivované lamelocyty již měly nacházet v hemolymfě, ale neměly by plně enkapsulovat vajíčko.

Larvy s *Ak1* RNAi mají v porovnání s kontrolou signifikantně nižší počet lamelocytů. Tyto výsledky tak značí, že potlačení *Ak1* pomocí RNAi negativně ovlivňuje aktivaci imunitního systému *D. melanogaster* a je nutná pro efektivní imunitní odpověď.

4.3. RNA interference *Ak1* má negativní vliv na přežití *D.melanogaster*

Pomocí testu přežití byla nejprve ověřena samotná životaschopnost drozofily se sníženou hladinou *Ak1* bez infekce (Obr. 7, A). Výsledky ukázaly, že mezi kontrolou a *Ak1* RNAi mouchami není signifikantní rozdíl v počtu vylíhnutých dospělých jedinců, tudíž *Ak1* RNAi v hemocytech za normálních podmínek neovlivňuje vývoj *D. melanogaster*.

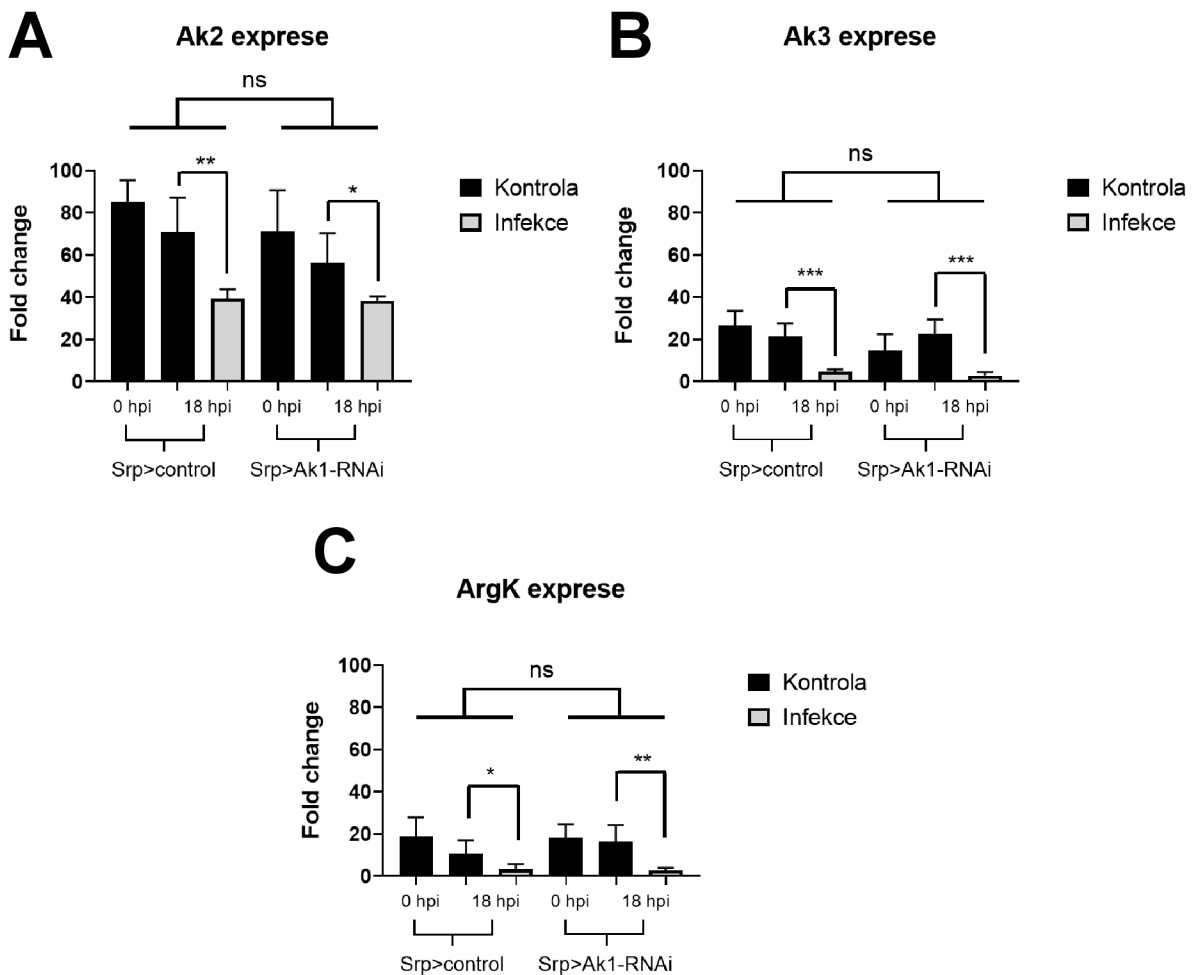
Abychom zjistili, jaký dopad bude mít nižší hladina *Ak1* u drozofily za energeticky náročných podmínek jako je stres způsobený infekcí a následnou aktivací imunitního systému, byl tento test proveden i s larvami po infekci (Obr. 7, B). Ukázalo se, že po aktivaci imunitního systému mají drozofily s *Ak1* RNAi téměř o polovinu nižší procento přežití než kontroly a *Ak1* umlčení tak očividně významně ovlivňuje obranyschopnost *D. melanogaster*.



Obr. 7: Procentuální poměr přeživších jedinců *D. melanogaster* s *Ak1* RNAi (šedá) a příslušné kontroly (černá) bez infekce a po infekci. A: procento přeživších bez infekce. B: procento přeživších po infekci. Míra signifikance byla vypočtena pomocí Mann-Whitney testu a v grafech je znázorněna pomocí hvězdiček ($p \leq 0,01$) a písmeny ns (no-significance).**

4.4. Expres genů mitochondriálních izoform Ak a *ArgK* se u kontrol a *Ak1* RNA interference neliší

Je známo, že *Ak1* deficience může být do jisté míry kompenzována dalšími *Ak* izoformami a CK (resp. *ArgK*). Mým dalším úkolem bylo tedy změřit expres *Ak2*, *Ak3* a *ArgK* v kontrolách a *Ak1* RNAi mouchách a porovnat, zda-li nejsou expresy těchto enzymů v *Ak1* RNAi mouchách významně zvýšené oproti kontrolám. Toto zvýšení by naznačovalo možnou kompenzaci funkce *Ak1*. Proto byla pomocí RT-qPCR u drozofily s *Ak1* RNAi a příslušné kontroly ověřena expres *Ak2*, *Ak3* a *ArgK* (Obr. 8).

