

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



**Studium fyziologických vlastností mutantů IDGF u *Drosophila melanogaster***

Diplomová práce

**Bc. Jitka Kociánová**

**Školitel: Doc. RNDr. Michal Žurovec, CSc.**

České Budějovice 2012

**Bc. Kociánová J., 2012:** Studium fyziologických vlastností mutantů IDGF u *Drosophila melanogaster* [Study of physiological characteristics of *Drosophila melanogaster* IDGF mutants ]- p- 44, University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, Czech Republic.

### **Anotace:**

Products of *Drosophila Idgf* genes comprise a small protein family, related to chitinases. The main function of these proteins is to support cell proliferation and activate immune responses. IDGF proteins are present in large quantity in the hemolymph, especially during infections. In this study, I compared the speed of hemolymph clotting, the number and morphological properties of hemocytes after infection by entopathogenic nematodes and parasitic wasps. The results confirm the role of *Idgf* genes in *Drosophila* immune system.

Tato práce vznikla za podpory Grantové agentury Akademie věd ČR, číslo grantu 610/1013

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

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

V Českých Budějovicích dne 27. 4. 2012

Bc. Jitka Kociánová

**Poděkování:** Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Michalu Žurovcovi, CSc. za „vzetí“ pod pracovní křídla, za jeho vstřícnost a trpělivost se mnou. Můj obrovský dík patří také Mgr. Lucii Kučerové, za cenné rady a pomoc. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře za velmi příjemné pracovní prostředí a atmosféru. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a svému příteli za trpělivost a duševní podporu.

# **OBSAH**

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Co jsou IDGF .....	1
1.2. Rodina IDGF u <i>D. melanogaster</i> .....	2
1.3. Proteiny IDGF a obranyschopnost organismu .....	3
1.4. Hemocyty <i>D. melanogaster</i> a buněčná imunita .....	4
1.5. Infekce <i>D. melanogaster</i> entomopatogenními hlísticemi .....	7
1.6. Parazitace <i>D. melanogaster</i> vosičkami .....	8
<b>2. CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>10</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>11</b>
3.1. Pokusné organismy .....	11
3.2. Půdy a média .....	11
3.3. Použité chemikálie .....	13
3.4. Záchrana delečního mutanta <i>10/3- ΔIDGF 1- 3 (2)</i> .....	13
3.5. Měření srážení hemolymfy .....	14
3.6. Měření počtu hemocytů .....	15
3.7. Vizualizace a měření počtu krystalových buněk .....	15
3.8. Barvení hemocytů protilátkou .....	15
3.9. Infekce hlísticemi <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> .....	16
3.10. Infekce vosičkami <i>Leptophilina boulandi</i> .....	17
3.11. Statistika .....	18
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>19</b>
4.1. Záchrana delečního mutanta <i>10/3- ΔIDGF 1- 3 (2)</i> .....	19
4.2. Měření srážení hemolymfy .....	19
4.3. Měření počtu hemocytů .....	20
4.4. Vizualizace a měření počtu krystalových buněk .....	22
4.5. Barvení hemocytů protilátkou .....	24
<b>5. DISKUZE</b> .....	<b>27</b>
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	<b>30</b>
<b>7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>31</b>

## **PŘÍLOHA I.**

## **PŘÍLOHA II.**

# 1. ÚVOD

## 1.1. Co jsou IDGF

*Drosophila melanogaster* je významný modelový organismus, pro který je možno použít celou řadu propracovaných genetických metod na zjišťování genových funkcí. Díky pokrokům v molekulární biologii, byl rovněž osekvenován její celý genom. Je k dispozici celá řada dobře definovaných buněčných linií. Přečištěním použitého média z linií S2 buněk, které vykazují některé vlastnosti makrofágů, byl roku 1995 izolován abundanční protein o hmotnosti 47 kDa a posléze objeven první z *Idgf* genů nazvaný *Chit-like*, který kóduje protein DS47 (Kirkpatrick et al. 1995). O čtyři roky později byly objeveny i další *Idgf* geny a to díky analýze proteinů přečištěného média, ve kterém rostla kultura buněk imaginálních terčků Cl.8+ (Kawamura et al. 1999). Jednalo se o vůbec první polypeptidické růstové faktory nalezené u bezobratlých živočichů.

Rodina *IDGF* vznikla pravděpodobně duplikací genů pro chitinázy, se kterými se shodují v 15- 25 % (Hakala et al. 1993, Varela et al. 2002). Narozdíl od nich, ale proteiny *IDGF* nemají enzymatickou funkci. Při srovnání proteinů *IDGF* s chitinázami se zjistilo, že u nich došlo na pozici 132 (u *IDGF2*) ke změně klíčové skupiny Glu, která je typická pro chitinázy, na Gln. Proteiny jsou však stále schopny vázat cukerné složky membránových proteinů (Varela et al. 2002). Charakteristická vlastnost proteinů *IDGF* spočívá v tom, že mají buď samotné, nebo ve spolupráci s inzulinem schopnost podporovat proliferaci buněk imaginálních terčků *in vitro* (Kawamura et al. 1999). O dalších funkcích těchto proteinů se vědělo pouze málo, avšak řada vědců se domnívala, že se s největší pravděpodobností jedná o potencionální imunitní faktory (Kirkpatrick et al. 1995). Tato domněnka byla potvrzena na základě expresní čipové analýzy, kdy se zjistilo, že *Idgf* geny jsou přítomny jako součást odpovědi na infekce gramnegativními a grampozitivními bakteriemi (Irving et al. 2005). Koncentrace proteinů *IDGF* v larvální hemolymfě také narůstá při poranění a všichni členové rodiny jsou složkou hmyzího strupu (Karlsson et al. 2004).

Do proteinů podobným chitinázám (se kterými jsou *IDGF* úzce příbuzné) můžeme zařadit i tzv. chitinase-like proteiny, které byly popsány u savců. U člověka se jedná o dva proteiny: HC-gp39 (neboli YKL-40), který je produkován buňkami v synoviální tekutině a buňkami kloubní chrupavky, který ovlivňuje zvýšenou produkci kolagenu. Účastní se zánětlivých procesů, které souvisejí s revmatickými chorobami a osteoartritidou (Hakala et al. 1993, Hu et al. 1996). Druhým proteinem je YKL-39, který je produkován přímo v chondrocytech (Steck et al. 2002). Vysoký obsah těchto proteinů zřejmě souvisí s udržováním homeostáze v chrupavkách (Recklies et al. 2000). U myši se nachází protein ECF-L (synonymum YM-1), který působí jako chemotaktický faktor pro eosinofily (Owhashi et al. 2000). Dále se u myši vyskytuje druhý sekvenčně podobný lektiny YM-2. Oba proteiny YM souvisejí se záněty a přeměnou tkáně během zánětu (Nio et al. 2004).

## 1.2. Rodina IDGF u *D. melanogaster*

U *D. melanogaster* můžeme nalézt šest genů *Idgf*, které mají podobnou sekvenci, ale liší se specifitou exprese a umístěním v genomu. Konkrétně se jedná o geny *Idgf 1- 5* a gen *Chit-like*, kódující protein DS47. Všechny tyto geny mají více méně stejnou délku (2- 3 kb) a exon/ intronové uspořádání (liší se pouze *Idgf 1*, který má o exon méně). V kódujících oblastech navíc všechny vykazují 55 % identitu na úrovni DNA (Kawamura et al. 1999).

Glykoprotein DS47 se nachází na pravém raménku 2. chromozomu, v oblasti 53D a je kódován genem *Chit-like*. Je hojně sekretován embryonální buněčnou linií S2, která má některé vlastnosti makrofágů. Dále je produkován hemocyty a tukovým tělesem, které v hmyzí říši funguje jako analog jater. Stejně jako například pro imunitu důležité cekropiny, je i glykoprotein DS47 sekretován do hemolymfy, což je v souladu s jeho souvislostí s imunitním systémem. Bylo zjištěno, že po infekci bakteriemi jeho hladina klesá (Vierstraete et al. 2004). Dále bylo prokázáno, že mezi lidským HC gp-39, myším YM-1, který je sekretován z aktivovaných makrofágů a proteinem DS47 existuje významná sekvenční homologie vykazující 42- 57% shodu (Kirkpatrick et al. 1995, Kirkpatrick et al. 1997).

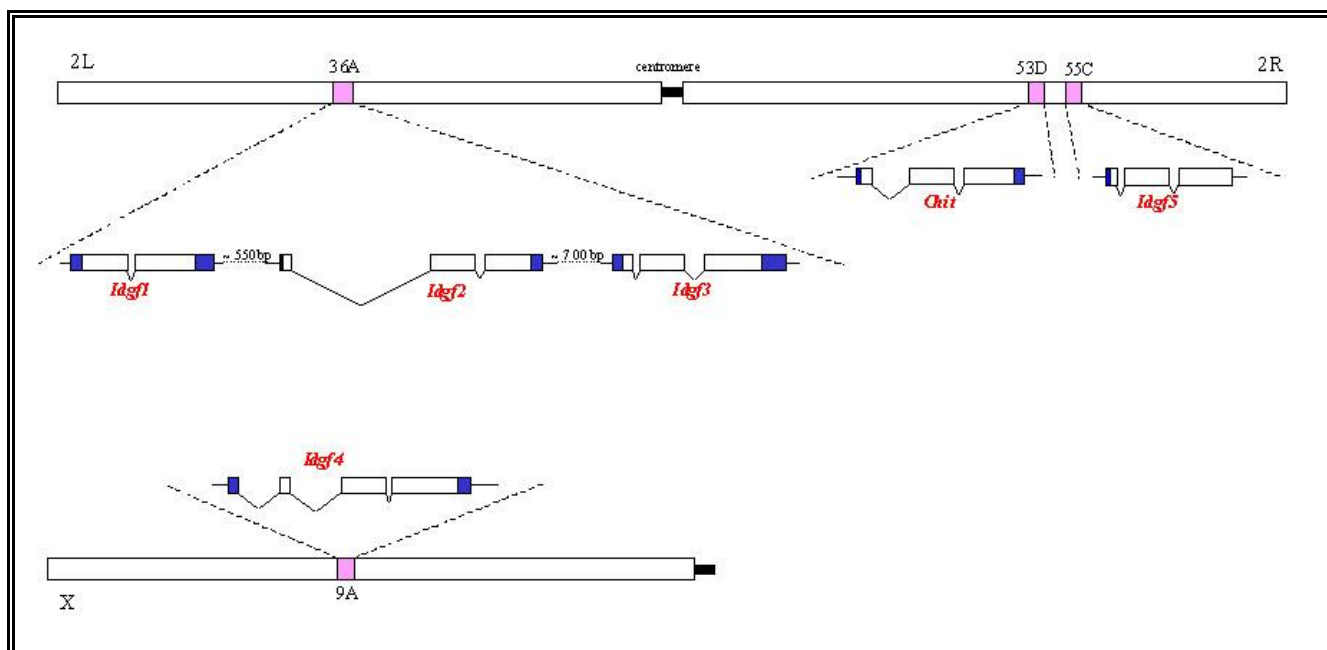
Na levém raménku druhého chromozomu se v oblasti 36A nachází trojice genů *Idgf 1*, *Idgf 2* a *Idgf 3*, které vytváří 7,8 kb dlouhý klastr. Kódují významné proteiny hemolymfy, účastníci se imunitní odpovědi (Kawamura et al. 1999, Vierstraete et al. 2004). Produkovány jsou tukovým tělesem, hemocyty a částečně i lymfatickou žlázou (Irving et al. 2005). *Idgf 1* a *2* stimulují proliferaci, polaritu a motilitu buněk imaginárních terčků *in vitro*. (Kawamura et al. 1999).

*Idgf 1* patří mezi proteiny, které jsou indukovány septickým poraněním. Jeho funkce je pod cirkadiánní kontrolou (Ceriani et al. 2002) a v organismu *D. melanogaster* se se hromadí i s přibývajícím věkem (Zou et al. 2000). Při laboratorních pokusech bylo zjištěno, že se hladiny *Idgf 1* mRNA výrazně zvýší po podání 4- fenylbutyrátu. 4- fenylbutyrát je látka, inhibující histonovou deacetylázu a díky tomu dochází k hyperacetylaci histonů a jejich následnému uvolnění z vazby na chromatinu. U *D. melanogaster* bylo prokázáno, že 4- fenylbutyrátu dokáže prodloužit délku jejich života (Kang et al. 2002).

U proteinu *Idgf 2* je známa krystalická struktura. Hladiny *Idgf 2* a *Idgf 3* výrazně stoupají těsně po infekci grampozitivními bakteriemi a také po infekci kvasinkami jak ve 3. larválním stádiu (Vierstraete et al. 2004), tak i u dospělců (Levy et al. 2004).

*Idgf 4* je jediný gen této rodiny, který se nenachází na autozomu, ale na pohlavním chromozómu X v oblasti 9A. Ve vysokém množství je uchováván ve zralých oocytech. K první expresi dochází během gastrulace podél ventrální rýhy, dále v buňkách žloutku. Na konci embryogeneze a v larválním stádiu se exprese přesouvá do tukového tělesa. Nalezen byl také v peripodiální membráně terčků křídel, kde může jeho sekrece ovlivnit vývoj sloupcovitého epitelu (Butler et al 2003).

Na pravém raménku druhého chromozomu se v oblasti 55C nachází gen *Idgf 5*, který byl nalezen jako poslední a to na základě podobností DNA sekvencí v genomové databázi (Zhu et al 2004).



Obr. 1: Umístění IDGF genů u *Drosophila melanogaster*

### 1.3. Proteiny IDGF a obranyschopnost organismu

Jak již bylo řečeno, *Idgf* geny (konkrétně *Idgf 1-3 +chit-like*) se výraznou měrou podílí na činnosti imunitního systému *D. melanogaster*. Imunitní systém je v podstatě souhrn mechanismů, které zajišťují integritu organismu tím, že rozeznávají a likvidují cizí nebo vlastní potenciálně škodlivé struktury. Imunitní systém je podle způsobu ochrany organismu rozdělen dle specifity do dvou systémů, známých jako vrozená a získaná imunita. Bezobratlí živočichové, včetně hmyzu, využívají vrozenou imunitu. Nejvíce prostudovaný obranný mechanismus této imunity byl popsán právě u *D. melanogaster*.

Přirozenými překážkami při ochraně organismu před patogeny jsou anatomické a fyziologické bariéry. Anatomické bariéry jsou zprostředkovány především kutikulou, epitelem trávicí soustavy, sliznicemi nebo mukózními sekrety a mechanicky zabraňují vstupu infekce do těla (Kindt et al. 2007). Fyziologické bariéry vytváří kaskádu vedoucí k lýze patogenních mikroorganismů uvnitř těla (Jelínek and Zicháček 2000).

Vrozená imunitní odpověď se dělí, podle povahy imunitní obrany, na humorální a buněčnou (Lavine and Strand 2002).

Během humorální imunitní odpovědi jsou spuštěny tři procesy a to sražení hemolymfy, které je spjata s melanizací a dále syntéza antimikrobiálních peptidů (Vilmos and Kurucz 1998) Ke koagulaci hmyzí hemolymfy dochází v místech vnějšího poranění (Theopold et al. 2004). Koagulace je důležitá z hlediska zastavení „krvácení“ a inhibici patogenů, které by se mohly přes poranění dostat do těla (Theopold et al. 2002). Mnohé studie na *D. melanogaster* odhalily, že sraženina zpočátku obsahuje vláknitou matrix s velkým množstvím plasmatocytů (viz dále). Tento proces je následován tuhnutím hemolymfy spojováním proteinů a melanizací (Scherfer et al. 2006), neboli tvorbě strupu, zacelujícího poranění. Tvorba pigmentu melaninu je katalyzovaná enzymem fenoloxidázou, která se při

melanizaci přeměňuje ze své inaktivní formy, profenoloxidázy, na aktivní. Profenoloxidáza je u *D. melanogaster* syntetizovaná v krystalových buňkách a transportována buď do kutikuly, do místa poranění nebo do enkapsulovaného parazita (Ashida and Brey 1995). Poté následuje polymerizace a tvorba černého pigmentu a tím i strupu (Neubauerová et al. 2009).

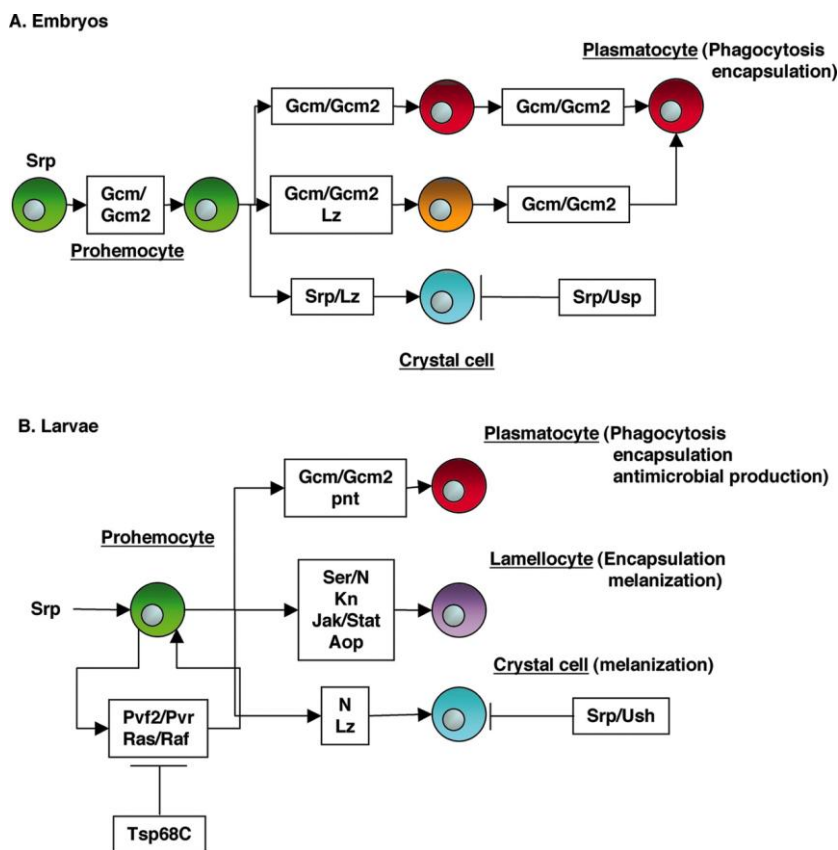
Poté co se do organismu dostal patogen, začne imunitní systém syntetizovat také antimikrobiální peptidy. U *D. melanogaster* se nachází přibližně 34 antimikrobiálních peptidů tvořících rodiny, které se rozdělují podle typu patogenu, na který reagují. Patří mezi ně například cekropiny (reagují na grampozitivní a gramnegativní bakterie, houby), úzkospektré na glycin bohaté attaciny (gramnegativní bakterie) nebo drosomycin (houby) (Hultmark 2003). Antimikrobiální peptidy jsou produkovány v tukovém tělese a jsou vylévány do hemolymfy, kde se několik hodin po infekci může zvýšit jejich množství až na 100  $\mu\text{mol}$  (Neubauerová et al. 2009).