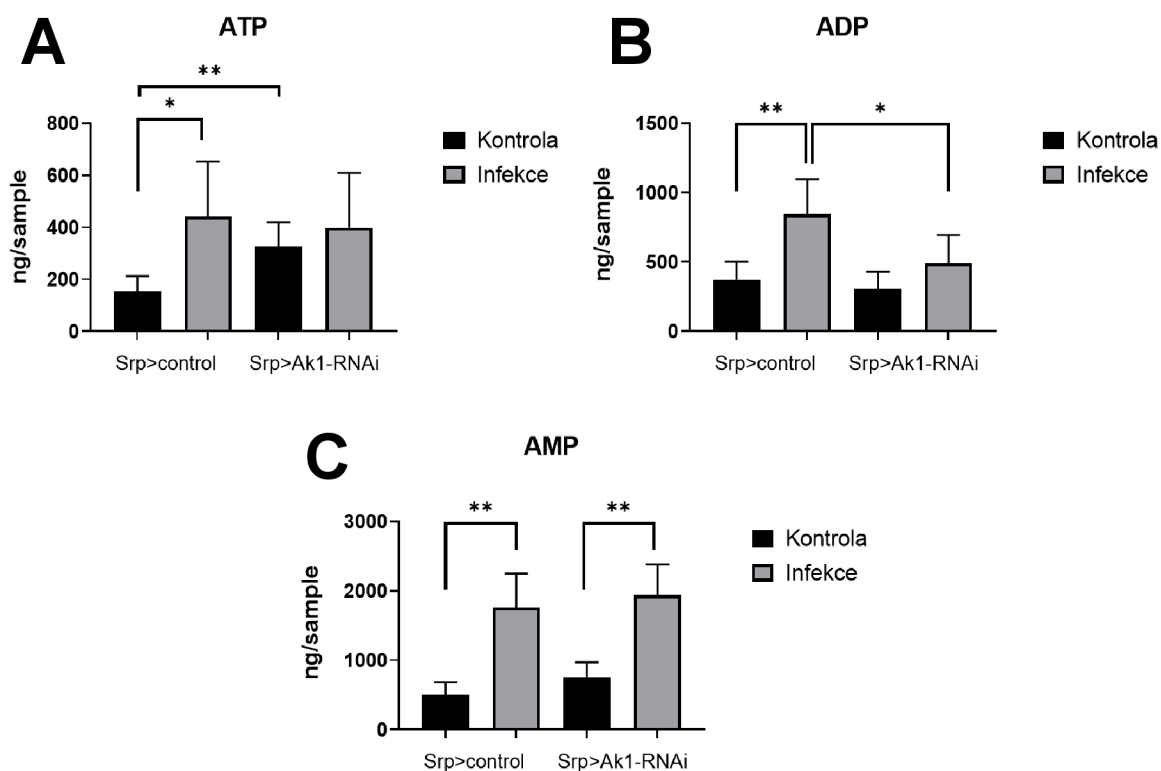


Obr. 8: Relativní množství mRNA *Ak2*, *Ak3* a *ArgK* u *D. melanogaster* s *Ak1* RNAi a příslušné kontroly bez infekce (černá) a s infekcí (šedá) v 0 a 18 hpi. A: expres *Ak2*. B: expres *Ak3*. C: expres *ArgK*. Relativní expres jednotlivých genů vyjádřená pomocí „fold change“ je v jednotlivých časech vždy vztahena vzhledem k úrovni relativní expres daných genů v neinfikované kontrole v 0 hpi, která byla uměle stanovena jako 1. Statistická významnost byla vypočtena pomocí Mann-Whitney testu a vyjádřena pomocí hvězdiček (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,001$) a písmeny ns (no-significance).**

Expresce ani jednoho z těchto enzymů (Ak2, Ak3, ArgK) se po infekci nezvyšuje, ale naopak, jak u kontrol, tak u Ak1 RNAi much, po infekci výrazně klesá. U všech těchto enzymů pak mezi Ak1 RNAi mouchami a kontrolou nedochází k žádné změně v jejich expresi. Tyto výsledky tak naznačují, že mitochondriální izoformy Ak (Ak2, Ak3) a ArgK zřejmě nekompensují nízkou hladinu Ak1 po aktivaci imunitního systému.

4.5. *Ak1* RNAi ovlivňuje hladiny ATP a ADP v hemocytech *D. melanogaster*

Pro hlubší porozumění aktuálního stavu buněk drozofily po aktivaci imunitního systému při Ak1 umlčení byla u Ak1 RNAi a kontrolních larev *D. melanogaster* provedena metabolická analýza hladin ATP, ADP a AMP (Obr. 9).



Obr. 9: Relativní množství ATP, ADP a AMP v Ak1 RNAi a kontrolních larvách *D. melanogaster* bez infekce (černá) a s infekcí (šedá) v 18 hpi. A: ATP. B: ADP. C: AMP. Statistická signifikance byla vypočítána dle Mann-Whitney testu a vyjádřena pomocí hvězdiček (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$).

Množství ATP (Obr. 9, A) se u buněk kontrolních larev drozofily po infekci signifikantně zvyšuje, zatímco u larev s *Ak1* RNAi se navzdory rostoucí tendence neprokázal žádný signifikantní rozdíl. Zajímavé však je, že imunitní buňky Ak1 RNAi larev mají již bez infekce signifikantně vyšší hladinu ATP než kontrola.

Podobně jako ATP má hladina ADP (Obr. 9, B) po infekci zvyšující se tendenci, nicméně toto zvýšení je průkazné pouze u buněk kontrolních larev drozofily. Na rozdíl od ATP je však v rámci neinfikovaných *Ak1* RNAi a kontrolních larev hladina ADP přibližně stejná. Avšak po infekci je hladina ADP u buněk *Ak1* RNAi larev signifikantně nižší v porovnání s kontrolou.

V případě AMP (Obr. 9, C) dle očekávání jeho hladina po infekci významně vzrostla, a to jak u kontroly, tak u *Ak1* RNAi larev. Hladiny AMP pak však byly téměř totožné u obou skupin, jak bez infekce, tak i s infekcí.

Ak1 RNAi tedy ovlivňuje hladiny ATP a ADP v hemocytech *D. melanogaster*.