#### **1.4. Hemocyty *D. melanogaster* a buněčná imunita**

Buněčná odpověď je zprostředkována díky hemocytům, obsažených v hemolymfě. Tvarově jsou velmi proměnlivé a všechny mají jádro (Kodrík 2000). Lze je rozdělit do dvou kategorií: volné, které cirkulují tělními dutinami a přisedlé, které bývají přidruženy k různým tkáním a orgánům (Holz et al. 2003). Hemocyty vznikají procesem zvaným hematopoesa, která se odehrává ve dvou odlišných stádiích ontogeneze. První populace buněk vzniká z hlavového mezodermu během časné embryogeneze, následována je pak druhou populací buněk odvozených z mezodermu lymfatické žlázy v pozdější fázi vývoje (Traver and Zon 2002). Hematopoesa probíhá v hematopoetických orgánech, které se nejčastěji nacházející v oblasti srdce nebo jsou s ním přímo spojeny. Hlavním zdrojem hemocytů v *D. melanogaster* je lymfatická žláza, což je struktura poblíž anteriorní části srdce. Nové hemocyty vznikají dělením již existujících hemocytů nebo diferenciací z prohemocytů, některé jsou dokonce odvozené od blastodermu (Holz et al. 2003). Počet hemocytů v hemolymfě kolísá a je závislý na vývojovém stádiu. Během metamorfózy jejich množství narůstá, neboť se zvyšuje potřeba fagocytózy řady částic a velkých molekul, což je úkol pro plasmacyty (Evans et al. 2003, Kodrík 2000). Dospělci *D. melanogaster* postrádají hematopoetickou tkáň, proto jsou během svého krátkého dospělého života závislí pouze na hemocytech vzniklých během embryonálního a larválního stádia (Xionghui et al. 2011).

Díky mnoha vědeckým studiím se dnes také ví, jak je hematopoesa řízena. Pro determinaci a diferenciaci do příslušných cytotypů jsou důležité zejména rodina transkripčních faktorů GATA (Serpent/ GATA), jejich kofaktorů (U-shaped/ FOG), AML1 doména transkripčních faktorů (Lozenge/ Runx1) stejně tak jako Notch signalizace (Duvic et al. 2002), gen *serpent* (Rehorn et al. 1996), gen *Pvf2* pak zodpovídá za proliferaci hemocytů (Munier et al. 2002). Další gen *glial cells missing* ovlivňuje osud plasmacytů, geny *lozenge* a *Notch* pak kontrolují vznik krystalových buněk (Bernardoni et al. 1997).





**Obr. 2: Řízení hematopoesy u *Drosophila melanogaster* (Williams 2007)**

A). Embryo

Gata transkripční faktor Serpent (Srp) je zodpovědný za vznik prohemocytů. Zhruba uprostřed embryonální fáze se začnou iniciovat transkripční faktory Gcm a Gcm2. V některých hemocytech je exprese těchto faktorů snížena, což vede k expresi jiného transkripčního faktoru a to Lz, který náleží do rodiny RUNT. Expres tohoto faktoru vede k diferenciaci některých hemocytů na krystalové buňky. Trvajícím exprese faktorů Gcm a Gcm2 je pak nezbytná pro formaci embryotických plasmatocytů.

B). Larva

V larvální fázi je za vznik prohemocytů zodpovědný také transkripční faktor Spr. Proliferace hemocytů je pod kontrolou PDGF VEGF receptoru Pvr a dráhy Ras/ Raf. Proliferace je inhibována Tsp68C. Podobně jako u embryí je exprese Gcm a Gcm2 zodpovědná za vznik plasmatocytů. Ets transkripční faktor Pointed (Pnt) může být do formace plasmatocytů také zapojen. Dráhy Notch a JAK/ STAT společně s transkripčním faktorem Kn řídí vznik lamelocytů. Do tohoto procesu může být zapojen i Ets inhibiční faktor Anterior open (Aop). Pro formaci krystalových buněk je stejně jako u embryí důležitý Lz. Signální dráha Notch je do formace krystalových buněk zapojena také, na rozdíl od embryí. Proces může být inhibován U- Shaped (Ush) transkripčním faktorem

V larválním stádiu *D. melanogaster* se vyskytuje 5 hlavních typů hemocytů: plasmatocyty, z nichž je odvozeno 95 % cirkulujících hemocytů, podocyty, které vznikají z plasmatocytů na konci třetího larválního stádia, krystalové buňky, lamelocyty a malé přisedlé buňky, které vytváří různě velké skupinky v integumentu (Ritzki and Ritzki 1980, Holz et al. 2003). Pro funkci imunitního systému jsou důležité plasmatocyty, lamelocyty a krystalové buňky. Jejich úkolem je likvidovat cizorodé látky v organismu a podílejí se na fagocytose, tvorbě nodulů a enkapsulaci, což jsou tři základní děje zajišťované buněčnou imunitní odpovědí (Lavine and Strand 2002).

O molekulárních aspektech fagocytosy u hmyzu se ví pouze málo informací (Scott et al. 2005). Princip je ale stejný jako u obratlovců a dochází při něm k obklopení mikroorganismů nebo cizorodých buněk aktivním pohybem cytoplasmy (pseudopodiemi), neboť buňky mají na povrchu pouze tenkou plasmalemu, díky níž dokážou měnit svůj tvar. Vytvoří se měchýřek, do něhož jsou vyloučeny enzymy a ty pak zabezpečí destrukci a strávení obsahu (Nečas et al. 1982). Během nodulace dochází také k obklopení cizorodého organismu, tentokrát ale spojením několika hemocytů. Noduly se pak mohou přichytit ke tkáni nebo mohou být enkapsulovány (Vilmos and Kurucz 1998). Enkapsulace je možno vysvětlit, jako mnohobuněčný obranný mechanismus, zahrnující kooperaci hemocytů, které okolo cizorodé částice vytvoří mnohovrstevnou kapsuli. Enkapsulace je zprostředkována díky cytokinům a adhezním molekulám (Castillo et al. 2011). Nemá vliv na expresi antimikrobiálních peptidů, ale je spojena s procesem melanizací. Ta zajistí, že se díky aktivaci enzymu fenoloxidázy (PO), který katalyzuje počáteční kroky v melanizační reakci, zničí obklopený mikroorganismus, nejčastěji entomopatogenní hlístice nebo vajíčka parazitických vosiček (Vilmos and Kurucz 1998, Gupta 2001).

Během embryogeneze se v organismu vyskytuje pouze první typ hemocytů-plasmatocyty. Obsahují množství drsného endoplasmatického retikula, Golgiho aparátu a mohou obsahovat také granule (Kodrík 2000). Jsou velmi variabilního tvaru a diferencovány jsou z buněk vznikajících v mezodermu (Holz et al. 2003). K diferenciaci dochází v larválním stádiu, kde jsou zastoupeny v hojné míře a přežívají až do dospělosti. Jako jediné hemocyty jsou schopny fagocytosy, což je důležité jednak kvůli odstraňování apoptovaných (= odumřelých díky programované buněčné smrti) tkání během embryonálního vývoje (Kodrík 2000), ale také kvůli likvidaci cizorodých patogenů (např. patogenní bakterie entomopatogenních hlístic) v organismu (Sparrow 1978).

Během larválního stádia se pak začínají diferencovat další dva typy hemocytů: lamelocyty a krystalové buňky.

Lamelocyty jsou poměrně velké ploché buňky (okolo 60  $\mu\text{m}$  a více) typického vzhledu. Jejich cytoplasma obsahuje velké množství ribozomů, je zde ale malé zastoupení ostatních organel. (Lanot et al. 2001). Během larválního stádia dochází v hematopoetických orgánech k jejich diferenciaci z prohemocytů. Zvláštností je, že nikdy nebyly nalezeny u jedinců ve stádiu kukly a ve zdravých, neinfikovaných jedincích se také nevyskytují. V malé míře se ale mohou objevit během metamorfózy (Lanot et al. 2001). Podmětem k jejich diferenciaci je například infekce parazitickými vosičkami nebo tvorba tumoru (Carton and Nappi 2001). Cizorodé částice jsou enkapsulovány nově diferencovanými lamelocyty, které je díky svému tvaru obklopí a přilnou k jejich povrchu. Vytvoří se několikavrstevný útvar, který znekrotizuje a tím cizorodou částici zničí- viz dále (Nappi et al 2000).

Krystalové buňky jsou naproti tomu neadhezivní hemocyty, cirkulující v hemolymfě. Nachází se pouze u *D. melanogaster* a morfologicky jsou podobné oenocytům, které se vyskytují u ostatních hmyzích druhů. (Lavine et Strand 2002). Oenocyty jsou velké, velmi křehké buňky, které v preparátech *in vitro* brzy lyzují a zmizí do několika minut (Strand and Noda 1991). Jejich funkce není zcela jasná. Zřejmě ale produkují látky potřebné pro tvorbu kutikuly a navíc obsahují prekurzory fenoloxidáz. Krystalové buňky naproti tomu plní imunitní funkci,

obsahují prekurzory fenoloxidáz a podílejí na proteolytické kaskádě (Kodrík 2000, Hultmark 2003).

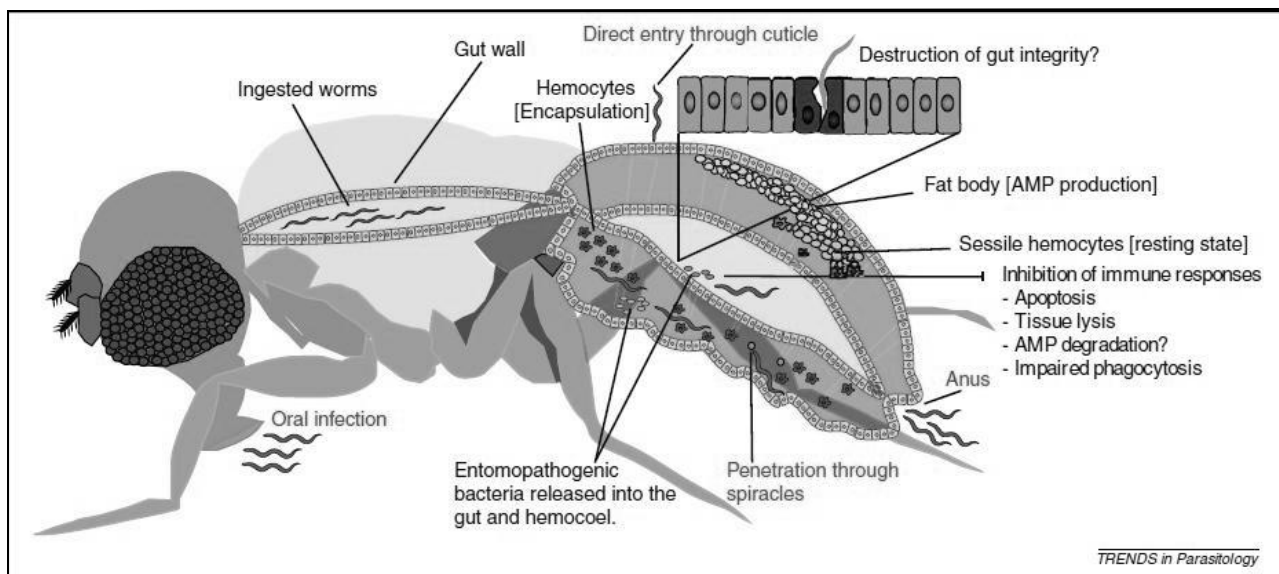
### **1.5. Infekce *D. melanogaster* entomopatogenními hlísticemi**

Imunitní systém bezobratlých živočichů zajímá vědce již dlouhou dobu. V laboratorních podmínkách byly k pokusům s imunitním systémem používány různé modelové organismy a vyvolány byly různé modelové infekce. V poslední době se právě k modelovým infekcím velmi často využívají entomopatogenní nematody *Heterorhabditis bacteriophora* a parazitické vosičky *Leptopilina boulardi*, které jsem ke svým pokusům použila i já.

Entomopatogenní hlístice jsou parazité, kteří infikují a zabíjejí hmyz. Většina entomopatogenních hlístic patří do čeledí *Heterorhabditidae* a *Steinernematidae* kmene Nematoda. Invazní stádia žijí v půdě, kde hledají a následně pronikají do larev hmyzího hostitele (Valentová 2007). Zvláštním vývojovým stádiem v životním cyklu těchto hlístic je tzv. invazní larva, vytvořená jako odpověď na vyčerpání zdroje potravy a nepříznivé podmínky. Jde o volně žijící stádium larvy třetího instaru (L3), které je dobře adaptováno na dlouhodobé přežití v půdě. Zároveň slouží jako infekční stádium, které v přední části střeva nese symbiotické bakterie (Han and Ehlers 2000). Bakterie napomáhají k infekci hostitele, ale většina hlístic je životaschopná i bez nich (Castillo et al. 2011, Waterfield 2009). Bylo prokázáno, že hlístice jsou i bez těchto bakterií schopny nakazit a usmrtit hostitele a to se stejnou frekvencí jako s bakteriemi, avšak efektivnost účinku byla mnohokrát menší (Hallem et al. 2007). Hlístice rodu *Heterorhabditis* žijí v symbióze s bakteriemi rodu *Photorhabdus*, což jsou gramnegativní, pohyblivé bakterie, schopné bioluminiscence a řadí se mezi *Enterobacteriaceae* (Burnell and Stock 2000).

Pokud invazní larva nalezne hostitele, pronikne do něj a vypustí bakterie do jeho hemolymfy. Poté začne odpovídat na dosud neznámý signál, který u nich vyvolá únik z vývojově pozastaveného invazního stádia. Tento signál se nazývá recovery a je vyvolán potravním signálem (Ehlers 2001). Právě během této fáze, dochází k uvolňování symbiotických bakterií do hemolymfy hostitele, který do několika hodin nebo dnů umírá na toxémii nebo septikémii. Když bakterie dosáhnou stacionární fáze svého růstu, začnou sekretovat lipázy, proteázy a širokospektrá antibiotika. Funkcí enzymů je zřejmě rozklad hmyzí tkáně, což poskytuje potravu pro hlístice (Burnell and Stock 2000). Pokud jsou dostupné všechny živiny, vývojový cyklus probíhá standardně, pokud jsou živiny již vstřebány, larvy se vyvíjí zpět do invazních, které si zachovávají symbiotické bakterie, opouští mrtvolu hostitele a začnou hledat nového (Ehlers 2001).

Nejsnadnějším způsobem vniknutí do hostitele se pro invazní larvu stává ústní a řitní otvor, spirákula nebo tracheje. Pokud se hlístice dostanou do trávicí soustavy, konkrétně do střev, malpigických trubic nebo do prostoru mezi peritrofickou membránou a střevním epitelem, je již zabráněno jejich vypuzení z těla výkaly. Střevní tekutina hostitele může usmrtit až 40% vniklých hlístic a tím i podstatně zredukovat pronikání přes střevo (Valentová 2007). K tomu, aby se hlístice *Heterorhabditis* dostala přes různé tělní stěny, využívá k protržení přední zub. Do penetrace se také zapojují inhibitory proteáz a látky způsobující histolýzu, které hlísticím výrazně ulehčují pohyb v hostiteli (Dowds and Peters 2002).



**Obr. 3: Nejčastější cesta nákazy hostitele entomopatogenními hlísticemi (Castillo et al. 2011)**

Na infekci entomopatogenními hlísticemi začíná okamžitě reagovat imunitní systém *D. melanogaster*, tak, že spustí jednak produkci antimikrobiálních peptidů, konkrétně cekropinů nebo lysozymů, čímž je zaktivována humorální imunitní odpověď. Dále je důležitá role buněčné imunitní odpovědi, kterou v tomto případě představují plasmacyty a lamelocyty. Okamžitou odpověď proti hlísticím představuje enkapsulace, symbiotické bakterie jsou destruovány pomocí fagocytosy nebo v případě velkého zatížení, pomocí nodulace (Dowds and Peters 2002).

### **1.6. Parazitace *D. melanogaster* vosičkami**

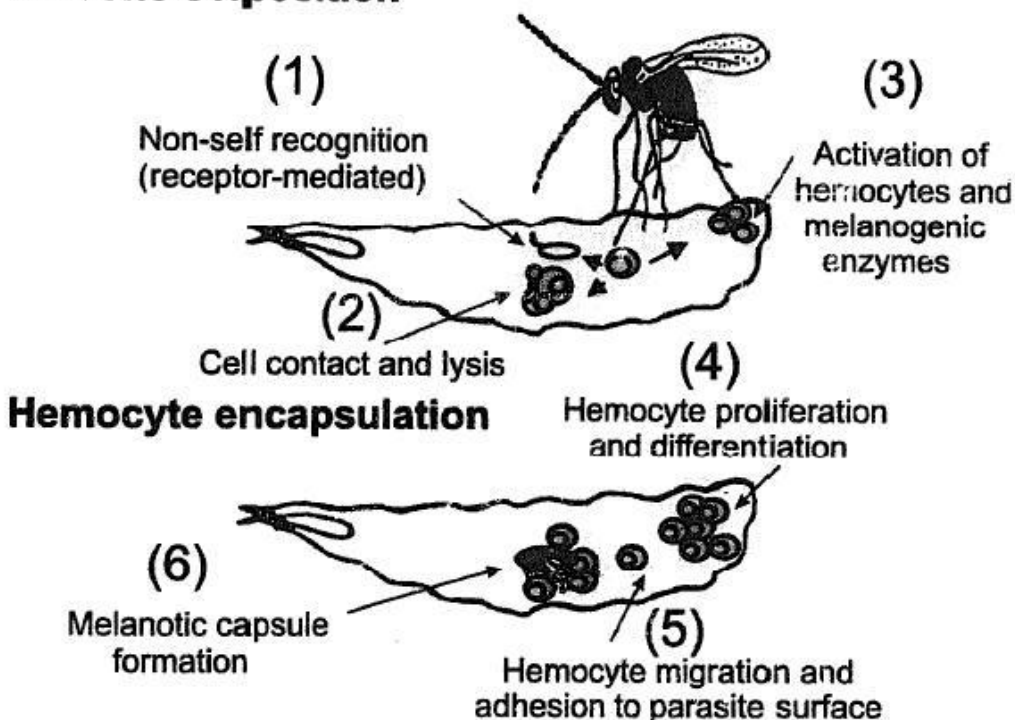
Druhým často používaným infekčním modelem pro výzkum imunity u *D. melanogaster*, jsou parazitické vosičky. Je známo několik druhů vosiček (časté jsou např. *Leptopilina boulardi* a *Leptopilina heteroma*), které v přírodě napadají larvy *D. melanogaster*. *Leptopilina boulardi*, kterou jsem ve své práci používala, se vyskytuje nejčastěji v oblasti Středozevního moře (tedy na území rozprostírajícím se kolem Středozevního moře) a pak také v tropických oblastech po celém světě, *L. heteroma* je rozšířena v holoarktickém regionu. V některých populacích *D. melanogaster*, žijících volně v přírodě, bývá více než 50% larev infikováno vosičkami, což by mohlo naznačovat, že vosičky mohou být poměrně častou příčinou úhynu nedospělých jedinců *D. melanogaster* (Fleury et al. 2004).

Infekce u *D. melanogaster* je zprostředkována, stejně jako u jiných druhů hmyzu, samicemi vosiček, které svým kladélkem umístí vajíčka do těla larvy. Mladé vosičky se pak z vajíček líhnou přibližně za 2 dny po infekci a živí se uvnitř hostitele požíráním jeho tkání (Schlenke et al. 2007). Takto přežívají uvnitř hostitele přibližně 3- 4 týdny a poté začnou opouštět hostitelskou kuklu, nejdříve vylézají samci, za 2 -3 dny samice. Vosičky se pak spáří a samice nakladou během 3- 4 dní po vylíhnutí, kdy jsou schopny infekce, vajíčka do dalšího

hostitele. (Fauvergue et al. 1999). Po infekci vosičkami se spouští jednak humorální odpověď (produkcí antimikrobiálních peptidů) a jednak buněčná imunitní odpověď, která je zprostředkována lymfatickou žlázou a hemocyty (Russo et al. 2001). Dochází k aktivaci plasmacytů, které začnou migrovat směrem k nakladenému vajíčku a naváží se na něj. Zároveň dochází k produkci lamelocytů, které celý tento útvar enkapsulují, čímž ho oddělí od hostitelského hemocelu, který mu zajišťoval potencionální ochranu před enkapsulací (Ritzki et al. 1990). Poté dojde k lýze horní vrstvy hemocytů a výsledkem je vznik melaninového obalu, který vzniká díky krystalovým buňkám nesoucím prekuzory pro fenoloxidázu. Tento obal okolo celého útvaru pak produkuje cytotoxické volné radikály, které napomáhají destrukci vajíčka (Nappi and Vass 1993). K tomuto procesu dochází u rezistentních larev.

Vosičky však dokážou hostitelskou imunitu utlumit. Aby nedošlo k destrukci nakladeného vajíčka, potlačí imunitu pomocí jedu, který je do hostitele vpravován společně s vajíčky a který velmi často obsahuje viry (např. polydnavirus) nebo tzv. virus- like partikule (VLPs) (Whitfield and Asgari 2003). Tyto VLPs se dostávají do hemolymfy a rychle se vážou na hostitelské lamelocyty a způsobí na nich morfologické změny vedoucí k lýze. Infekce vosičkou *L. heteroma* a jejími VLPs, způsobí apoptosu prohemocytů, stejně jako cirkulujících plasmacytů. VLPs *L. boulandi* jsou morfologicky odlišné a nezpůsobují lýzu lamelocytů. Jed *L. boulandi* pouze částečně zablokuje vznik a uvolnění lamelocytů z lymfatické žlázy a tím zabrání enkapsulaci (Ritzki et al. 1990).

### Parasite oviposition



Obr. 4: Infekce parazitickými vosičkami a následná enkapsulace vajíčka (Carton and Nappi 1997)

## **2. CÍLE PRÁCE**

- 1). Prověření možnosti záchrany delečního mutantu *10/3- ΔIdgf 1- 3 (2)* pomocí kosmidového plasmidu
- 2). Srovnání srážení hemolymfy, celkového počtu hemocytů a počtu krystalových buněk u mutantů *Idgf 3, Idgf 4* a *Dac<sup>7</sup>*
- 3). Prověření imunitního systému u mutantů *Idgf 3, Idgf 4* a *Dac<sup>7</sup>* po infekci parazitickými vosičkami (*Leptopilina boulardi*) a nematodami (*Heterorhabditis bacteriophora*)

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Pokusné organismy

##### *Drosophila melanogaster*

Pro tuto práci jsem jako modelový organismus používala mouchu *Drosophila melanogaster*. Své pokusy jsem prováděla na jedincích, kteří měli mutace v různých *Idgf* genech. Jako kontrolu jsem použila divoký typ linie Canton S a mutanty  $w^{1118}$  (mutace genu *white*). Většina našich mutantů byla odvozena od linie  $w^{1118}$ . Konkrétně se jednalo o mutanty:

*Dac*<sup>7</sup>: delece *Idgf 1, 2, 3* genu + část genu *dachshund* (chybí poslední exon a intron) (Mardon et al., 1994)

*10/3*: delece *Idgf 1, 2, 3* + velká část genu *dachshund* (Saget, unpublished)

*Idgf3*<sup>8</sup>: delece *Idgf 3*, chybí mu promotor (Kučerová, unpublished)

*Chit*: delece *chit-like* (Sidorov, unpublished)

*Idgf4/chit*: double mutace- delece *Idgf 4* a *chit-like* (Sidorov and Sajwan, unpublished)

*Idgf3*<sup>8</sup>/ $w^{1118}$ : backcross (heterozygotní kontrola)

*w*; *Idgf3*<sup>8</sup>/+; *Act-Gal4:PR/UAS-Idgf3*: heterozygot pro mutaci *Idgf 3*<sup>8</sup>, se záchranným konstruktem *Idgf* pod inducibilním promotorem s vazbou na progesteron (Rogulja and Irvine 2005)

##### *Heterorhabditis bacteriophora*

Pro aktivaci plasmatocytů v imunitní systému *D. melanogaster* jsem používala entomopatogenní hlístice *Heterorhabditis bacteriophora* se symbiotickou bakterií *Photorhabdus luminescens*, která byla buď bez fluorescence nebo značená GFP markerem.

##### *Leptopilina boulardi*

Pro aktivaci lamelocytů s imunitní soustavě jsem jako infekční organismus použila parazitické vosičky *Leptopilina boulardi*.

#### 3.2. Půdy a média

Pro práci jsem používala různé živné půdy vhodné pro chov a přesné načasování stáří stádií *D. melanogaster* a různá média, která byla součástí pokusů souvisejících s imunitou.

- **Klasická živná půda:**

0,93 g bakteriologického agaru

6,12 g kukuřičného šrotu  
12,94 g D- glukózy  
3,24 g kvasnic  
100 ml dH<sub>2</sub>O

V mikrovlnné troubě nechat směs projít varem a pak mírně ohřívat po dobu 10 minut, občas promíchat, aby se hmota neusadila na dně

Po mírném vychladnutí přidat 1,67 ml 10% methylparabenu v EtOH/ 100 ml půdy (slouží jako ochrana před plísněmi, bakteriemi a houbami) a plnit do skleniček.

Po ztuhnutí skleničky utěsnit vatovými špunty.

- **Živná půda- „aging“** (Farkaš et Šut'áková 1999)

Složení a postup jsou stejné jako u klasické živné půdy, jen po mírném vychladnutí přidat s methylparabenem ještě 0,05 g Bromphenol Blue (0,05%) / 100 ml půdy. Potravu a její množství lze pak pozorovat ve střevech larev a díky tomu je snadné určit pozdní stádium III. instaru, které jsem používala pro své pokusy.

- **Medium pro přežívání vosiček**

1,5 g bakteriologické agaru  
6 g cukru  
100 ml vody

Vše smíchat a v mikrovlnné troubě přivést k varu, poté nalít do požadovaných sklenic a nechat ztuhnout přikryté ubrouskem. Množství vystačí na 3 lahvičky o objemu cca. 30 ml. Po ztuhnutí utěsnit vatovými špunty obalenými kouskem ubrousku nebo jemné látky, vosičky se pak nezamotávají do vaty a nelezou ze skleniček ven. Médium vydrží max. týden, díky nepřítomnosti antibakteriálních látek, na které jsou vosičky citlivé. Je možné ho vyautoklávovat a nechat ve 4 °C, takto vydrží asi 14 dní.

- **Médium pro kladení (džus + kvasnicová pasta)**

Džus:

7,5 g agaru rozpustit ve 250 ml H<sub>2</sub>O- nechat projít varem, míchat

8,25 g sacharózy rozpustit v 82,5 ml džusu (nejlépe rybízový- je tmavý a larvy jsou na něm dobře vidět)- opět povařit a míchat

Po mírném vychladnutí slít obě substance dohromady, přidat 1 ml methylparabenu a plnit do Petriho misek a nechat mírně zakryté utuhnout.

Kvasnicová pasta:

Kvasnice rozmíchat s trochou destilované H<sub>2</sub>O a nanést na ztuhlý agar v misce. Pasta slouží jako potrava pro populaci much, která klade po dobu, kterou jsme si určili, v kladecích pastičkách.



- **Zásobní roztok mifepristonu**

2 µg mifepristonu

2 µl 100% EtOH

Namíchaný mifepriston pak přidáváme v množství 3,5 µl k methylparabenu (kvůli rovnoměrnému rozmíchání) a obojí následně do uvařené vlažné živné půdy a plníme do vialek.

- **Schneiderovo médium**

0,245 g Schneiderova média

10 ml dH<sub>2</sub>O

Provádět v digestoři, kvůli kontaminaci a případným infekcím. Roztok pak plnit přes filtr o velikosti pórů 0,22 µm do požadované centrifugační zkumavky.

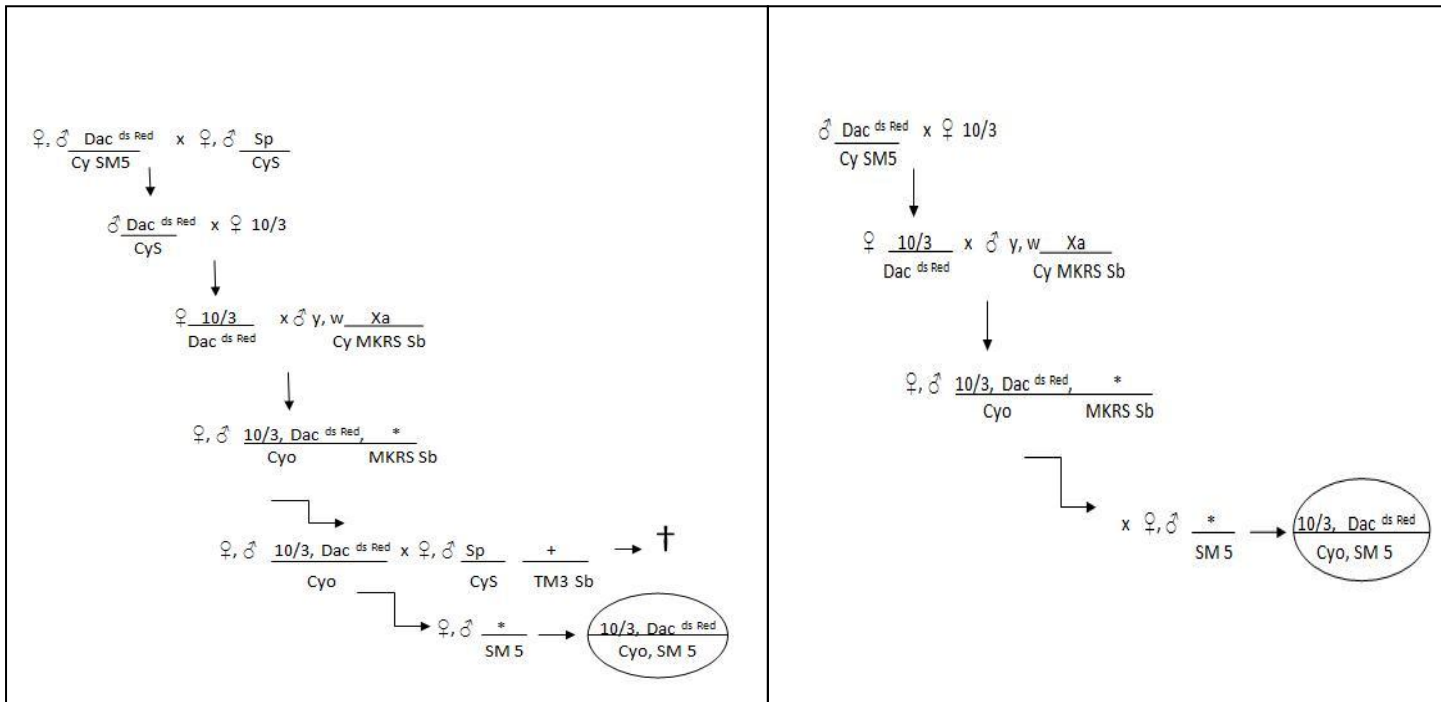
### ***3.3. Použité chemikálie***

Agar bacteriological- Amresco (J637- 500g), Albumin bovine fraction (BSA)- V- Serva (11924.03), Bromphenol blue (sodium salt)- USB (12370 10GM), D- Glukosa- Penta (2311000001), Dihydrogenfosforečnan draselný p. a. (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)- Penta (602201), Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O) p. a. - Penta (716331), Hydroxid sodný (Na OH) p. a. - Penta (716911), Chlorid draselný (K Cl) p. a. - Penta (601301), Chlorid sodný (Na Cl) p. a.- Lach- Ner s. r. o. (30093-APO G1000-1), Mifepristone- Sigma Aldrich (M8046- 100MG), Paraformaldehyde- Sigma Aldrich (P6148-500g), Primární protilátky: mouse anti- Atilla L1 a, b, c (Laurinyecz 2006), mouse- anti Hemese H2 (Kurucz et al. 2003), mouse anti- Nimrod (NimC1) P1a, b (Márkus et al. 2005)- myší protilátky byly získány od kolegů z týmu vedeného Istvánem Ándem (Biological Research Center, Szeged, Hungary), Sacharosa p. a- Penta (2311000001), Sekundární protilátka Cy3-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)- Jackson Immunoresearch (115- 165- 003), Schneider's insect medium- Sigma Aldrich (S9895-11), Sodium thiosulfate (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)- Sigma Aldrich (72049- 1Kg), Vectashield with DAPI- Vector laboratories (H- 1200)

### ***3.4. Záchrana delečního mutanta 10/3- ΔIdgf 1- 3 (2)***

Při křížení byl mutant v *Idgf 1, 2, 3* genech křížen s mouchou nesoucí záchranný kosmid FlyFos, který měl být inkorporován do genomu mutanta, a tím mělo být zajištěno jeho přežití. Jako výchozí moucha byla použita Dac<sup>dsRed</sup>/Cy SM5, která v sobě tento kosmid, nesla. Moucha Dac<sup>dsRed</sup> / SM5 byla nejdříve překřížena na balancovaný chromozom CyS, který se jevil jako vhodnější pro naše další křížení. Při křížení se však vyskytly problémy a první křížení se neosvědčilo. Druhé křížení bylo zjednodušeno a moucha Dac<sup>dsRed</sup>/ SM5 byla

rovnou zkřížena s mutantem 10/3. Cílený deleční mutant byl pak překřížen zpět na balancovaný chromozom SM5, pro uchování mutace.



**Obr. 5: Schéma křížení pro záchranu delečního mutantu**  
Křížení č.1

**Křížení č. 2**

### 3.5. Měření srážení hemolymfy

Z vialek s modrou živnou půdou (viz Půdy a média) byly vybrány larvy pozdního III. instaru, které již neměly ve střevech modrou potravu, popřípadě pouze zbytek a byly tedy těsně před kuklením. Tyto larvy byly omyty (destilovaná voda-ethanol- destilovaná voda) a osušeny na kousku filtračního papíru. Larvy byly následně rozděleny po 5 jedincích do 30 mm misek a všechny byly opatrně roztrhány pomocí preparačních pinzet tak, aby se nepoškodilo tukové těleso, které by znemožnilo provedení pokusu. Poté byly roztržené larvy opatrně odebrány, s použitím stopek se začal počítat čas a pomocí jehly (0.6 mm x 25 mm) byla vzniklá kapka hemolymfy vytahována do prostoru tak dlouho, dokud se nevytvořilo pevné vlákno. Pak byly teprve stopky zastaveny a výsledný čas zapsán. Pokus se u každého genotypu opakoval 30 krát a byl prováděn za pomoci stereomikroskopů (Leica GZ6 Stereomicroscope a Zeiss Stemi 2000- C Stereomicroscope) Postup této práce byl převzat z publikace Scherfer et al. (2004).