5. DISKUZE

Z dřívějších studií již víme, že adenylát kináza představuje v buněčném metabolismu jedno z nejdůležitějších center energetické homeostázy (Dzeja a Terzic, 2009; Formoso *et al.*, 2015). Díky své unikátní distribuci napříč buňkou a schopnosti reverzibilní interkonverze molekul ADP na ATP a AMP, je modulací hladin těchto metabolitů zřejmě schopna velmi dobře reflektovat aktuální energetický stav buňky a dle potřeby regulovat její metabolismus. Naše laboratoř ověřila, že imunitní buňky *D. melanogaster* podobně jako u savců po aktivaci procházejí metabolickým přesmykem známým jako Warbug efekt (Krejčová *et al.*, 2019). A protože aktivované imunitní buňky v rámci tohoto jevu upřednostňují aerobní glykolýzu a směřují tak svůj energetický metabolismus do cytoplasmy, rozhodli jsme se zaměřit na cytopazmatickou izoformu adenylát kinázy - Ak1.

Její úloha v aktivaci a metabolismu imunitních buněk byla v mých experimentech zkoumána za pomoci umlčení *Ak1* tkáňově specifickou RNAi v hemocytech drozofily, při níž byla *Ak1* exprese snížena o 79,4 % (Obr. 5).

Na modelu infekce drozofily parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi* jsem zjistila, že Ak1 má významný vliv na aktivaci imunity a její efektivní odpověď. Výsledky z mého experimentu totiž ukázaly, že počet lamelocytů infikovaných Ak1 RNAi larev je v porovnání s kontrolou signifikantně nižší (Obr. 6). U savců byl již prokázán význam Ak v diferenciaci a maturaci bílých (Ak2) i červených (Ak1) krvinek (Matsuura *et al.*, 1989; Pannicke *et al.*, 2009; Dzeja a Terzic, 2009). Nižší počet lamelocytů však značí, že i u drozofily je Ak1 díky svému vlivu na energetickou homeostázu důležitá pro správnou diferenciaci hemocytů a má tak významnou roli při aktivaci imunitního systému. Předchozí studie odhalily, že účinnost imunitní odpovědi proti infekci parazitoidní vosičkou významně koreluje s počtem hemocytů a čím více má octomilka hemocytů, tím vyšší je její rezistence k této infekci (Sorrentino *et al.*, 2004; Kacsoh a Schlenke, 2012). Tuto korelaci např. prokázal Sorrentino *et al.* (2004) na mutantech drozofily s různým počtem hemocytů či Kacsoh a Schlenke (2012) v rámci dvou různých kmenů drozofily. Nicméně samotná vysoká koncentrace plasmocytů k efektivní imunitní odpovědi nestačí, a jak bylo prokázáno na *Drosophila subobscura*, při absenci specializovaných buněk lamelocytů nedochází k úspěšné enkapsulaci vajíčka (Eslin a Doury, 2006). Účinnost imunitní odpovědi je tak všeobecně závislá na schopnosti produkovat dostatečné množství lamelocytů, přičemž čím vyšší je jejich počet, tím efektivnější je imunitní

odpověď. Proto v souladu s touto korelací a vzhledem k výše zmíněným výsledkům lze říci, že Ak1 má značný vliv i na účinnou imunitní odpověď.

Experimenty také prokázaly, že snížená exprese Ak1 v imunitních buňkách nemá vliv na samotnou životaschopnost *D. melanogaster*. Podobně jako v experimentech od Horiguchi *et al.* (2014), kdy Ak1 umlčení ve všech jednotlivých zárodečných listech, svalech, střevě, nervové soustavě i v celém těle drozofily nemělo vliv na její životaschopnost, *Akl* RNAi specifická pro hemocyty neměla v mých experimentech za normálních podmínek vliv na poměr přežití drozofily (Obr. 7, A). Je to s největší pravděpodobností kvůli tomu, že RNAi za normálních podmínek, tj. bez infekce vedoucí k výraznému zvýšení exprese Ak1, bazální expresi Ak1 neovlivňuje (Obr. 5, C).

Nízká hladina Ak1 v imunitních buňkách nemá na životaschopnost drozofily vliv, pokud však nedojde k infekci. V souladu s naší hypotézou se totiž ukázalo, že po aktivaci imunitního systému pomocí infekce vosičkou měly mouchy s Ak1 RNAi v porovnání s kontrolou výrazně nižší procento přežití (Obr. 7, B). Podobně tak v Pucar *et al.* (2000) a Janssen *et al.* (2000) experimentech neměl Ak1 „knock-out“ v srdečních a kosterních svalových buňkách výrazný vliv na udržení energetické homeostázy a v rámci výkonu svalstva nedocházelo k výrazným abnormalitám, dokud však nebyly buňky vystaveny pomocí hypoxie metabolickému stresu. To způsobilo výraznou energetickou dysbalanci, kdy v rámci zvýšených nároků na energii došlo k energetickému deficitu buněk. Vzhledem k podobnostem buněčné signalizace a metabolismu se savci, lze tak předpokládat, že i u hemocytů drozofily nízká hladina Ak1 způsobuje při metabolickém stresu rovněž výrazné narušení energetické homeostázy, čímž pak snižuje schopnost přežití. Jak se tedy ukázalo Ak1 je esenciální pro správnou funkci imunitního systému a je nezbytná pro účinnou obranyschopnost v průběhu infekce.

Jak již bylo naznačeno, při nedostatku Ak1 může zřejmě docházet k jisté kompenzaci jinými fosfotransferovými systémy, jež také zasahují do energetické homeostázy. Již dříve Dzeja *et al.*, (1996) prokázal, že inhibice CK v kosterních svalech potkanů způsobuje zvýšení transferu fosfátů přes Ak. Jako první možnost se tak u snížené exprese Ak1 nabízí kompenzace ostatními izoenzymy Ak (Ak2, Ak3) a fosfotransferovým enzymem ArgK, jež u drozofily zastává podobnou funkci jako savčí CK. Podobnou kompenzační cestu zmínil i Pucar *et al.* (2000) ve své práci na myokardu myši, kde předpokládal, že při Ak1 deficienci tyto mitochondriální Ak předávají zpracované vysokoenergetické fosfáty cytozolické CK a glykolytickým systémům, jež pak zajišťují zachování správné distribuce energie. V jejich

experimentech byla tato kompenzace za normálních podmínek ovšem viditelná pouze na zvyšující se aktivitě glykolytických enzymů, ale exprese a ani aktivita CK se nezvyšovala. Janssen *et al.* (2000) nicméně na kosterních svalech *Ak1* „knock-out“ myši zaznamenal při hypoxii mírné zvýšení transferu fosfátů katalyzovaného CK, čímž byl potvrzen její určitý kompenzační vliv.