**Obr. 6: Srážení hemolymfy**  
(Scherfer et at. 2004)

### **3.6. Měření počtu hemocytů**

Do jamek v 96- jamkové mikrotitrační destičce bylo napipetováno 50  $\mu$ l Schneiderova média (viz příloha Složení pŮd a médií) a přidáno pár zrníček thiosíranu sodného (ochrana proti poškození hemocytů a proti srážení hemolymfy). Do každé jamky byly roztrhány (opět tak, aby nebylo porušeno tukové těleso) 2 omyté larvy III. pozdního instaru. Médium s larvami v jamce pak bylo krátce promícháno cca. půl minuty pinzetou. Roztržené larvy byly poté odebrány pryč a vzorek byl ponechán cca. 5 minut ustát, aby se hemocyty usadily na dno. Hemocyty byly v jamkách následně vyfoceny pomocí fotoaparátu (Olympus C 30- 30 Zoom) připevněného na inverzním mikroskopu (Leica DM IL Microscope), při zvětšení 10x 20 a spočítány. Pokus byl opakován 20 krát. Schéma postupu bylo odvozeno od manuálu k barvení hemocytů protilátkami, který jsme obdrželi od doktora Petera Vilmore.

### **3.7. Vizualizace a měření počtu krystalových buněk**

Byly nasbírány larvy pozdního III. instaru, omyty a osušeny. Do malé zkumavky bylo odebráno přibližně 5 umytých larev (více už bylo moc) a tyto larvy byly povařeny po dobu 15 minut ve vodní lázni o teplotě 65°C. Po uvaření byly larvy vyskládány na podložní skličko ventrální stranou nahoru a byly na bílém podkladu vyfoceny pomocí fotoaparátu (Canon EOS 550D nebo Olympus C 70- 70) připevněného na binolupě (Zeiss Discovery V. 8 Stereomicroscope). Modré krystalové buňky pak byly počítány z posledních dvou tělních článků. Metoda je převzata z publikace Ritzki et al. (1980).

### **3.8. Barvení hemocytů protilátkou**

Bylo nasbíráno přibližně 20 larev III. instaru (larvy mohly mít ve střevech ještě potravu, na samotný pokus to nemělo vliv) omyto (destilovaná voda- ethanol- destilovaná voda) a osušeno na kousku filtračního papíru. Na podložním skličku byla fixem vyznačena oblast, ve které byly hemocyty barveny (pro barvení bylo lepší použít polylysinová sklička nebo sklička superfrost plus, popřípadě plus plus, namísto „klasických“, hemocyty na nich lépe držely a nesmývaly se během promývání). Do vyznačené oblasti bylo napipetováno 50  $\mu$ l Schneiderova roztoku (složení viz PŮdy a média), přidáno několik zrníček thiosíranu sodného a vše bylo opatrně promícháno. Do kapky média bylo roztrženo 20 larev (larvu bylo vždy nutno roztrhnout bez porušení tukového tělesa a vhodit do kapky). Když byly všechny larvy roztrhány, byly opatrně v kapce promíchány a poté odebrány pryč. Skličko bylo pak na hodinu umístěno do vlhké komůrky, kde se při pokojové teplotě pomalu odpařoval Schneiderův roztok. Mezitím byl připraven PBS, paraformaldehyd a BSA (složení a příprava viz Příloha I.).

- Po odpaření Schneiderova roztoku ze vzorku, byla naplněna kyveta 1x PBS a do ní bylo opatrně ponořeno skličko na 10 minut.

- Poté bylo sklíčko osušeno a dále byl vzorek fixován 4% paraformaldehydem v PBS, který byl na sklíčko napipetován v objemu 100  $\mu$ l a vše bylo umístěno do vlhké komůrky na 10 minut
  - Poté byl vzorek opět ponořen na 10 minut do kyvety s 1x PBS.
  - Po 10 minutách byl vzorek blokován 100  $\mu$ l 1% BSA v PBS, které byly na vzorek napipetovány a vzorek byl ponechán hodinu ve vlhké komůrce.
  - Poté byl opět ponořen na 10 minut do kyvety s 1x PBS.
  - Mezitím byla naředěna primární protilátka v poměru 1:100- 1  $\mu$ l protilátky + 99  $\mu$ l 1% BSA. Hemese je transmembránový protein, barvící všechny hemocyty ve vzorku (Kurucz et al. 2003), Attila (L1a, b, c)- barví lamelocyty (Laurinyecz 2006) a NimC1 (Nimrod)- barví plasmacyty (Márkus et al. 2005).
  - Po 10 minutách bylo na osušený vzorek napipetováno 100  $\mu$ l protilátky a vzorek byl ponechán v lednici ve vlhké komůrce přes noc.
  - Druhý den byl vzorek opatrně omyt proudem PBS za pomoci pipety a poté ještě na 10 minut ponořen do kyvety s čerstvým PBS.
  - Mezitím byla naředěna sekundární protilátka Cy3 v poměru 1: 800- 1 $\mu$ l protilátky a 799  $\mu$ l 1% PBS. (Cy3 je cyaninové barvivo, které je fluorescentní ve žlutozelené oblasti spektra- 550- 570 nm, v našem případě se jedná o kozí protilátka, která se váže na lehké a těžké řetězce myších epitopů)
  - Po 10 minutách bylo na osušené sklíčko nanášeno 100  $\mu$ l zředěné protilátky a vzorek byl ponechán hodinu ve vlhké komůrce ve tmě, aby se protilátka nevysvítila.
  - Po hodině byl vzorek omyt v kyvetě s PBS po dobu 10 minut- ve tmě
  - Nakonec byl vzorek opatrně osušen buničinou, jádra hemocytů byla obarvena napipetováním 120  $\mu$ l vectashieldu s DAPI (Lze použít i DAPI v DAPCu nebo glycerol sodium azide). Vectashield je speciální stabilní médium uchováající fluorescenci. Celé sklíčko bylo překryto krycím sklíčkem, které pak bylo po okrajích přetřeno bezbarvým lakem. Vzorky byly uloženy do krabičky, která nepropustí světlo. Vzorky byly vyfoceny na konfokálním mikroskopu (Olympus IX 81 Confocal Microscope, Motorised research microscope).
- Postup experimentu byl opět převzat od Petra Vilmore.

### **3.9. Infekce hlísticemi *Heterorhabditis bacteriophora***

Na kousek parafilmu byla kápnuta 5  $\mu$ l kapka s vodou a v ní obsažených hlístic a bylo spočítáno množství živých jedinců. Aby se pokus povedl, bylo zapotřebí napipetovat do jamky přibližně 100 aktivních jedinců. Při malé koncentraci živých hlístic bylo vhodné, nechat je usadit ve větším množství vodovodní vody nebo vymýt kousky molitanů, které udržovaly vlhké prostředí v centrifugačních zkumavkách. Nebylo však vhodné uchovávat hlístice v příliš velkém množství vody, neboť hynuly. Pokud u hladiny plavaly zbytky odumřelých těl, bylo zapotřebí je odsát pipetou pryč.

Poté, co byla zkontrolována životnost, a bylo spočítáno množství, které bylo potřebné pro daný pokus, bylo toto množství napipetováno do jamek v 96 jamkové mističce s kousky filtračního papíru v každé jamce. Do každé jamky pak byla vhozena 1 L(3) larva

*D. melanogaster* (nejlépe taková, která byla ještě zanořená v potravě), neboť celý proces trval okolo 8 hodin a bylo nežádoucí, aby se larvy během pokusu zakuklily.

Jamky s hlísticemi a larvami pak byly zakryty kouskem parafilmu, aby larvy nepřelézaly do sousedních jamek. Celá destička byla poté zabalena do alobalu a ponechána 2 hodiny ve 25°C. Po 2 hodinách byly larvy z jamek přemístěny na klasickou živnou půdu a ponechány 6 hodin při pokojové teplotě. Teprve po 6 hodinách bylo možno přejít k dalším experimentům. Postup byl převzat a zmodifikován z publikace Hallem et al. (2007).

#### Chov nematod:

Životní cyklus čeledi *Heterorhabditidae* je typická heterogonie, kdy v jednom hostiteli dochází ke střídání první, partenogenetické generace, s druhou bisexuální, ve které jsou samci navíc velmi vzácní. Napadený hmyz hyne na bakteriální septikémii, způsobenou symbiotickými bakteriemi ze střeva invazních larev (Weiser and Mráček 1988).

Pro udržení chovu hlístic *Heterorhabditis bacteriophora* byly jako hostitelský organismus použity larvy *Galleria mellonella*. Larvy zavíječů byly vloženy do Petriho misky pokryté navlhčeným filtračním papírem, na kterém bylo navíc napipetováno okolo 1 ml roztoku s živými hlísticemi a miska byla umístěna na tmavé místo o pokojové teplotě. Asi po třech dnech, larvy hlístic zavíječe usmrtily. Typickým znakem zdařilé infekce je zčervenání hostitelského těla, které je způsobeno symbiotickými bakteriemi hlístic. Usmrčení zavíječi byli poté přemístěni na vodní past, kterou představovalo hodinové sklíčko obalené filtračním papírem umístěné uprostřed větší Petriho misky. Past bylo potřeba neustále udržovat vlhkou za pomoci vodovodní vody (destilovaná voda není moc vhodná a hlísticím se v ní nedaří). Poté, co byli zavíječi vyskládáni na past, bylo zapotřebí ještě propíchnout na několika místech kutikulu, aby se líhnoucí larvy hlístic lépe dostávaly ven. Celá miska byla opět umístěna na tmavé místo, kde po 1 až 2 týdnech začala nová generace opouštět tělo hostitele. Nové larvy hlístic pak byly pomocí stříčky s vodovodní vodou opláchnuty a za pomoci pipety přeneseny do centrifugační zkumavky s kousky molitanu, který udržoval vlhkost a proděravělým víčkem, které zajišťovalo přístup vzduchu. Centrifugační zkumavka pak byla umístěna do lednice, kde hlístice přežívaly a byly vždy připraveny k použití. Návod na udržení chovu byl převzat z diplomové práce Ivy Valentové (Valentová 2007).

### **3.10. Infekce vosičkami *Leptophilina boulandi***

Dospělci *D. melanogaster* byli ponecháni na „klasické“ živné půdě, kde kladli 24 hodin. Poté byli odebráni a lahvičky s vajíčky byly vloženy do termoboxu s 25°C. Čtvrtý den po naklazení byly k L2 larvám přidány vosičky, které 2 hodiny infikovaly larvy *D. melanogaster* při 25°C. Stádium L2 bylo optimální, protože larvy 3. instaru byly moc velké a měly silnou kutikulu a vosičky nebyly schopny je nabodnout. Larvy 1. instaru byly pro změnu moc malé a po infekci hynuly. Vosy byly velmi křehké a lepily se na médium a vatu, proto bylo lepší obalit vatové špunty ubrouskem nebo kouskem tenké látky, díky tomu také vosičky neprolézaly vatou ven z lahviček. Na infekci byly použity vosičky, které čerstvě opustily hostitelskou kuklu a které jsem nechala ve skleničce s médiem spářit, neboť infekce jsou schopné pouze 3- 4 dny po vylíhnutí. Po infekci se vosy dále používaly buď na infekci dalších larev, nebo byly přendány do sklenice s médiem pro vosičky, kde přežívaly, ale nemnožily se.

Po infekci bylo možné dvojí využití larev *D. melanogaster*. Pokud byly nainfikované larvičky použity na pokusy, pak je bylo možno za 24 hodin použít na pokusy s lymfatickou žlázou. Za 48 hodin již bylo vosí vajíčko obklopeno lamelocyty a larvy bylo možno použít na barvení vajíček a lamelocytů.

Pokud byly nainfikované larvy použity pro udržení chovu, pak byly skleničky s larvami ponechány zhruba 2- 3 týdny ve 25°C. Před „vylíhnutím“ vosiček z kukel bylo potřeba dát do skleniček s kuklami na dno ubrousek, aby se malé vosičky nepřilepily na půdu. Nejdříve začínají vylézat samci (mají dlouhé anteny), po 2- 3 dnech začnou také samice (krátké anteny). Vosy bylo po vylíhnutí z kukel potřeba nechat spářit, pokud by se samice nespářily, nakladly by sice vajíčka, ale líhly by se z nich pouze samice a tím bychom přišli o chov.

Postup na infekci a chov vosiček byl získán od Kateřiny Kučerové z laboratoře Tomáše Doležala.

### **3.11. Statistika**

Pro statistické hodnocení dat byl použit program GraphPad InStat (Dataset 1.ISD). Byla použita One- way ANOVA, Dunnett test pro porovnání výsledků s kontrolou, nepárový T- test a Mann- Whitney test pro porovnání dvou mutantů mezi sebou. Jako signifikantní byly hodnoceny výsledky na hladině významnosti  $P < 0,01$  \*\* a  $P < 0,05$  \*.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Záchrana delečního mutanta 10/3- $\Delta Idgf 1-3$ (2)

Při křížení jsem se snažila zachránit mutanta 10/3, který má delecii v *Idgf 1, 2 a 3* genech a navíc mu chybí i velká část genu *dachshund*, který rovněž leží na levém raménku 2. chromozomu, v sousedství klastru tvořeného těmito geny. Mutant 10/3 je letální, což je způsobeno právě genem *dachshund*, neboť jeho nedostatečnou expresí nebo expresí v jiných místech jedinec umírá. Larvy během vývoje dosahují pouze stádia kukly a v ní hynou, což je typický fenotyp mutace *dachshund*. Proto jsem se pokoušela o záchranu toho mutanta tím, že jsem gen *dachshund* chtěla nahradit záchranným kosmidem FlyFos neseným mouchou  $Dac^{dsRed}/Cy$  SM5.

Již na počátku celého křížení se vyskytly komplikace, neboť byl problém získat linii, která by záchranný konstrukt nesla. Požadovaný marker, který určoval správnost křížení, se projevoval velmi slabě. Přesto jsem křížení absolvovala až do konce. Ve výsledku jsem získala mouchy, které po vykuklení normálně přeživaly, ale byly sterilní a nemnožily se. Navíc byl problém v tom, že u nich nebyl detekován požadovaný marker, značící správnost křížení. Křížení jsem opakovala 3x po sobě a vždy se stejným výsledkem. Z toho usuzuji, že záchranný konstrukt FlyFos nefunguje právě kvůli genu *dachshund*, který zřejmě ovlivnil jeho expresi.

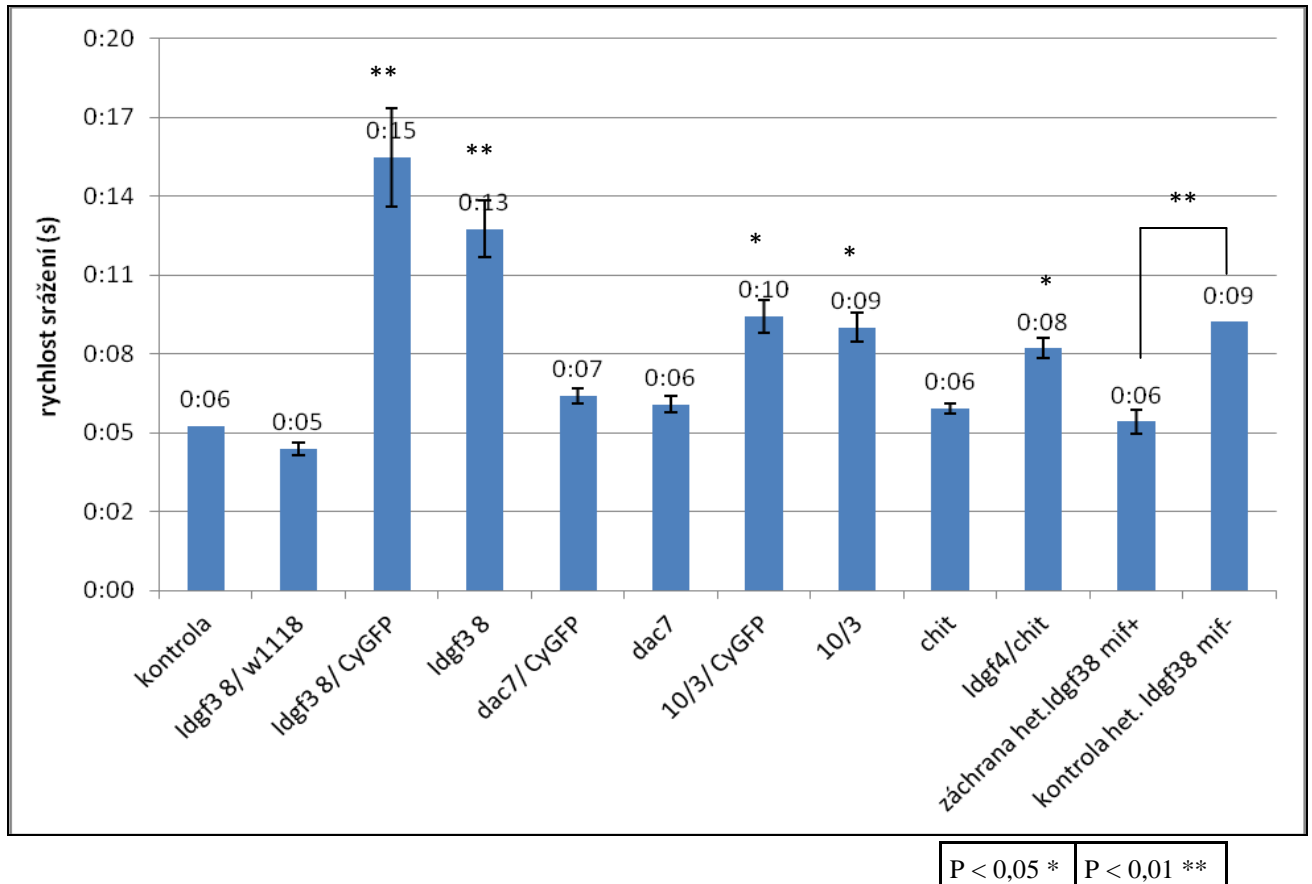
### 4.2. Měření srážení hemolymfy

Při porovnávání určitých vlastností imunitního systému *D. melanogaster* jsem se nejdříve soustředila na rychlost srážení hemolymfy (Graf 1.). Na každý vzorek bylo použito 5 larev a pokus byl opakován 25 krát. Jako kontrola zde byly použity genotypy *Canton S*,  $w^{1118}$  a  $w^{1118}$  s mifepristonem, který sloužil jako kontrola pro heterozygotního mutanta s mifepristonem. K této kontrole pak byly vztahovány veškeré statistické analýzy. Pomocí toho testu jsem detekovala poruchy se srážením hemolymfy u dvou nezávislých mutací zahrnující gen *Idgf 3*, tedy konkrétně u mutace *Idgf 3<sup>8</sup>*, které chybí část promotoru a delecie 10/3, která pokrývá celý klastr *Idgf 1, 2 a 3* a větší část genu *dac*. Poruchy se srážením byly zaznamenány i v heterozygotním stavu těchto mutací, což naznačuje, že by se mohlo jednat o dominantní fenotyp.

Dále jsem chtěla dokázat vliv genu *Idgf 3* na srážení hemolymfy a proto byl heterozygotní mutant zachráněn pomocí konstruktů UAS- *Idgf 3* řízeného inducibilním Gal4 s progesteronovou doménou, který je aktivován pouze v přítomnosti mifepristonu. To mi umožnilo porovnávat zcela identický genotyp, který se liší jen expresí *Idgf 3* pod UAS promotorem. U kontrolní mouchy bez záchranného konstruktů se hemolymfa srážela poměrně pomalu. Pokud se ale do heterozygota přidal gen *Idgf 3*, vrátila se rychlost srážení na úroveň kontrolních genotypů, z čehož vyplývá, že *Idgf 3* má opravdu na rychlost srážení hemolymfy výrazný vliv.

Na srážení se zřejmě podílí i další členové genové rodiny *Idgf*, i když jejich projevy nejsou tak silné jako u genu *Idgf 3*. Poruchy se srážením byly totiž zaznamenány i u dvojitého

mutanta *Idgf4/ chit*. Rozdíl je ale na hladině významnosti. Zatímco u samotné mutace *Chit* žádné odchylky zjištěny nebyly.



**Graf 1: Měření rychlosti srážení hemolymfy podle Scherfer et al. 2004.** Kontrola zahrnuje měření pro genotypy *Canton S* a *w<sup>1118</sup>* (chovaného na živné půdě a na půdě s přidaným mifepristonem). Na ose x jsou dále vyneseny genotypy různých mutantů v *Idgf* genech. Rozdíly byly testovány pomocí jednocestné ANOVA. Chybové úsečky představují střední chybu průměru.

#### 4.3. Měření počtu hemocytů

V souvislosti se srážením hemolymfy mě zajímala otázka, jaké je v ní zastoupení hemocytů (Obr. 7). Pro tento pokus jsem použila vždy 2 larvy a opakován byl 20 krát. Hodnoty pak byly přepočítány na množství hemocytů v jedné larvě (Graf. 2). Jako kontrola zde byly opět použity genotypy *Canton S*, *w<sup>1118</sup>* a *w<sup>1118</sup>* s mifepristonem a statistické analýzy se vztahovaly k nim.

Statisticky významné hodnoty vyšly u mutantů *10/3*, *Chit* a u záchrany heterozygota *Idgf3<sup>8</sup>* se záchranným konstruktem a mifepristonem.

U mutantů *Chit* a *Idgf4/ chit* je patrné, že samotný mutant v genu *chit-like* má snížený počet hemocytů v hemolymfě. V kombinaci s *Idgf 4* se pak jejich zastoupení zvýší a jejich množství se dostává na hodnoty normálního stavu, jaký je pozorován u kontrol.

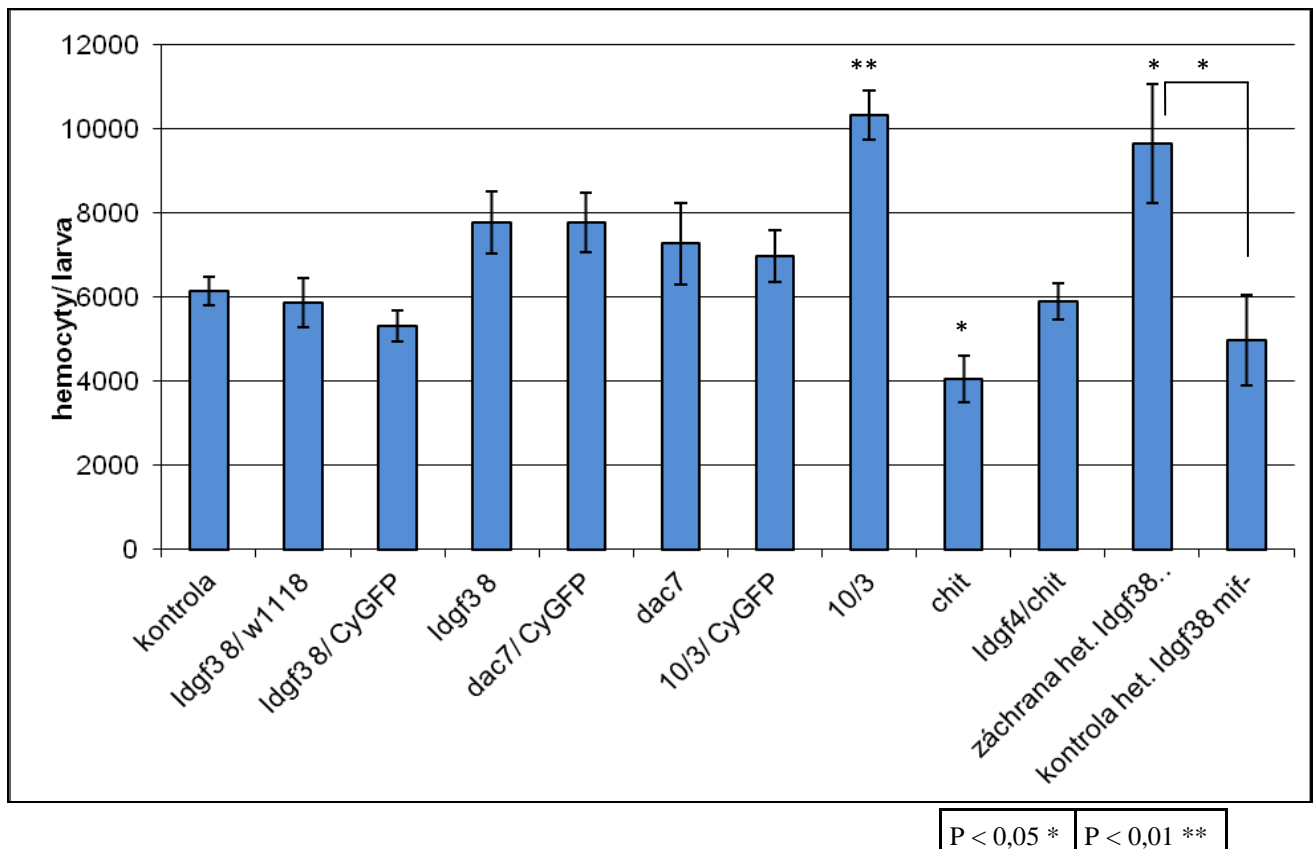


Dále je zajímavé, že ačkoli mají mutanti *Dac*<sup>7</sup> téměř srovnatelný rozsah delece jako mutanti *10/3*, jejich počty hemocytů v hemolymfě jsou oproti *10/3* téměř o třetinu nižší.

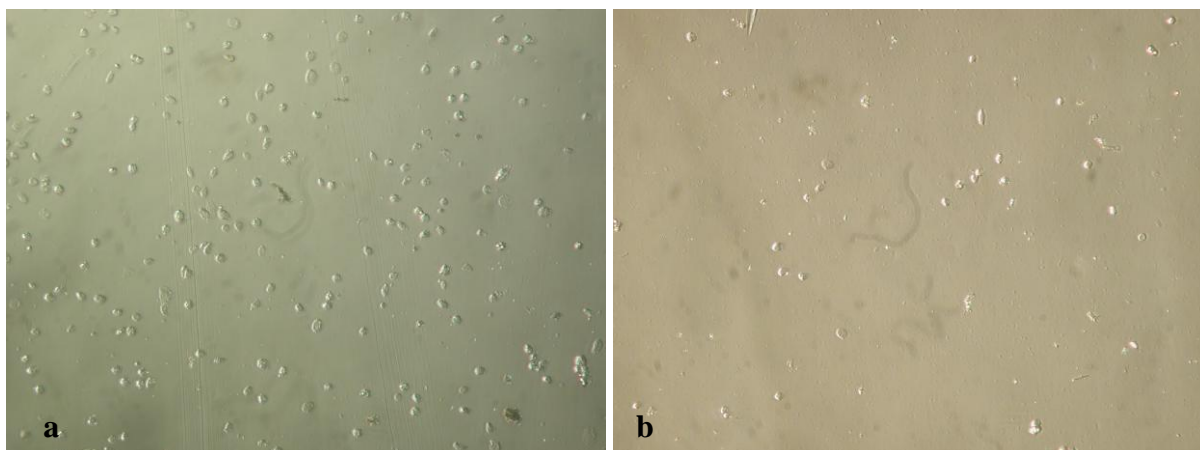
Statisticky signifikantní výsledek nárůstu počtu hemocytů u mutantů *10/3* tedy zřejmě nelze přisuzovat genům *Idgf*, neboť by mutanti *Dac*<sup>7</sup> měli přinejmenším srovnatelný počet hemocytů. Mutanti *Dac*<sup>7</sup> se rozsahem delece *Idgf* genů neliší od mutantů *10/3*. Rozdíl je zde pouze v rozsahu delece v genu *dac*, který bude zřejmě zodpovídat za regulaci hladiny hemocytů v hemolymfě.

U heterozyga *Idgf*<sup>38</sup> se záchraným konstruktem a mifepristonem byly také naměřeny vysoké hodnoty hladin hemocytů v hemolymfě. Statisticky se liší i záchrana heterozygota od její kontroly. V tomto případě lze tedy říci, že ne ztráta funkce genu *Idgf*, ale naopak její nárůst stimuluje proliferaci hemocytů.

Vzhledem k tomu, že množství hemocytů nijak nekoreluje s rychlostí srážení hemolymfy, mohou být hemocyty u mutantů *10/3* a u záchraně *Idgf*<sup>38</sup> nedostatečně diferencované nebo dokonce nefunkční. Proto jsem se rozhodla v dalších pokusech zjistit zastoupení jednotlivých typů hemocytů v hemolymfě a jejich funkčnosti.



**Graf 2: Měření počtu hemocytů dle Vilmos unpublished.** Kontrola zahrnuje měření pro genotypy *Canton S* a *w*<sup>1118</sup> (chovaného na živné půdě a na půdě s přidáním mifepristonem). Na ose x jsou dále vyneseny genotypy různých mutantů v *Idgf* genech. Rozdíly byly testovány pomocí jednocestné ANOVA. Chybové úsečky představují střední chybu průměru.



**Obr. 7: Ukázka hemocytů u mutantů *10/3* (a) a *Chit* (b)**

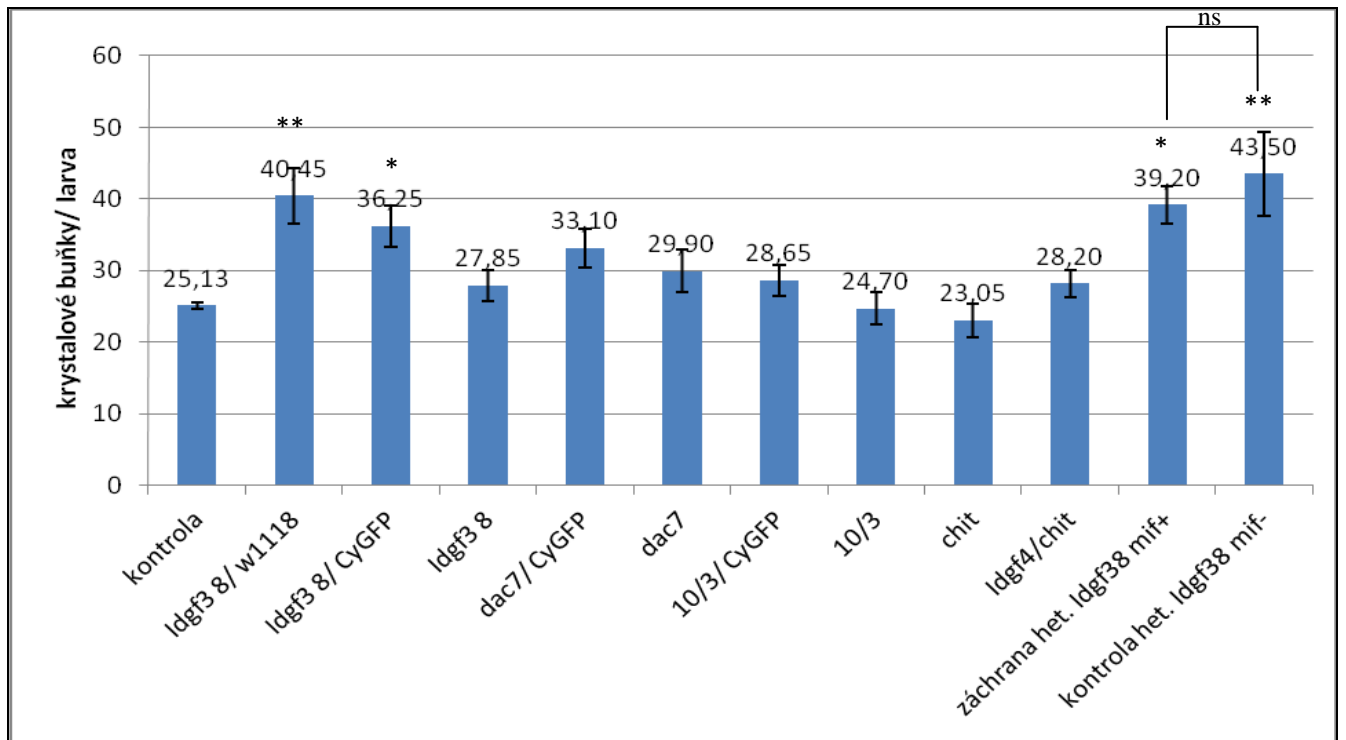
#### **4.4. Vizualizace a měření počtu krystalových buněk**

Krystalové buňky jsou důležitý nástroj při tvorbě melaninové zátky, potřebné při poranění a během procesu srážení hemolymfy. Tyto buňky lze snadno detekovat i bez protilátky, neboť melanin, jehož prekurzory se nachází uvnitř krystalových buněk, je možno zviditelnit povahením larev (Obr. 8). Ačkoli jsou srážení hemolymfy a melanizace dva odlišné procesy řízené jinými drahami a na sobě nezávislé, zajímalo mě, jaké je zastoupení krystalových buněk v hemolymfě. Jejich množství bylo počítáno vždy ze dvou posledních článků jedné larvy a opakováno 20 krát. Kontrolou byly opět genotypy *Canton S*,  $w^{1118}$  a  $w^{1118}$  s mifepristonem a statistika byla vztahována k nim.

Statisticky významné hodnoty (Graf. 3) byly pozorovány u heterozygotní kontroly  $Idgf3^{\delta}/w^{1118}$ , u heterozygota  $Idgf3^{\delta}/CyGFP$  a dále pak u záchraně heterozygota  $Idgf3^{\delta}$  s mifepristonem a kontrolou bez mifepristonu. Ačkoli se záchrana heterozygota  $Idgf3^{\delta}$  s mifepristonem a kontrola bez mifepristonu liší v počtu krystalových buněk od kontrolních genotypů, mezi sebou nevykazují žádný statistický rozdíl. Z tohoto výsledku se dá usuzovat, že množství *Idgf* zde nebude mít na hodnoty krystalových buněk žádný účinek.

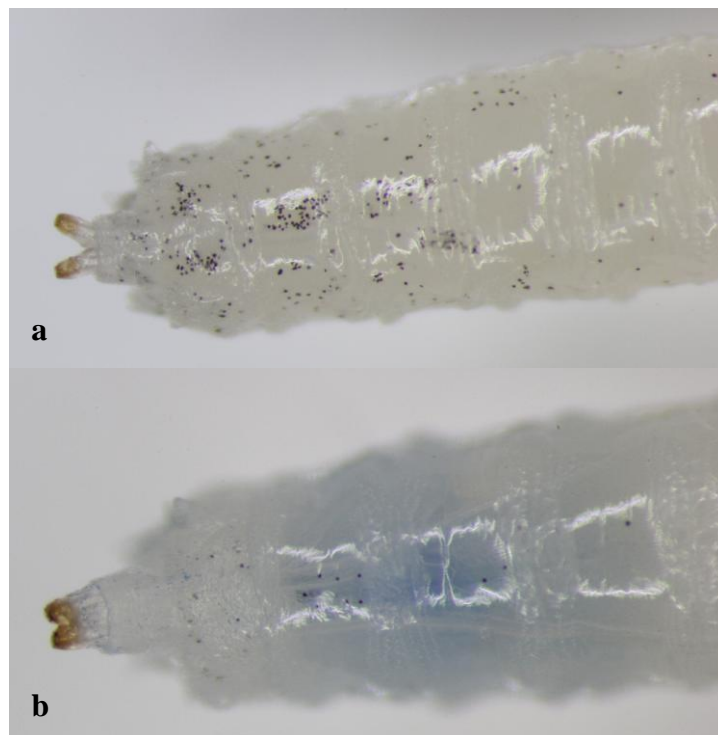
Z grafu je dále patrné, že stejně jako heterozygotní kontrola, tak také všichni heterozygotní mutanti s genotypem  $Idgf3^{\delta}$ , mají vyšší množství krystalových buněk. Nejvyšší hodnoty krystalových buněk byly napočítány u heterozygotní kontroly. Mezi kontrolními genotypy a všemi homozygotními mutanty žádné statistické rozdíly pozorovány nebyly a jejich hodnoty krystalových buněk jsou navzájem téměř srovnatelné.

Předložené naměřené hodnoty počtu krystalových buněk tedy vypovídají spíše o genotypové variabilitě, která nemá žádný fyziologický význam.



P < 0,05 \*    P < 0,01 \*\*

**Graf 3: Měření počtu krystalových buněk dle Ritzki et al. 1980.** Kontrola zahrnuje měření pro genotypy *Canton S* a *w<sup>1118</sup>* (chovaného na živné půdě a na půdě s přidáním mifepristonem). Na ose x jsou dále vyneseny genotypy různých mutantů v *Idgf* genech. Rozdíly byly testovány pomocí jednocestné ANOVA. Chybové úsečky představují střední chybu průměru.