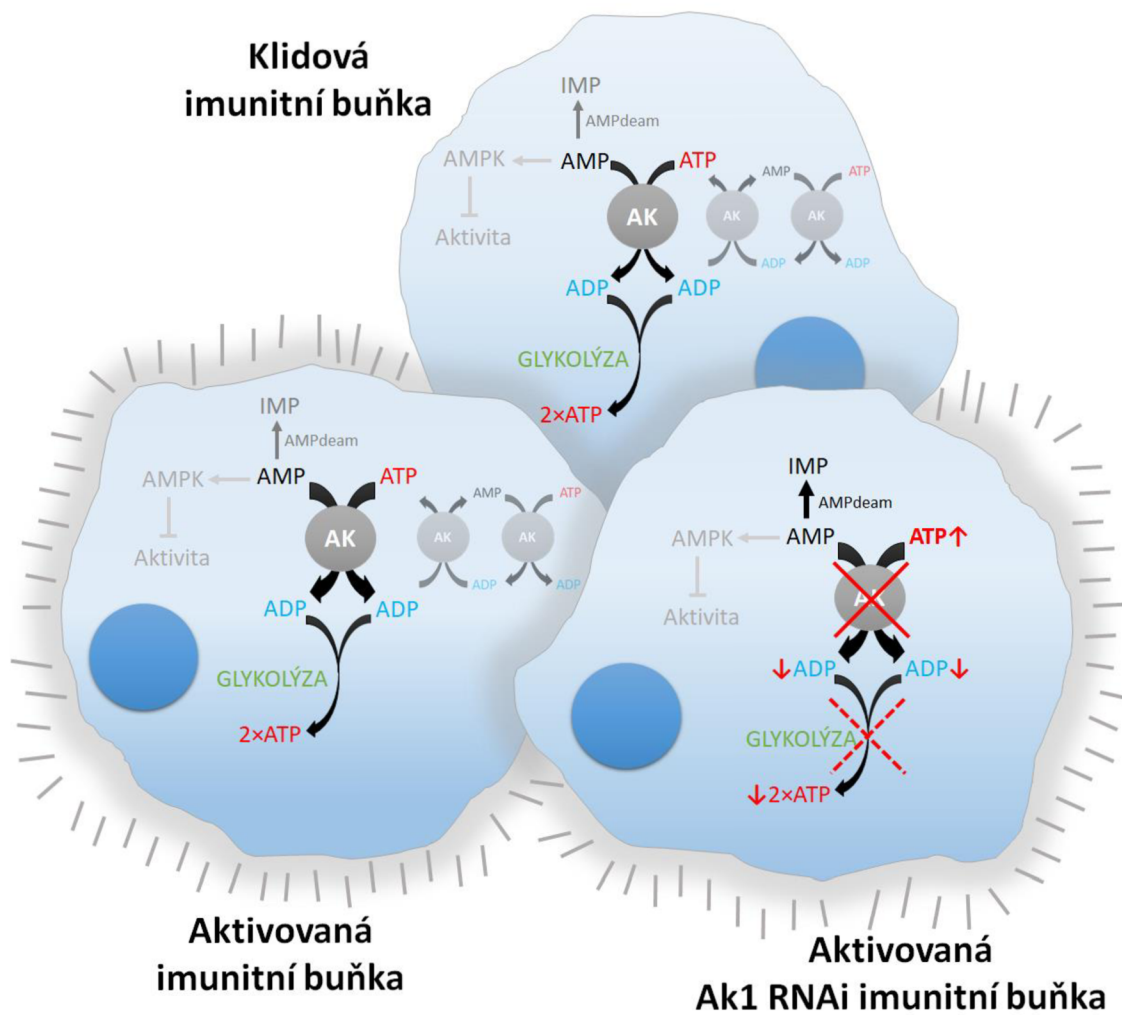
Výsledky z mých experimentů ukázaly, že u *D. melanogaster* se exprese *Ak2*, *Ak3* a *ArgK* v hemocytech larev ani v jednom případě po aktivaci imunitního systému nezvyšuje, ba naopak po infekci významně klesá, a jejich hladiny se u larev s *Ak1* RNAi v porovnání s kontrolou nemění (Obr. 8). Snížená exprese v případě mitochondriálních kináz tak nadále reflektuje přesun energetického metabolismu do cytoplazmy buněk v průběhu infekce (Krejčová *et al.*, 2019; nepublikovaná data od Nedbalová, 2019). V případě *ArgK* pak není zcela jasné, proč její exprese po infekci takto klesá. *ArgK* převádí fosfoarginin a ADP na arginin a ATP (Wang *et al.*, 1998), tudíž nijak nevyužívá AMP, které se na základě našich metabolomických dat po infekci významně zvyšuje (Obr. 9, C). Je tedy možné, že má *Ak1* po infekci zásadní význam právě proto, že dále zpracovává hromadící se AMP, kdežto *ArgK* slouží pouze jako transportér pro vysokoenergetické fosfáty napříč buňkou. Protože hromadící se AMP aktivuje anabolismus-tlumící AMPK, což ovšem není pro imunitní buňky výhodné (viz níže), jeho zpracování v imunitních buňkách *Ak1* nebo AMP deaminázou je velmi důležité. Výsledná exprese *Ak2*, *Ak3* a *ArgK* v *Ak1* RNAi hemocytech po infekci tak naznačuje, že zde nedochází ke kompenzaci snížené hladiny *Ak1*, nicméně pro potvrzení této hypotézy je třeba provést další experimenty založené na měření aktivity těchto enzymů.

Dalším známým kompenzačním mechanismem je glykolýza, resp. glykolytické enzymy, jež mohou být dalším předmětem výzkumu v tomto projektu (Pucar *et al.*, 2000).