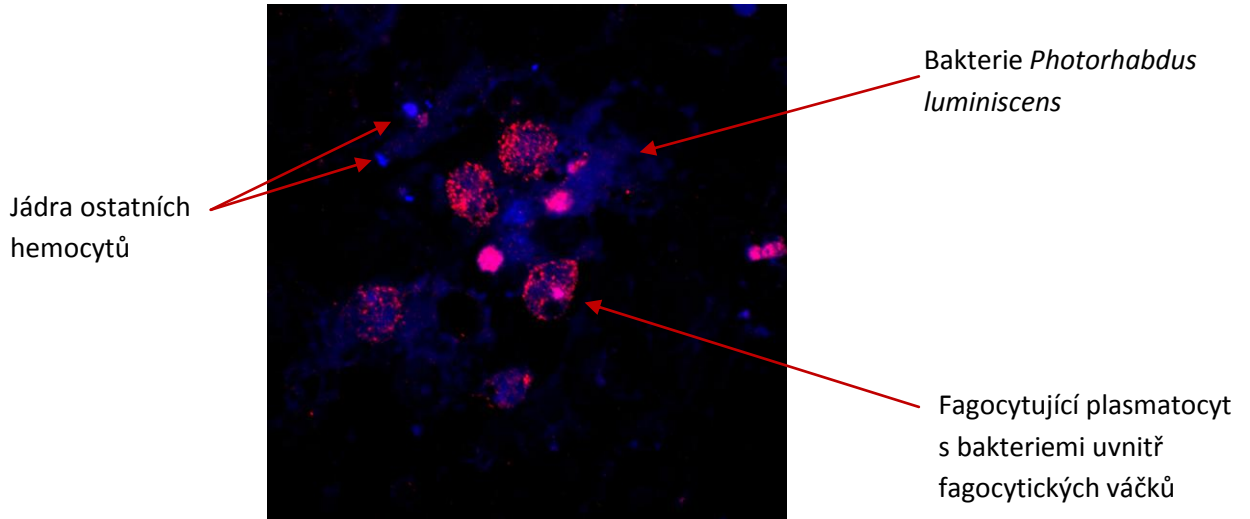
**Obr. 8: Krystalové buňky u *Idgf3<sup>8</sup>/w<sup>1118</sup>* (a) a *w<sup>1118</sup> mif-* (b)**

#### 4.5. Barvení hemocytů protilátkami

Chtěla jsem detekovat i další typy hemocytů a sledovat jejich diferenciaci při infekci. Také jsem chtěla zjistit, zda hemocyty mutantů v *Idgf* genech nesou markery charakteristické pro hmyzí hemocyty a zda jsou schopné diferenciaci během infekce entomopatogenními hlísticemi a parazitickými vosičkami. Pro vizualizaci markerů byly použity protilátky Hemese, Nimrod a Atilla (Příloha II.). Pro vizualizaci jader hemocytů pak bylo použito DAPI, což je fluorescentní barvivo, které se váže na veškerou DNA.

Protilátka Hemese se váže na všechny typy hemocytů, kde se lokalizuje na membrány. Tento jev byl pozorován u všech genotypů. Výjimkou byl dvojitý mutant *Idgf4/ chit*, u něhož bylo zjištěno, že se Hemese na membránu nelokalizuje, ale nachází se uvnitř buňky ve váčcích.

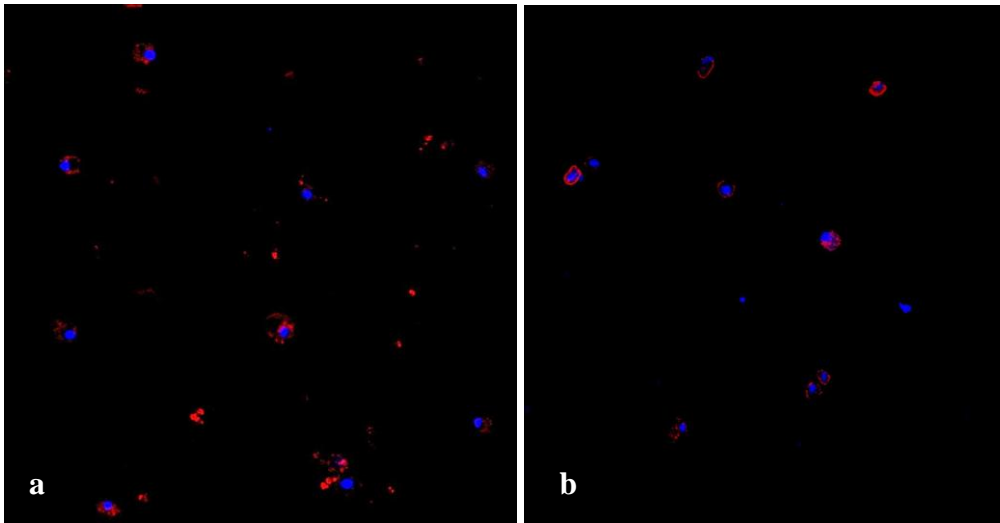
Plasmatocyty obarvené protilátkou Nimrod (Nim C1) měly po infekci entomopatogenními hlísticemi protilátku lokalizovanou uvnitř ve fagocytických váčcích. Po infekci hlísticemi bylo u některých genotypů pozorováno okolo a uvnitř některých plasmatocytů velké množství DAPI pozitivního signálu (Obr. 9). Vzhledem k tomu, že se DAPI váže na jakoukoli DNA ve vzorku, domnívám se, že uvedený signál mohl představovat patogenní bakterie *Photorhabdus luminiscens*, které si hlístice jako symbionty uchovávají v přední části střeva. Lokalizace modrých partikulí- bakterií uvnitř plasmatocytů by pak naznačovala, že zde skutečně proběhla pozitivní infekce. Imunitní systém tak byl v aktivovaném stavu a plasmatocyty tyto bakterie fagocytovaly.



**Obr. 9: Fagocyticky aktivní plasmatocyty s bakteriemi u *Idgf3<sup>8</sup>/ CyGFP* (barveno protilátkou Nim C1, DAPI jsou zviditelněna jádra)**

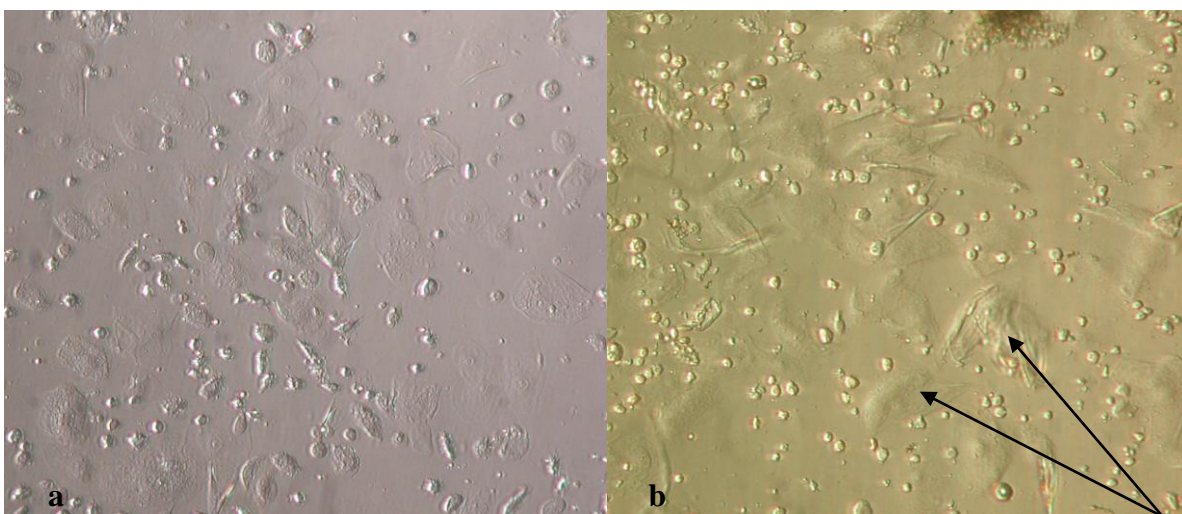
Obarvené plasmatocyty u mutantu *Idgf4/ chit* po infekci hlísticemi, neměly klasické fagocytické váčky (Obr. 10a), jaké byly pozorovány u všech ostatních genotypů (Obr. 9). V kontrolním barvení bez infekce (Obr. 10b) byla lokalizace protilátky Nim C1 spíše na membráně, než uvnitř buňky. Z těchto poznatků by se dalo říci, že se u mutantů *Idgf4/ chit*

fagocytické váčky nevytvářejí a obranná funkce plasmatocytů je tak narušena a nemůže tudíž plnit svoji funkci.



**Obr. 10. Plasmatocyty *Idgf4/ chit* barvené Nim C1 po infekci hlísticemi (a) a bez infekce (b)**

Po infekci parazitickými vosičkami se mi podařilo za pomoci protilátky Atilla zvizualizovat lamelocyty, které se začínají diferencovat jako odpověď na tento typ infekce. Atilla pozitivní buňky byly téměř u všech genotypů v hojném zastoupení (Příloha II.). V preparátu byly buď soliterně, nebo tvořily shluky, které by v živém jedinci obalily vajíčko vosičky. Jediný rozdíl jsem shledala u linií *Idgf3<sup>Δ</sup>* a *Idgf3<sup>Δ</sup>/ CyGFP*. Na těchto preparátech bylo velmi malé množství buněk pozitivních na barvení protilátkou proti Atilla, které se nelišilo od kontrolního barvení bez infekce. V procházejícím světle (Obr. 11) bylo ovšem po infekci vosičkami pozorováno velké množství buněk, které se morfologicky lamelocytům podobaly, charakteristický lamelocytový marker Atilla se u nich ale nevyskytuje (Příloha II.).



**Obr. 11: Lamelocyty u *Canton S* (a) a *Idgf3<sup>Δ</sup>/ CyGFP* (b)**

lamelocyty

V neinfikovaných jedincích se lamelocyty buď nevyskytují vůbec, nebo jen ve velmi nepatrném množství. Ve vzorcích z 20 neinfikovaných larev jsem vždy napočítala maximálně 1- 2 buňky pozitivně barvené Atilla protilátkou, oproti velkému množství Atilla pozitivních buněk při infekci.

## 5. DISKUZE

Hemolymfa *D. melanogaster* obsahuje tři základní typy hemocytů a to plasmatocyty, lamelocyty a krystalové buňky. Všechny se pak účastní procesů, jako je fagocytosa, melanizace nebo enkapsulace, vedoucích k ochraně organismu před patogenními vlivy zvenčí (Irving et al. 2005). Imunitní odpověď je složitý mechanismus, ve kterém hrají důležitou roli i *Idgf* geny. Bylo zjištěno, že se objevují jako součásti různých imunitních odpovědí na infekce patogeny (Shi and Paskewitz 2006). Ve své práci jsem se snažila porovnat některé z vlastností imunitního systému *D. melanogaster* mezi jednotlivými mutanty v *Idgf* genech a kontrolními mouchami. Konkrétně jsem se zaměřila na množství hemocytů a krystalových buněk a zajímala mě i rychlost srážení hemolymfy.

Z výsledků bylo možno vyčíst zajímavý fakt a to, že rychlost srážení byla u mutanta *Chit* rychlejší než u dvojitého mutanta *Idgf4/ chit*. Ačkoli mají tyto 2 geny rozdílnou lokalizaci v genomu (gen *chit-like* se nachází na pravém raménku 2. chromozomu, gen *Idgf 4* na pohlavním chromozomu X), vykazují 90% podobnost v kódujících oblastech a mají některé vlastnosti stejné (Kawamura et al. 1999). Zřejmě zde tedy bude fungovat jakýsi kompenzační mechanismus, který zajistí, že pokud je gen *chit-like* nefunkční, *Idgf 4* bude nahrazovat jeho funkci. O správnosti této domněnky svědčí i pokus, kdy byly infikovány mutanti *Idgf4* a *Chit* entomopatogenními hlísticemi. Pokud byla infekce provedena na jednotlivých mutantech v *Idgf4* a *Chit*, byl průběh infekce stejný jako u kontrol. Pokud byl ale infikován dvojitý mutant *Idgf4/ chit*, průběh infekce byl daleko horší a mutant vykazoval vyšší úmrtnost (Hyršl et al. unpublished)

Mezi různými genotypy, které jsem mezi sebou porovnávala, byl i heterozygot pro mutaci *Idgf 3*<sup>8</sup>, se záchranným konstruktem UAS- *Idgf* pod inducibilním driverem aktivovaným s vazbou na progesteron. Tento genotyp zde byl jednak jako kontrola (bez záchranného konstruktů) a jednak jako „záchrana“, u které byla navozena overexprese *Idgf* mifepristonem. U kontrolní mouchy se hemolymfa srážela poměrně pomalu. Pokud se však do ní vložil záchranný konstrukt a byl indukován mifepristonem, rychlost srážení se zvýšila a dostala se na hodnoty kontrolních much divokého typu. Je tedy patrné, že gen *Idgf 3* má na rychlost srážení hemolymfy výrazný vliv. Stejně jako divoký mutant *Igfd4/ chit*, vykazuje mutant v genu *Idgf3* zvýšenou úmrtnost při infekci hlísticemi. Obrana proti nematodům tedy souvisí i se srážením hemolymfy (Theopold et al. 2002), což jsem svými výsledky potvrdila a *Idgf* geny hrají v těchto procesech důležitou roli.

Vlastnost *Idgf 3* ovlivňovat imunitní systém *D. melanogaster* byla prokázána také u pokusu s počtem hemocytů. Již dříve bylo zjištěno, že produkty genu *Idgf 3* stimulují množení buněk larválních tkání. Pokusy byly dělány u tukového tělesa a imaginárních disků a vždy s pozitivním výsledkem (Kučerová unpublished). Tyto pokusy podporují první funkční pozorování při objevu *Idgf*, kdy stimuloval růst buněk v tkáňové kultuře (Kawamura et al. 1999). Podobný efekt má například lidský homolog HCgp39, který stejným způsobem ovlivňuje proliferaci a diferenciaci makrofágů (Kirkpatrick et al. 1997, Recklies et al. 2002). Množství hemocytů v hemolymfě zřejmě částečně ovlivňují i geny *chit-like* a *Idgf 4*. Z výsledků pokusu měření počtu hemocytů mi statistické analýzy ukázaly, že mutant v genu

*chit-like* má hemocytů málo, dvojitý mutant *Idgf4/chit* má pro změnu málo funkčních hemocytů. Velké množství hemocytů tedy nemusí nutně znamenat, že jsou také funkční, což může být způsobeno jejich nediferenciací.

Dalším zajímavým zjištěním byla rozdílná hodnota počtu hemocytů u mutantů *10/3* a *Dac*<sup>7</sup>. Oba dva mají shodnou mutaci v *Idgf* genech, liší se pouze rozsahem delece genu *dachshund*, přičemž mutantovi *10/3* chybí větší část a dosahoval vyšších hodnot počtu hemocytů. Pokud by bylo množství hemocytů ovlivněno delecí *Idgf* genů, měli by tyto mutantní přinejmenším shodný počet hemocytů. Stejně tak by měl být zvýšený počet hemocytů u samostatného mutantu *Idgf3*<sup>8</sup>. V tomto případě tomu ale tak nebylo, proto se domnívám, že bude počet hemocytů ovlivněn spíše genem *dachshund*. Navíc bylo zjištěno, že myší homolog tohoto genu zřejmě blokuje proliferaci a buněčný cyklus (Wu et al. 2006, Wu et al. 2007). Vystává zde tedy otázka, zda buněčný cyklus běží dál i bez přítomnosti toho genu a zda pokračuje proliferace. Pokusy s genem *dachshund* u *D. melanogaster* byly prozatím prováděny pouze na vývoji a diferenciaci nervové soustavy a na imaginárních terčích, kde gen vykazoval vysokou expresi (Hoang et al. 2010, Giorgianni and Mann 2011). Jeho vliv na lymfatickou žlázu ale bohužel zatím zkoumán nebyl.

Při pokusech s barvením hemocytů protilátkami jsem zjistila několik zajímavých poznatků. Během barvení protilátkami Hemese a Nimrod (Nim C1) u dvojitého mutantu *Idgf4/chit* jsem pozorovala, že se obě protilátky nelokalizovaly do typických míst, tedy na membránu a do fagocytických váčků. Molekula Hemese se za normálních okolností exprimuje na membráně cirkulujících i v přisedlých hemocytů. Zjistilo se, že pokud dochází k úbytku Hemese RNA interferencí, žádné patrné změny na hemocytech nejsou pozorovány, naopak je zvýrazněna buněčná odpověď proti infekci parazitickými vosičkami. Hemese tedy hraje důležitou roli v aktivaci hemocytů (Kurucz et al. 2003). Nimrod je naproti tomu omezen pouze na buňky morfologicky odpovídající plasmatocytům a jeho lokalizace je uvnitř buňky ve fagocytických váčcích (Márkus et al 2005). Jeho vliv na fagocytosu byl zkoumán u bakterií *Staphylococcus aureus* a *Escherichia coli*. Při potlačení exprese Nim C1 docházelo k inhibici fagocytosu *S. aureus*, overexprese naopak Nim C1 v kultuře buněk S2 stimulovala fagocytosu jak u *S. aureus*, tak u *E. coli* (Kurucz et al. 2007). K diferenciaci plasmatocytů dochází jak v embryonálním, tak v larválním stádiu, za přítomnosti transkripčních faktorů Gcm a Gcm2 (Williams 2007).

Během mého barvení nebyl antigen Hemese typicky lokalizován na membránu a Nimrod se také ve fagocytických váčcích nevyskytoval (Příloha II.). Je zde tedy patrné, že hemocyty u tohoto mutantu mají netypické rozmístění antigenů pro danou protilátku. Proto se domnívám, že by tato odchylka mohla být způsobena poškozením diferenciaci plasmatocytů. U Hemese by se mohlo jednat o nefunkčnost některé z drah, která se podílí na diferenciaci ostatních hemocytů.

Při barvení hemocytů protilátkou Atilla, která se specificky váže na lamelocyty, jsem u genotypů *Idgf3*<sup>8</sup> a *Idgf3*<sup>8</sup>/*Cy GFP* našla jen malé množství těchto buněk, oproti zbývajícím mutantům a kontrolám. Atilla je transmembránový protein, který se exprimuje v larvách před zakuklením a k mohutné diferenciaci Atilla pozitivních buněk dochází po infekci parazitickými vosičkami a podílí se na enkapsulaci. Bylo zjištěno, že pokud antigen Atilla



chybí, diferenciaci nebo funkce lamelocytů se nemění a nezměněn zůstává i proces enkapsulace, který je lamelocyty zajišťován (Laurinyecz 2006).

Celý proces diferenciaci probíhá v larválním stádiu, kdy se z prohemocytů začnou za spuštění JAK/ STAT a Notch dráhy a za přítomnosti Kn transkripčního faktoru, diferencovat lamelocyty (Williams 2007). Interakce *Idgf* genů s Notch dráhou nejsou známe, stejně jako interakce s transkripčním faktorem Kn. Transkripční faktor Knot (Kn), známý také jako Collier, se exprimuje v posteriorním signálním centru před expresí faktoru Ser a je pro jeho expresi v těchto buňkách nezbytný. Expresi Kn je během prvního larválního instaru nízká a akumulovat se začíná až během třetího instaru a kukly (Crozatier et al. 1999). Pokud je exprese Kn přemístěna z lymfatické žlázy, mutantní larvě selže produkce lamelocytů během infekce parazitickými vosičkami (Williams 2007). JAK/ STAT dráha je zapojena do proliferace a diferenciaci hemocytů při infekci parazitickými vosičkami (Agaïsse and Perrimon 2004). V souvislosti s touto dráhou bylo prokázáno, že mutanti *Idgf3* mají stejné fenotypové projevy na křídlech, jako mutanti v JAK/ STAT dráze (Yan et al. 1996). Navíc bylo při porovnávání expresního profilu overexpresi *Idgf 3* s kontrolou pomocí čipové analýzy zjištěno, že dochází ke zvýšené expresi ligandu JAK/ STAT dráhy „unpaired“ a receptoru „domeless“ (Kučerová unpublished). Proto se uvažuje nad tím, že je IDGF 3 signálem pro zapínání JAK/ STAT dráhy a tím i diferenciaci lamelocytů. Při podrobnějším analýze svých vzorků focených v procházejícím světle a po infekci vosičkami, jsem ale našla dostatečné množství buněk, které se lamelocytům morfologicky podobaly. Toto množství bylo srovnatelné s ostatními genotypy. Nedostatek lamelocytů ve skutečnosti tedy nemusel být způsoben jejich nepřítomností, ale jejich neschopností barvit se proti protilátce Atilla. U mutantu *Idgf3*<sup>δ</sup> mohla být narušena dráha, která vede k expresi antigenu Atilla na povrchu lamelocytů

Z předložené diplomové práce, vzešlo několik zajímavých výsledků v oblasti fungování hmyzího imunitního systému. Nepřehlédnutelné jsou zejména rozdílné hodnoty množství hemocytů u dvou geneticky podobných mutantů v *Idgf* genech, rychlost srážení hemolymfy, která je důležitá pro zacelení poranění nebo způsob, jakým se imunitní systém projevuje po infekcích vosičkami nebo hlísticemi. Tyto výsledky by mohly nasměrovat budoucí studie k důležitým aspektům hmyzí imunity a naopak by mohly naznačit, které oblasti již není potřeba zkoumat. Mohly by tedy být východiskem pro následující studie na mutantech v *Idgf* genech.

## 6. ZÁVĚR

Zjistila jsem, že fenotypy mutantů *Idgf3*, *Idgf4* a *Dac*<sup>7</sup> souvisí s imunitním systémem. Při měření srážení hemolymfy jsem shledala, že produkty genu *Idgf 3* výrazným způsobem ovlivňují rychlost srážení. Pokud bylo IDGF 3 málo, hemolymfa se srážela pomalu, v případě dostatku se srážela rychle. Navíc bylo z výsledků patrné, že pokud se k heterozygotnímu mutantovi *Idgf3*<sup>8</sup> přidal záchranný konstrukt v podobě UAS- *Idgf*, srovnala se jeho rychlost srážení hemolymfy na hodnoty kontrol. Analýzy také ukázaly, že se na rychlosti srážení částečně podílí i gen *Idgf 4* a *Chit*, kteří si mohou v tomto případě navzájem kompenzovat svoje funkce.

Z výsledků pokusu měření počtu hemocytů mi statistické analýzy ukázaly, že mutant v genu *chit-like* má málo hemocytů, dvojitý mutant *Idgf4/ chit* má pro změnu málo funkčních hemocytů.

Z pokusů barvení hemocytů protilátkami jsem zjistila, že mutanti *Idgf3*<sup>8</sup> a *Idgf3*<sup>8</sup>/*CyGFP* mají zřejmě porušenou dráhu, zodpovídající za diferenciaci lamelocytů. Dalším zjištěním bylo, že se mutantům *Idgf4/ chit* nesprávně lokalizuje protilátka Hemese na membráně hemocytů a nesprávně se jim vizualizují markery na plasmatocytech barvených protilátkou Nim C1 a to jak po infekci entomopatogenními hlísticemi, tak u kontrolních vzorků bez infekce. Posledním objasněním bylo, že plasmatocyty všech ostatních genotypů účinně fagocytují bakterie, obsažené v preparátu.

Z výsledků mých pokusů a analýz tedy vyplývá, že geny *Idgf* skutečně hrají důležitou roli v imunitní odpovědi *D. melanogaster*.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Agaisse H., Perrimon N. (2004):** The role of JAK/ STAT Signaling in *Drosophila* immune responses. *Immunological Review* 198: 72- 82
- Ashida M., Brey P. T. (1995):** Role of the integument in insect defense: pro-phenol oxidase cascade in the cuticular matrix. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 92:10698- 10702
- Bernardoni R., Vivancos V., Giangrande A. (1997):** *Glide/gcm*Is Expressed and Required in the Scavenger Cell Lineage. *Developmental Biology* 19: 118- 130
- Burnell A. M., Stock S. P. (2000):** *Heterorhabditis*, *Steinernema* and their bacterial symbionts lethal pathogens of insects. *Nematology Vol. 2: 31-42*
- Butler M. J., Jacobsen T. L., Cain D. M., Jarman M. G., Hubank M., Whittle J. R. S., Phillips R., SimCox A. (2003):** Discovery of genes with highly restricted expression patterns in *Drosophila* wing disc using DNA oligonucleotide microarrays. *Development* 130: 659- 670
- Carton Y., Nappi A. J. (1997):** *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitology Today* 13: 218- 227
- Carton Y., Nappi A. J. (2001):** Immunogenetic aspects of the cellular immune response of *Drosophila* against parasitoids. *Immunogenetics* 52: 157- 164
- Castillo J. C., Reynolds S. E., Eleftherianos I. (2011):** Insect immune responses to nematode parasites. *Trends in Parasitology* 27: 537- 547
- Ceriani M. F., Hogenesch J. B., Yanovsky M. Panda S., Straume M. Kay S. A. (2002):** Genome- wide expression analysis in *Drosophila* reveals genes controlling circadian behavior. *The Journal of Neuroscience* 22: 9305- 9319
- Crozatier M., Valle D., Dubois L., Ibsouda S., Vincent A. (1999):** Head versus trunk patterning in the *Drosophila* embryo; *collier* requirement for formation of the intercalary segment. *Development* 126: 4385- 4394
- Dowds B. C. A., Peters A. (2002):** Virulence mechanisms. *Entomopathogenic Nematology*, 2002.
- Duvic B., Hoffmann J. A., Meister M., Royet J. (2002):** Notch signaling controls lineage specification during *Drosophila* larval hematopoiesis. *Current Biology* 12: 1923- 1927

**Ehlers R.-U. (2001):** Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Mikrobiology Biotechnology* 56: 623- 633

**Evans C. J., Hartenstein V., Banerjee U. (2003):** Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Developmental Cell* 5: 673- 690

**Farkaš R., Štuřáková G. (1999):** Development regulation of granule size and number in larval salivary glands of *Drosophila* by steroid hormone ecdysone. *Cell Biology International* 1: 671- 676

**Fauvergue X., Fleury F., Lemaintre C., Allemand R. (1999):** Parasitoid mating structures when hosts are patchily distributed: field and laboratory experiments with *Leptopilina boulardi* and *L. heteroma*. *Oikos* 86: 344- 356

**Fleury F., Ris N., Allemand R., Fouillet P., Carton Y., Boulétreau M. (2004):** Ecological and genetical interactions in *Drosophila*- parasitoids communities: A case study with *D. melanaogaster*, *D. simulans* and their common *Leptopilina* parasitoids in south- eastern France. *Genetica* 120: 181- 194

**Giorgianni M. W., Mann R. S. (2011):** Establishment of Medial Fates along the Proximodistal Axis of the *Drosophila* Leg through Direct Activation of *dachshund* by Distalless. *Developmental Cell* 20: 455- 468

**Gupta A.P. (2001):** Immunology of invertebrates: Humoral. *Encyclopedia of life sciences, John Wiley and Sons. Ltd., 2001*

**Hakala B. E., White C., Recklies A. D. (1993):** Human cartilage gp- 39 major secretory product of particular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of chitinase protein family. *The Journal of Biological Chemistry* 268: 25803- 25810

**Hallem E. A., Rengarajan M., Ciche T. A., Sternberg P. W. (2007):** Nematodes, bacteria, and flies: A tripartite model for nematoda parasitism. *Current Biology* 10: 898- 904

**Han R., Ehlers R. -U. (2000):** Pathogenicity, development, and reproduction of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* under axenic in vivo conditions. *Journal of Invertebrate Pathology* 75: 55-58

**Hoang C. Q., Burnett M. E., Curtiss J. (2010):** *Drosophila* CtBP regulates proliferation and differentiation of eye precursors and complexes with Eyeless, Dachshund, Dan, and Danr during eye and antennal development. *Developmental Dynamics* 239: 2367- 2385

**Holz A., Bossinger B., Strasser T., Janning W., Klapper R. (2003):** The two origins of hemocytes in *Drosophila*. *Development* 130: 4955- 4962

**Hu B., Trinh K., Figueira W. F., Price P. A. (1996):** Isolation and sequence of a novel human chondrocytes protein related to mammalian members of chitinase protein family. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 19415- 19420

**Hultmark, D. (2003):** *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology* 15: 12- 19

**Irving P., Ubeda J. M., Doucet D., Troxler L., Lagueux M., Zachary D., Hoffmann J. A., Hetru C., Meister M. (2005):** New insights into *Drosophila* larval haemocyte functions through genome- wide analysis. *Cellular Microbiology* 7: 335- 350

**Jelínek J., Zicháček V. (2000):** Biologie pro gymnázia, 4. rozšířené vydání. *Nakladatelství Olomouc*, pp. 559

**Kang H. L., Benzer S., Min K. T. (2002):** Life extension in *Drosophila* by feeding a drug. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 99: 838- 843

**Karlsson C., Korayem A. M., Scherfer C., Loseva O., Dushay M. S., Theopold U. (2004):** Proteomic analysis of the *Drosophila* larval hemolymph clot. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 52033- 52041

**Kawamura K., Shibata T., Saget O., Peel D., Bryant P. (1999):** A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal discs cells. *Development* 126: 211- 219

**Kindt T. J., Goldsby R. A., Osborne B. A (2007):** Kuby Immunology. [s.l.] : [s.n.].

**Kirkpatrick R. B., Emery J. G., Connor J. R., Dodds R., Lysko P. G., Rosenberg M. (1997):** Induction and expression of human cartilage glycoprotein 39 in rheumatoid inflammatory and peripheral blood monocyte-derived macrophages. *Experimental Cell Research* 237, 46–54

**Kirkpatrick R. B., Matico R. E., McNulty D. E., Strickler J. E., Rosenberg M. (1995):** An abundantly secreted glycoprotein from *Drosophila melanogaster* is related to mammalian secretory proteins produced in rheumatoid tissues and by activated macrophages. *Gene* 153: 147- 154

**Kodrík D. (2000):** Fyziologie hmyzu, učební texty. *EntÚ AVČR a BF JU, České Budějovice*

**Kurucz E., Márkus R., Zsámboki J., Folkl- Medzihradzsky K., Darula Z., Vilmos P., Udvardy A., Krausz I., Lukacsovich T., Gateff E., Zettervall C. J., Hultmark D., Andó I. (2007):** Nimrod, a putative phagocytosis receptor with EGF repeats in *Drosophila* plasmatocytes. *Current Biology* 17: 649- 654

**Kurucz E., Zettervall C. J., Sinka R., Vilmos P., Pivarsci A., Ekengren S., Hegedüs Z., Ando I., Hultmark D. (2003):** Hemese, a hemocyte- specific transmembrane protein, affects the cellular immune response in *Drosophila*. *Proceeding of the National. Academy of Science of the United States of America* 100: 2622- 2627

**Lanot R., Zachary D., Holder F., Meister M. (2001):** Postembryonic hematopoiesis in *Drosophila*. *Developmental Biology* 230: 243- 257

**Laurinyecz B. (2006):** Atilla, the novel GPI- anchored lamellocyte antigen, affects melanotic tumor formation in *Drosophila*. *Acta Biologica Szegediensis* 50: 161, *dissertation summary*

**Lavine M. D., Strand M. R. (2002):** Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1295- 1309

**Levy F., Bulet P., Ehret- Sabatier L. (2004):** Proteomic analysis of the systematic immune response of *Drosophila*. *Molecular and cellular proteomic* 3.2: 156- 166

**Mardon G., Salomon N. M., Rubin G. M. (1994):** The retina determination gene *dachshund*, is required for mushroom body differentiation. *Development* 127: 2663- 2672

**Márkus R., Kurucz E., Rus F., Ando I. (2005):** Sterile wounding is a minimal and sufficient trigger for a cellular immune response in *Drosophila melanogaster*. *Immunology Letters* 101: 108- 111

**Munier A. I., Doucet D., Perrodou E., Zachary D., Meister M., Hoffmann J. A., Janeway C. A., Lagueux M. (2002):** PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor, induces hemocyte proliferation in *Drosophila* larvae. *EMBO Rep.* 3: 1195- 1200

**Nappi A. J., Vass E. (1993):** Melanogenesis and the generation of cytotoxic molecules during insect cellular immune reactions. *Pigment Cell Research* 3: 117- 126

**Nappi A. J., Vass E., Frey F., Carton Y. (2000):** Nitric oxide involvement in *Drosophila* immunity. *Nitric Oxide* 4: 423- 430

**Nečas O., Čatár G., Hejtmánek M., Šmarda J., Štark O., Vršanský V. (1982):** Biologie- učebnice pro lékařské fakulty. *Nakladatelství Avicenum, pp.* 397

**Neubauerová T., Macková M., Macek T., Koutek B. (2009):** Kationické antimikrobiální peptidy. *Chemické Listy 10: 460- 468*

**Nio J., Fujimoto W., Konno A., Kon Y., Owhashi M. Iwanaga T. (2004):** Cellular expression of murine Ym1 and Ym2, chitinase family proteins, as revealed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histochemistry and Cell Biology 121: 473- 482*

**Owhashi M., Arita H., Hayan N. (2000):** Identification of novel eosinophil chemotactic cytokine (ECF- L) as a chitinase family protein. *Journal of Biological Chemistry 275: 1279- 1286*

**Recklies A. D, Baillargeon L., Ling H. (2000):** HC- gp39 is a growth factor for connective tissue cells. *Athritis Rheum 43 (9, suppl.), S295*

**Recklies A., White Ch. Ling H. (2002):** The chitinase 3- like protein human cartilage glycoprotein 39 (HC- gp39) stimulates proliferation of human connective- tissue cells and activates both extracellular signal- regulated kinase and protein kinase B- mediated signalling pathways. *Biochemistry Journal 365: 119- 126*

**Rehorn K. P., Thelen H., Michelson A. M., Reuter R. (1996):** A molecular aspect of hematopoiesis and endoderm development common to vertebrates and *Drosophila*. *Development (Cambridge, U. K.) 130: 4955- 4962*

**Rizki T. M., Rizki R. M. (1980):** Properties of larval hemocytes of *Drosophila melanogaster*. *Experientia 36*

**Rizki T. M., Rizki R. M., Carton Y. (1990):** *Leptopilina heteroma* and *L. bouvardi*: strategies to avoid cellular defense responses of *Drosophila melanogaster*. *Experimental Parasitology 70: 466- 475*

**Rizki T. M, Rizki R. M, Grell E. H (1980):** A mutant affecting the crystal cells in *Drosophila melanogaster*. *Wilhelm Roux's Arch 188: 91–99.*

**Rogulja D., Irvine K. D. (2005):** Regulation of cell proliferation by a morphogen gradient. *Cell 123: 449- 461*

**Russo J., Brehélin M., Carton Y. (2001):** Haemocyte changes in resistant and susceptible strains of *D. melanogaster* caused by virulent and avirulent strains of the parasitic wasp *Leptopilina bouvardi*. *Journal of Insect Physiology 47: 167- 172*

**Scherfer Ch., Karlsson Ch., Loseva O., Bidla G., Goto A., Havemann J., Dushay M. S., Theopold U. (2004):** Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method. *Current Biology 14: 625- 629*

**Scherfer Ch., Qazi M. R., Takahashi K., Ueda R., Dushay M. S., Theopold U., Lemaitre B. (2006):** The Toll immune- regulated *Drosophila* protein *Fondue* is involved in hemolymph clotting and puparium formation. *Developmental Biology* 295: 156- 163

**Schlenke T. A., Morales J., Govind S., Clark A. G. (2007):** Contrasting infection strategies in generalist and specialist wasp parasitoid of *Drosophila melanogaster*. *PLoS pathogens* 3: 1486- 1501

**Shi L., Paskewitz S. M. (2006):** Proteomics and insect immunity. *Invertebrate Survival Journal* 3: 4- 17

**Scott C. C., Dobson W., Botelho R. J., Coady- Osberg N., Chavrier P., Knecht D. A., Heatht C., Stahl P., Gristein S. (2005):** Phosphatidylinositol- 4, 5- bisphosphate hydrolysis directs actin remodeling during phagocytosis. *Journal of Cell Biology* 169: 139- 149

**Sparrow J. C. (1978):** Melanotic tumours. In *The Genetics and Biology of Drosophila*. Ashburner M., Wright T. R. F. (ens.) London: Academic Press, pp. 277- 315