V rámci této práce jsem se také zaměřila na to, jak se při snížené expresi *Ak1* mění hladiny ATP, ADP a AMP. Aktivace imunitních buněk je energeticky náročný proces a aktivovaný hemocyt tak vyžaduje poměrně velké množství ATP (Lochmiller a Deerenberg, 2000; Dolezal *et al.*, 2019). Spotřebou ATP však v buňce roste AMP (Pan a Hardie, 2002). Pokud má pak buňka k dispozici dostatečný přísun glukózy, tak *Ak1* může hypoteticky přibývajícím AMP a zbylým ATP převádět na ADP, které může být následně využito v glykolýze pro další tvorbu ATP. Tato hypotéza je tak i v souladu s tím, že vysoká hladina buněčného glykogenu potlačuje aktivaci AMPK (Hardie *et al.*, 2003). Pokud však v buňce není dostatek glukózy, a buňka tak nemá dostatek substrátu pro glykolýzu, v buňce se začne hromadit AMP,

jež následně aktivuje AMPK. Ta ovšem potlačuje anabolismus a inhibuje aktivitu buňky, což je u imunitních buněk nežádoucí jev (Salt *et al.*, 1998; Hardie *et al.*, 2003). Pan a Hardie (2002) pak tuto aktivaci AMPK způsobenou nedostatkem glukózy prokázal i u *D. melanogaster*. Při nedostatku glukózy tak reakce katalyzovaná Ak1 pravděpodobně probíhá v opačném směru a produkcí AMP pak podporuje AMPK signalizaci.

V mých experimentech se ukázalo, že hladiny všech tří metabolitů (ATP, ADP, AMP) v hemocytech *D. melanogaster* mají tendenci se po infekci zvyšovat, nicméně snížená exprese Ak1 má v hemocytech drozofily vliv pouze na hladiny ATP a ADP. Jak se totiž ukázalo, již samotná absence tohoto enzymu, který by za normálních podmínek ATP konvertoval spolu s AMP na ADP, výrazně ovlivňuje hladinu ATP a již bez infekce se jeho hladina v porovnání s kontrolou signifikantně zvyšuje (Obr. 9, A). Oproti tomu hladina ADP se v Ak1 RNAi hemocytech za normálních podmínek v porovnání s kontrolou nemění, nicméně po infekci je jeho hladina oproti kontrole signifikantně nižší (Obr. 9, B). Jedním z vysvětlení tohoto jevu by mohlo být, že imunitní buňka má po aktivaci infekcí stále dostatek glukózy a za fyziologických podmínek tak Ak1 z ATP a AMP produkuje ADP pro glykolýzu, ale jakmile buňce Ak1 chybí, tak nedochází k této konverzi a hladina ADP se díky tomu sníží. Jak se předpokládalo, množství AMP se v hemocytech drozofily po infekci výrazně zvyšuje, jeho hladiny ovšem překvapivě nejsou nižší expresí Ak1 nijak ovlivněny (Obr. 9, C). Nicméně je možné, že hromadící se AMP může být pomocí AMP deaminázy (AMPdeam) konvertováno na IMP, a být tak částečně redukováno (Dzeja a Terzic, 2009). Na základě jiných metabolických měření v naší laboratoři totiž víme, že po infekci se hladina IMP v hemocytech drozofily signifikantně zvyšuje. Tuto hypotézu je však třeba dále ověřit změřením množství IMP i přímo v rámci Ak1 RNAi hemocytů a změřením exprese AMPdeam pomocí qPCR. Dle těchto výsledků z mých experimentů jsem vytvořila ilustrativní schéma shrnující celý děj (Obr. 10). Ačkoliv tedy *Ak1* RNAi v hemocytech drozofily ovlivňuje pouze hladiny ATP a ADP, lze říci, že Ak1 významně zasahuje do energetické homeostázy imunitních buněk a ovlivňuje tak funkci celého imunitního systému.



Obr. 10: Schéma vlivu aktivace a Ak1 umlčení na energetický metabolismus imunitních buněk.

6. ZÁVĚR

Pro vyhodnocení úlohy Ak1 v aktivaci a metabolismu imunitních buněk bylo pomocí RNAi úspěšně provedeno *Ak1* umlčení v hemocytech *D. melanogaster* a za pomoci RT-qPCR byla následně ověřena snížená exprese *Ak1*. Vliv této snížené hladiny Ak1 na imunitní systém drozofily byl pak v této práci studován na modelu infekce parazitoidní vosičkou *Leptopilina boulardi*. Po infekci touto vosičkou bylo na počtu lamelocytů demonstrováno, že Ak1 má významný vliv na aktivaci imunity a její efektivní odpověď. Zjistilo se také, že *Ak1* RNAi nemá za normálních podmínek vliv na samotnou životaschopnost *D. melanogaster*, dokud však není vystavena metabolickému stresu v podobě aktivace imunitního systému, a po infekci vosičkou se výrazně snižuje její životaschopnost. Kromě toho byla prověřena nabízející se možná kompenzace Ak1 ostatními izoformami Ak, mitochondriálními Ak2 a Ak3, a fosotransferovým enzymem ArgK. Výsledky však naznačovaly, že Ak2, Ak3 a ani ArgK pravděpodobně Ak1 nekompenzují. Nakonec se pomocí metabolické analýzy hladin adeninových metabolitů (ATP, ADP, AMP) potvrdilo, že nízká hladina Ak1 v hemocytech drozofily má vliv na hladiny ATP a ADP, a Ak1 tak výrazně ovlivňuje energetickou homeostázu imunitních buněk *D. melanogaster*.

7. SEZNAM LITERATURY

Abrusci, P., Chiarelli, L. R., Galizzi, A., Fermo, E., Bianchi, P., Zanella, A., Valentini, G. (2007) ‘Erythrocyte adenylate kinase deficiency: characterization of recombinant mutant forms and relationship with nonspherocytic hemolytic anemia’, *Experimental Hematology*, 35(8), pp. 1182–1189. doi: 10.1016/j.exphem.2007.05.004.

Altincicek, B., Stötzel, S., Wygrecka, M., Preissner, K. T., Vilcinskas, A. (2008) ‘Host-Derived Extracellular Nucleic Acids Enhance Innate Immune Responses, Induce Coagulation, and Prolong Survival upon Infection in Insects’, *The Journal of Immunology*, 181(4), pp. 2705–2712. doi: 10.4049/jimmunol.181.4.2705.

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), pp. 1–34. doi: 10.1371/journal.ppat.1005746.

Autor neuvėden, ‘*Drosophila*’, *Creative-diagnostics.com* [online], [cit. 5.4.2022], dostupný na: <https://www.creative-diagnostics.com/Drosophila.htm>.

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), pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.pbio.1002135.

Bajgar, A. a Dolezal, T. (2018) ‘Extracellular adenosine modulates host-pathogen interactions through regulation of systemic metabolism during immune response in *Drosophila*’, *PLoS Pathogens*, 14(4), pp. 1–26. doi: 10.1371/journal.ppat.1007022.

Banerjee, U., Girard, J. R., Goins, L. M., Spratford, C. M. (2019) ‘*Drosophila* as a genetic model for hematopoiesis’, *Genetics*, 211(2), pp. 367–417. doi: 10.1534/genetics.118.300223.

Brand, A. H. a Perrimon, N. (1993) ‘Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes’, *Development*, 118(2), pp. 401–415. doi: 10.1242/dev.118.2.401.

Cooper, D. a Eleftherianos, I. (2017) ‘Memory and Specificity in the Insect Immune System: Current Perspectives and Future Challenges’, *Frontiers in Immunology*, 8, p. 539. doi:

10.3389/fimmu.2017.00539.

Dolezal, T. (2015) 'Adenosine: A selfish-immunity signal?', *Oncotarget*, 6(32), pp. 32307–32308. doi: 10.18632/oncotarget.4685.

Dolezal, T., Krejcova, G., Bajgar, A., Nedbalova, P., Strasser, P. (2019) 'Molecular regulations of metabolism during immune response in insects', *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier, 109, pp. 31–42. doi: 10.1016/j.ibmb.2019.04.005.

Dudzic, J. P., Kondo, S., Ueda, R., Bergman, C. M., Lemaitre, B. (2015) 'Drosophila innate immunity: regional and functional specialization of prophenoloxidasases', *BMC Biology*. BMC Biology, 13(1), p. 81. doi: 10.1186/s12915-015-0193-6.

Dzeja, P. P., Bast, P., Pucar, D., Wieringa, B., Terzic, A. (2007) 'Defective metabolic signaling in adenylate kinase AK1 gene knock-out hearts compromises post-ischemic coronary reflow', *Journal of Biological Chemistry*. © 2007 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology., 282(43), pp. 31366–31372. doi: 10.1074/jbc.M705268200.

Dzeja, P. P., Chung, S., Terzic, A. (2007) *Integration of Adenylate Kinase and Glycolytic and Glycogenolytic Circuits in Cellular Energetics, Molecular System Bioenergetics: Energy for Life*. doi: 10.1002/9783527621095.ch8.

Dzeja, P. P., Zeleznikar, R. J., Goldberg, N. D. (1996) 'Suppression of creatine kinase-catalyzed phosphotransfer results in increased phosphoryl transfer by adenylate kinase in intact skeletal muscle', *Journal of Biological Chemistry*, 271(22), pp. 12847–12851. doi: 10.1074/jbc.271.22.12847.

Dzeja, P. a Terzic, A. (2009) 'Adenylate kinase and AMP signaling networks: metabolic monitoring, signal communication and body energy sensing', *International Journal of Molecular Sciences*, 10(4), pp. 1729–1772. doi: 10.3390/ijms10041729.

Eleftherianos, I. a Revenis, C. (2011) 'Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis', *Journal of Innate Immunity*, 3(1), pp. 28–33. doi: 10.1159/000321931.

Eslin, P. a Doury, G. (2006) 'The fly *Drosophila subobscura*: A natural case of innate immunity deficiency', *Developmental and Comparative Immunology*, 30(11), pp. 977–983.

doi: 10.1016/j.dci.2006.02.007.

Fellowes, M. D. E. a Godfray, H. C. J. (2000) 'The evolutionary ecology of resistance to parasitoids by *Drosophila*', *Heredity*, 84(1), pp. 1–8. doi: 10.1046/j.1365-2540.2000.00685.x.

Folkow, B. (1994) 'Increasing Importance of Integrative Physiology in the Era of Molecular Biology', *Physiology*, 9(2), pp. 93–95. doi: 10.1152/physiologyonline.1994.9.2.93.

Formoso, E., Limongelli, V., Parrinello, M. (2015) 'Energetics and structural characterization of the large-scale functional motion of Adenylate Kinase', *Scientific Reports*, 5, p. 8425. doi: 10.1038/srep08425.

Fujisawa, K., Murakami, R., Horiguchi, T., Noma, T. (2009) 'Adenylate kinase isozyme 2 is essential for growth and development of *Drosophila melanogaster*', *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Inc., 153(1), pp. 29–38. doi: 10.1016/j.cbpb.2009.01.006.

Ganeshan, K. a Chawla, A. (2014) 'Metabolic regulation of immune responses', *Annual Review of Immunology*, 32, pp. 609–634. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120236.

Ge, Y., Molloy, M. P., Chamberlain, J. S., Andrews, P. C. (2003) 'Proteomic analysis of mdx skeletal muscle: Great reduction of adenylate kinase 1 expression and enzymatic activity', *Proteomics*, 3(10), pp. 1895–1903. doi: 10.1002/pmic.200300561.

Ghosh, S., Singh, A., Mandal, S., Mandal, L. (2015) 'Active Hematopoietic Hubs in *Drosophila* Adults Generate Hemocytes and Contribute to Immune Response', *Developmental Cell*. The Authors, 33(4), pp. 478–488. doi: 10.1016/j.devcel.2015.03.014.

Gold, K. S. a Brückner, K. (2015) 'Macrophages and cellular immunity in *Drosophila melanogaster*', *Seminars in Immunology*. Elsevier Ltd, 27(6), pp. 357–368. doi: 10.1016/j.smim.2016.03.010.

Hancock, C. R., Janssen, E., Terjung, R. L. (2006) 'Contraction-mediated phosphorylation of AMPK is lower in skeletal muscle of adenylate kinase-deficient mice', *Journal of Applied Physiology*, 100(2), pp. 406–413. doi: 10.1152/jappphysiol.00885.2005.

Hardie, D. G., Scott, J. W., Pan, D. A., Hudson, E. R. (2003) 'Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system', *FEBS Letters*, 546(1), pp. 113–120. doi:

10.1016/S0014-5793(03)00560-X.

Hardie, D. G. (2003) 'Minireview: The AMP-Activated Protein Kinase Cascade: The Key Sensor of Cellular Energy Status', *Endocrinology*, 144(12), pp. 5179–5183. doi: 10.1210/en.2003-0982.

Hittel, D. S., Hathout, Y., Huffman, E. P., Houmard, J. A. (2005) 'Proteome analysis of skeletal muscle from obese and morbidly obese women', *Diabetes*, 54(5), pp. 1283–1288. doi: 10.2337/diabetes.54.5.1283.

Horiguchi, T., Fuka, M., Fujisawa, K., Tanimura, A., Miyoshi, K., Murakami, R., Noma, T. (2014) 'Adenylate kinase 2 deficiency limits survival and regulates various genes during larval stages of *Drosophila melanogaster*', *The Journal of Medical Investigation*, 61(1–2), pp. 137–150. doi: 10.2152/jmi.61.137.

Janssen, E., Dzeja, P. P., Oerlemans, F., Simonetti, A. W., Heerschap, A., De Haan, A., Rush, P. S., Terjung, R. R., Wieringa, B., Terzic, A. (2000) 'Adenylate kinase 1 gene deletion disrupts muscle energetic economy despite metabolic rearrangement', *EMBO Journal*, 19(23), pp. 6371–6381. doi: 10.1093/emboj/19.23.6371.

Janssen, E., Terzic, A., Wieringa, B., Dzeja, P. P. (2003) 'Impaired intracellular energetic communication in muscles from creatine kinase and adenylate kinase (M-CK/AK1) double knock-out mice', *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), pp. 30441–30449. doi: 10.1074/jbc.M303150200.

Jennings, B. H. (2011) 'Drosophila-a versatile model in biology & medicine', *Materials Today*. Elsevier Ltd, 14(5), pp. 190–195. doi: 10.1016/S1369-7021(11)70113-4.

Kacsoh, B. Z. a Schlenke, T. A. (2012) 'High hemocyte load is associated with increased resistance against parasitoids in *Drosophila suzukii*, a relative of *D. melanogaster*', *PLoS ONE*, 7(4), p. e34721. doi: 10.1371/journal.pone.0034721.

Kelly, B. a O'Neill, L. A. J. (2015) 'Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity', *Cell Research*. Nature Publishing Group, 25(7), pp. 771–784. doi: 10.1038/cr.2015.68.

Krejčová, G., Danielová, A., Nedbalová, P., Kazek, M., Strych, L., Chawla, G., Tennessen, J.

- M., Lieskovská, J., Jindra, M., Doležal, T., Bajgar, A. (2019) 'Drosophila macrophages switch to aerobic glycolysis to mount effective antibacterial defense', *eLife*, 8, pp. 1–22. doi: 10.7554/eLife.50414.
- Labrosse, C., Carton, Y., Dubuffet, A., Drezen, J. M., Poirie, M. (2003) 'Active suppression of *D. melanogaster* immune response by long gland products of the parasitic wasp *Leptopilina bouleardi*', *Journal of Insect Physiology*, 49(5), pp. 513–522. doi: 10.1016/S0022-1910(03)00054-4.
- Lagresle-Peyrou, C. *et al.* (2009) 'Human adenylate kinase 2 deficiency causes a profound hematopoietic defect associated with sensorineural deafness', *Nature Genetics*, 41(1), pp. 106–111. doi: 10.1038/ng.278.
- Lanot, R., Zachary, D., Holder, F., Meister, M. (2001) 'Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*', *Developmental Biology*, 230(2), pp. 243–257. doi: 10.1006/dbio.2000.0123.
- Lavine, M. D. a Strand, M. R. (2002) 'Insect hemocytes and their role in immunity', *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier, 32(10), pp. 1295–1309. doi: 10.1016/S0965-1748(02)00092-9.
- Leclerc, V. a Reichhart, J. M. (2004) 'The immune response of *Drosophila melanogaster*', *Immunological Reviews*, 198, pp. 59–71. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.0130.x.
- Linossier, M. T., Dormois, D., Perier, C., Frey, J., Geysant, A., Denis, C. (1997) 'Enzyme adaptations of human skeletal muscle during bicycle short-sprint training and detraining', *Acta Physiologica Scandinavica*, 161(4), pp. 439–445. doi: 10.1046/j.1365-201X.1997.00244.x.
- Lochmiller, R. L. a Deerenberg, C. (2000) 'Trade-offs in evolutionary immunology: Just what is the cost of immunity?', *Oikos*, 88(1), pp. 87–98. doi: 10.1034/j.1600-0706.2000.880110.x.
- Márkus, R., Laurinyecz, B., Kurucz, É., Honti, V., Bajusz, I., Sipos, B., Somogyi, K., Kronhamn, J., Hultmark, D., Andó, I. (2009) 'Sessile hemocytes as a hematopoietic compartment in *Drosophila melanogaster*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(12), pp. 4805–4809. doi: 10.1073/pnas.0801766106.
- Matsuura, S., Igarashi, M., Tanizawa, Y., Yamada, M., Kishi, F., Kajii, T., Fujii, H., Miwa, S., Sakurai, M., Nakazawa, A. (1989) 'Human adenylate kinase deficiency associated with

hemolytic anemia. A single base substitution affecting solubility and catalytic activity of the cytosolic adenylate kinase', *Journal of Biological Chemistry*, 264(17), pp. 10148–10155.

Mills, C. D., Lenz, L. L., Ley, K. (2015) 'Macrophages at the fork in the road to health or disease', *Frontiers in Immunology*, 6, p. 59. doi: 10.3389/fimmu.2015.00059.

Müller, U., Vogel, P., Alber, G., Schaub, G. A. (2008) 'The Innate Immune System of Mammals and Insects', in *Trends in Innate Immunity*. Basel: KARGER, pp. 21–44. doi: 10.1159/000135684.

Palsson-Mcdermott, E. M. a O'Neill, L. A. J. (2013) 'The Warburg effect then and now: From cancer to inflammatory diseases', *BioEssays*, 35(11), pp. 965–973. doi: 10.1002/bies.201300084.

Pan, D. A. a Hardie, D. G. (2002) 'A homologue of AMP-activated protein kinase in *Drosophila melanogaster* is sensitive to AMP and is activated by ATP depletion', *Biochemical Journal*, 367(1), pp. 179–186. doi: 10.1042/BJ20020703.

Panayiotou, C., Solaroli, N., Karlsson, A. (2014) 'The many isoforms of human adenylate kinases', *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Elsevier Ltd, 49(1), pp. 75–83. doi: 10.1016/j.biocel.2014.01.014.

Pannicke, U., Höning, M., Hess, I., Friesen, C., Holzmann, K., Rump, E. M., Barth, T. F., Rojewski, M. T., Schulz, A., Boehm, T., Friedrich, W., Schwarz, K. (2009) 'Reticular dysgenesis (aleukocytosis) is caused by mutations in the gene encoding mitochondrial adenylate kinase 2', *Nature Genetics*, 41(1), pp. 101–105. doi: 10.1038/ng.265.

Petraki, S., Alexander, B., Brückner, K. (2015) 'Assaying blood cell populations of the *drosophila melanogaster* larva', *Journal of Visualized Experiments*, 105(105), p. e52733. doi: 10.3791/52733.

Pucar, D., Janssen, E., Dzeja, P. P., Juranic, N., Macura, S., Wieringa, B., Terzic, A. (2000) 'Compromised energetics in the adenylate kinase AK1 gene knockout heart under metabolic stress', *Journal of Biological Chemistry*, 275(52), pp. 41424–41429. doi: 10.1074/jbc.M007903200.

Rosales, C. (2017) 'Cellular and Molecular Mechanisms of Insect Immunity', in *Insect*

Physiology and Ecology. InTech, pp. 182–190. doi: 10.5772/67107.

Sackton, T. B., Lazzaro, B. P., Schlenke, T. A., Evans, J. D., Hultmark, D., Clark, A. G. (2007) ‘Dynamic evolution of the innate immune system in *Drosophila*’, *Nature Genetics*, 39(12), pp. 1461–1468. doi: 10.1038/ng.2007.60.

Salt, I. P., Johnson, G., Ashcroft, S. J. H., Hardie, D. G. (1998) ‘AMP-activated protein kinase is activated by low glucose in cell lines derived from pancreatic β cells, and may regulate insulin release’, *Biochemical Journal*, 335(3), pp. 533–539. doi: 10.1042/bj3350533.

Sattler, S. (2017) ‘The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection’, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 3–14. doi: 10.1007/978-3-319-57613-8_1.

Schlenke, T. A., Morales, J., Govind, S., Clark, A. G. (2007) ‘Contrasting infection strategies in generalist and specialist wasp parasitoids of *Drosophila melanogaster*’, *PLoS Pathogens*, 3(10), pp. 1486–1501. doi: 10.1371/journal.ppat.0030158.

Shrestha, R. a Gateff, E. (1982) ‘Ultrastructure and Cytochemistry of the Cell Types in the Larval Hematopoietic Organs and Hemolymph of *Drosophila Melanogaster*. (drosophila/hematopoiesis/blood cells/ultrastructure/cytochemistry)’, *Development, Growth and Differentiation*, 24(1), pp. 65–82. doi: 10.1111/j.1440-169X.1982.00065.x.

Sinenko, S. A., Shim, J., Banerjee, U. (2012) ‘Oxidative stress in the haematopoietic niche regulates the cellular immune response in *Drosophila*’, *EMBO Reports*. Nature Publishing Group, 13(1), pp. 83–89. doi: 10.1038/embor.2011.223.

Sorrentino, R. P., Melk, J. P., Govind, S. (2004) ‘Genetic Analysis of Contributions of Dorsal Group and JAK-Stat92E Pathway Genes to Larval Hemocyte Concentration and the Egg Encapsulation Response in *Drosophila*’, *Genetics*, 166(3), pp. 1343–1356. doi: 10.1534/genetics.166.3.1343.

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), p. S4. doi: 10.1186/ar4688.

Straub, R. H. a Schradin, C. (2016) ‘Chronic inflammatory systemic diseases – an evolutionary

trade-off between acutely beneficial but chronically harmful programs', *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2016(1), pp. 37–51. doi: 10.1093/emph/eow001.

Tattikota, S. G., Cho, B., Liu, Y., Hu, Y., Barrera, V., Steinbaugh, M. J., Yoon, S.-H., Comjean, A., Li, F., Dervis, F., Hung, R.-J., Nam, J.-W., Ho Sui, S., Shim, J., Perrimon, N. (2020) 'A single-cell survey of Drosophila blood', *eLife*, 9, pp. 1–35. doi: 10.7554/eLife.54818.

Vanha-aho, L. M., Valanne, S., Rämetsä, M. (2016) 'Cytokines in Drosophila immunity', *Immunology Letters*. Elsevier B.V., 170, pp. 42–51. doi: 10.1016/j.imlet.2015.12.005.

Wallimann, T. & Eppenberger, H. M. (1973) 'Properties of Arginine Kinase from *Drosophila melanogaster*', *European Journal of Biochemistry*, 38(1), pp. 180–184. doi: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb03048.x.

Wang, Y. M. E., Esbensen, P., Bentley, D. (1998) 'Arginine kinase expression and localization in growth cone migration', *Journal of Neuroscience*, 18(3), pp. 987–998. doi: 10.1523/jneurosci.18-03-00987.1998.

Warburg, O., Wind, F., Negelein, E. (1927) 'The metabolism of tumors in the body', *Journal of General Physiology*, 8(6), pp. 519–530. doi: 10.1085/jgp.8.6.519.

Wegmann, G., Zanolla, E., Eppenberger, H. M., Wallimann, T. (1992) 'In situ compartmentation of creatine kinase in intact sarcomeric muscle: The acto-myosin overlap zone as a molecular sieve', *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 13(4), pp. 420–435. doi: 10.1007/BF01738037.

Wyss, M., Maughan, D., Wallimann, T. (1995) 'Re-evaluation of the structure and physiological function of guanidino kinases in fruitfly (*Drosophila*), sea urchin (*Psammechinus miliaris*) and man', *Biochemical Journal*, 309(1), pp. 255–261. doi: 10.1042/bj3090255.

Zeidler, M. P., Tan, C., Bellaïche, Y., Cherry, S., Häder, S., Gayko, U., Perrimon, N. (2004) 'Temperature-sensitive control of protein activity by conditionally splicing inteins', *Nature Biotechnology*, 22(7), pp. 871–876. doi: 10.1038/nbt979.

8. PŘÍLOHY

Tab. VII: Sekvence použitých „forward“ (Fw) a „reverse“ (Rev) primerů při qPCR.

Název primeru	Sekvence primeru (od 5' konce k 3' konci)
Ak1 Fw	CTCGGCATTGATCGTAAGGG
Ak1 Rev	CGATCTGGCGCTGTACTTTG
Ak2 Fw	TCATCGAGTTTGCCATCGAC
Ak2 Rev	CTCCAGTGACATCGTCCGTC
Ak3 Fw	GATCCAGCGATTCTTGACCC
Ak3 Rev	CGGATAACCGAGGTAGGCAAC
Argk Fw	ATGGAGATGATGCGGAGATG
Argk Rev	TCGACGACCACTTCCTGTTC
Rp49 Fw	AAGCTGTGCGCACAATGGCG
Rp49 Rev	GCACGTTGTGCACCAGGAAC