**Steck E., Breit S., Breusch S. J., Axt M., Richter W. (2002):** Enhanced expression of the human chitinase- 3- like 2 gene (YKL- 39) but not chitinase- 3- like 1 gene (YKL- 40) in osteoarthritic cartilage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299: 109- 115

**Strand M. R., Noda T. (1991):** Alteration in the hemocytes of *Pseudoplusia* includes after parasitism by *Microplitis demolitor*. *Journal of Insect Physiology*, 37: 839- 850

**Theopold U., Li D., Fabri M., Scherfer C., Schmidt O. (2002):** The coagulation of insect hemolymph. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 363- 372

**Theopold U., Schmidt O., Soderhall K., Dushay M. S. (2004):** Coagulation in arthropods, defence, wound closure and healing. *Trends in Immunology* 25: 289- 294

**Traver D., Zon L. I. (2002):** Walking the walk: migration and other common themes in blood and vascular development. *Cell* 108: 731- 734

**Valentová I. (2007):** Srovnání patogenity entomopatogenních hlístovek v larvách *Galleria mellonella* při změně vnějších faktorů. *Magisterská diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, České Budějovice*

**Varela P. F., Llera A. S., Mariuzza R. A., Tormo J (2002):** Crystal structure of imaginal disc growth factor 2 a member of a nex family of growth- promoting glykoproteins from *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 13229- 13236



- Vierstraete E., Verleyan P., Sas F., Van den Bergh, De Loof A., Arckens L., Schoofs L. (2004):** The instantly released *Drosophila* immune proteome is infection specific. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317: 1052- 1060
- Vilmos P., Kurucz E. (1998):** Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. Mini- review. *Immunology Letters* 62: 59- 66
- Waterfield N. R., Ciche T., Clark D. (2009):** *Photorhabdus* and a host of hosts. *Annual Review of Microbiology* 63: 557- 574
- Weiser J., Mráček Z. (1988):** Parazitické hlístice hmyzu. *Academia Praha*
- Whitfield J. B., Asgari S. (2003):** Virus or not? Phylogenetics of polydnviruses and their wasp carriers. *Journal of Insect Physiology* 49: 397- 405
- Williams M. J. (2007):** *Drosophila* hematopoiesis and cellular immunity. *The Journal of Immunology* 178: 4711- 4716
- Wu K., Liu M., Li A., Donniger H., Rao M., Jiao X., Lisanti M. P., Cvekl A., Bierres M., Pestell R. G. (2007):** Cell fate determination factor DACH1 inhibits c- Jun- induced contact- independent growth. *Molecular Biology* 18: 755- 767
- Wu K., Li A., Rao M., Liu M., Dailey V., Yang Y., Di Vizio D., Wang Ch., Lisati M. P., Sauter G., Russell R. G., Cvekl A., Pestell R. G. (2006):** DACH1 is a cell fate determination factor that inhibits cyclin D1 and breast tumor growth. *Molecular and Cellular Biology* 26: 7116- 7129
- Xionghui L., Söderhäll K., Söderhäll I. (2011):** Invertebrate hematopoiesis: An astakine dependent novel hematopoietic factor. *The Journal of Immunology* 186: 2073- 2079
- Yan R., Luo H., Darnell J. E., Dearolf C. R. (1996):** A JAK/ STAT pathway regulates wing vein formation in *Drosophila*. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 93: 5842- 5847
- Zhu Q., Deng Y., Vanka P., Brown S. J., Muthukrishnan S., Kramer K. J. (2004):** Computational identification of novel chitinase- like proteins in the *Drosophila melanogaster* genome. *Bioinformatics* 20: 161- 169
- Zou S., Meadows S., Sharp L., Jan Y. L., Jan Y. N. (2000):** Genome- wide study of aging and oxidative stress response in *Drosophila melanogaster*. *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* 97: 13726- 13731

## ***PŘÍLOHA I.***

- **10x PBS** (Phosphate Buffered Saline)

Navázat:

80g NaCl (c= 1,37 M)  
2g KCl (c= 27 mM)  
12,46g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O (c= 70mM)  
2,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (c= 15mM)

Rozpustit v cca 900 ml destilované vody, upravit pH na 7,2 a doplnit na celkový objem 1000 ml. Po namíchání je potřeba vzniklý roztok vykládat.

- **1x PBS** (je potřeba na samotný pokus)

9 dílů destilované vody + 1 díl 10x PBS  
= 150 ml destilované vody + 20 ml 10x PBS, upravit pH na 7,2 a doplnit na celkový objem 200 ml

- **Příprava 4% paraformaldehydu** (do 10 ml centrifugační zkumavky)

0,4 g p-formaldehydu přidáme do 5 ml dd H<sub>2</sub>O  
Roztok zahřejeme ve vodní lázni na 65°C a přidáme 6μl 1M NaOH- směs se projasní a začne se rozpouštět, pak přidáme 1 ml 10x PBS a doplníme dd H<sub>2</sub>O do 10 ml  
Paraformaldehyd připravujeme vždy čerstvý a spotřebujeme do 24 hodin

- **Příprava 10% BSA** (bovine serum albumine)

Navázat:

0,1 g BSA do větší Eppendorfovi zkumavky a přidat 900μl 1x PBS, pořádně zvortexujeme, aby se BSA rozpustilo

- **Příprava 1% BSA**

1 díl 10% BSA a 9 dílů 1x PBS  
= 20 μl 10% BSA a 180 μl 1x PBS

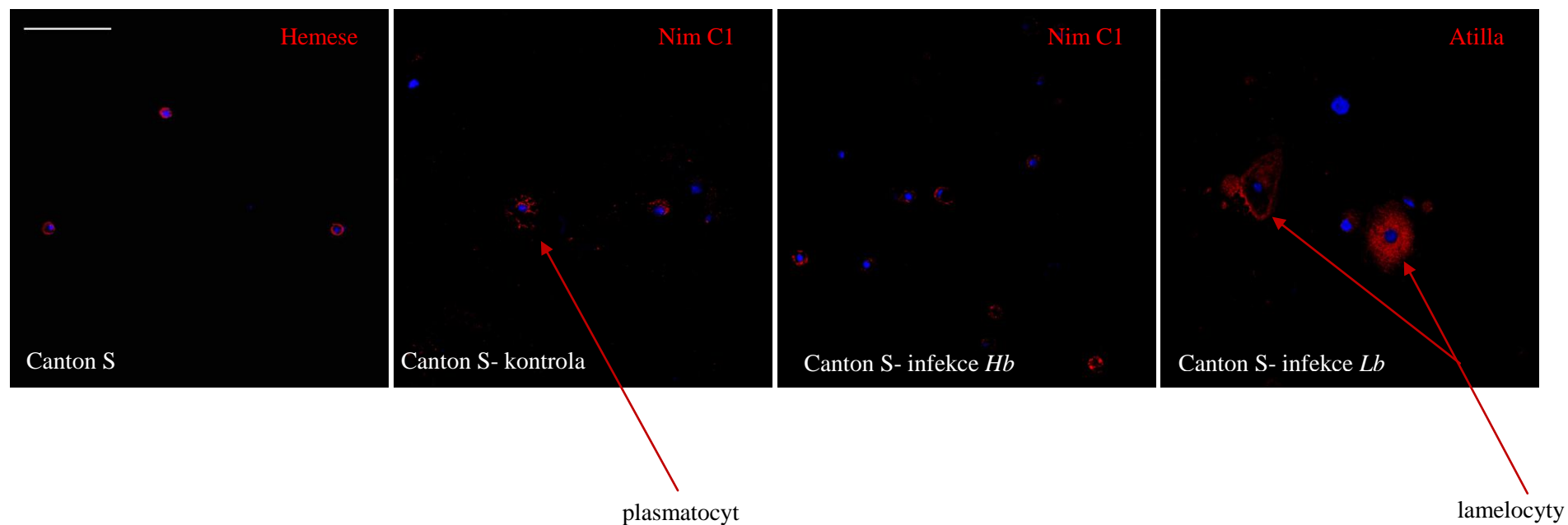
Na vzorek používám 100μl, ale dalších 99μl potřebuji na naředění protilátky, proto takové množství

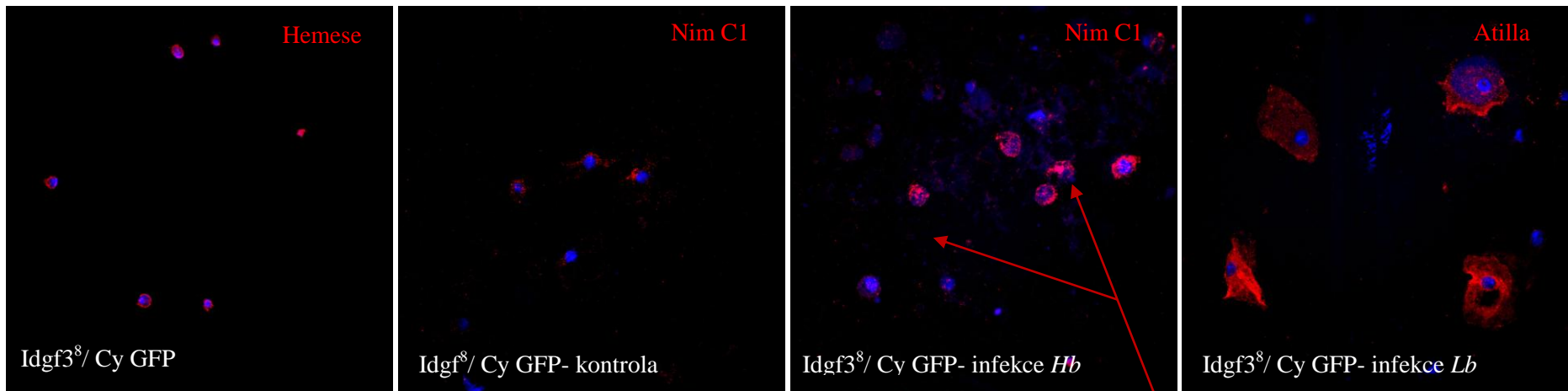
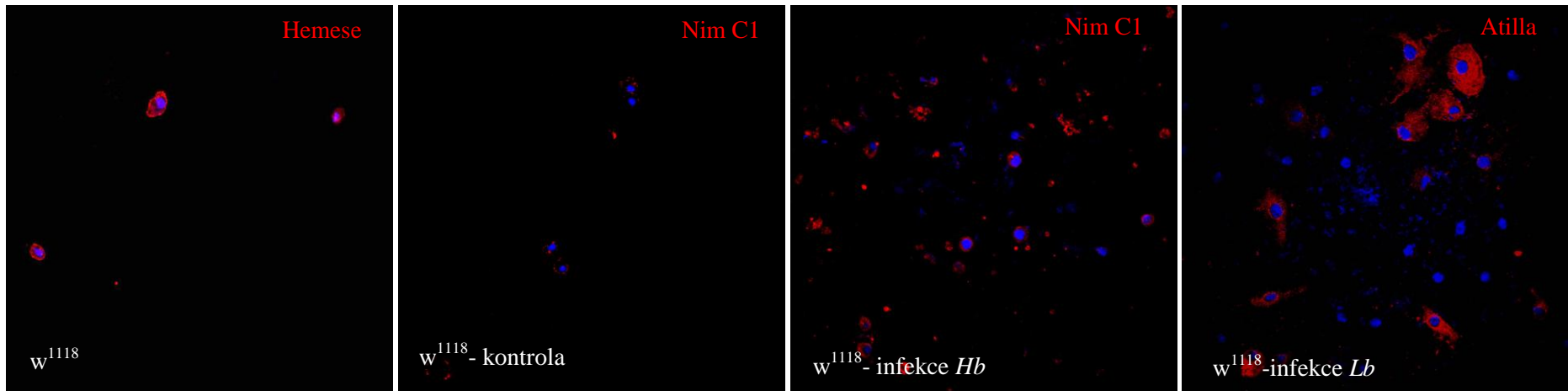
## PŘÍLOHA II.

Barvení hemocytů protilátkami (Hemese, Nimrod, Atilla), bez infekce, po infekci nematodami *Heterorhabditis bacteriophora* (*Hb*) a po infekci vosičkami *Leptopilina boulardi* (*Lb*)

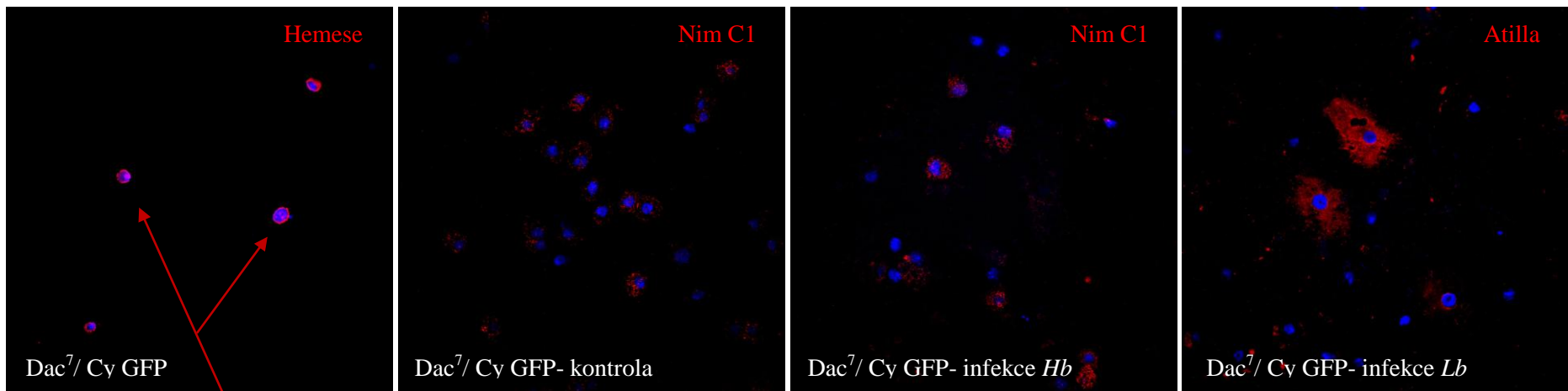
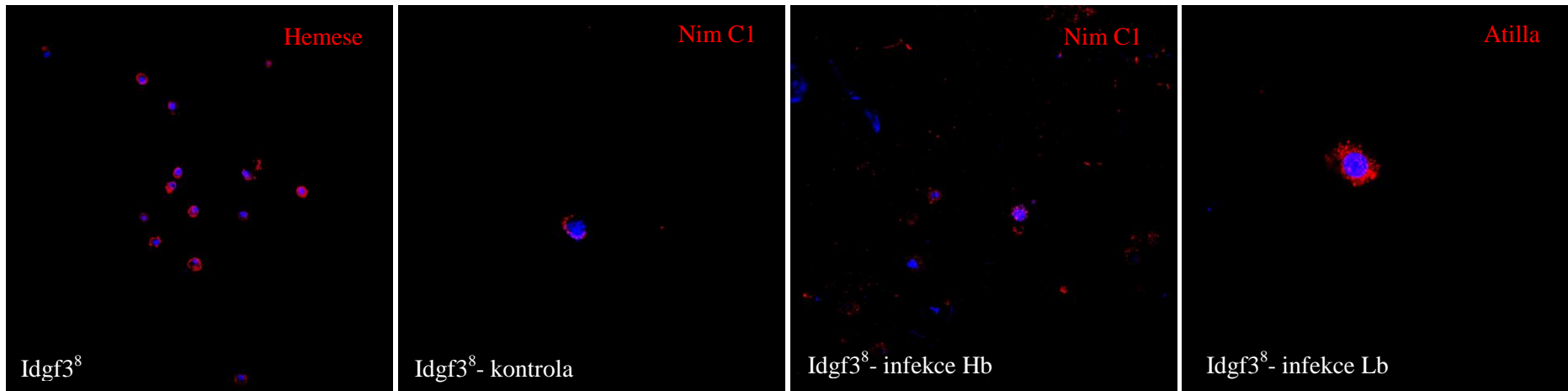
Sekundární protilátkou Cy3 (cyaninové barvivo, fluorescentní ve žlutozelené oblasti spektra- 550- 570 nm) byly obarveny různé antigeny na hemocytech a modře pomocí DAPI byla obarvena jaderná DNA

Měřítko činí 50 $\mu$ m

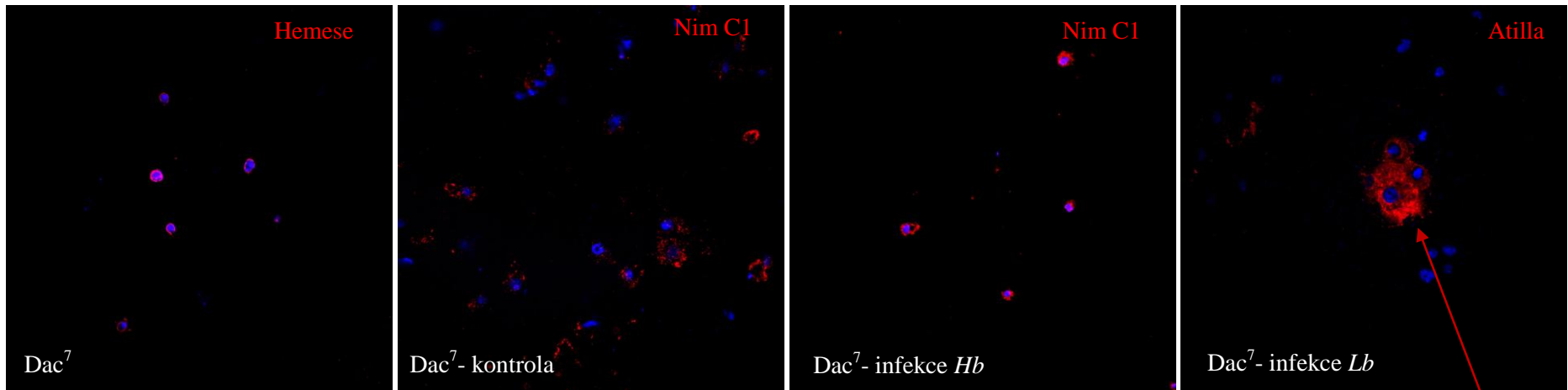




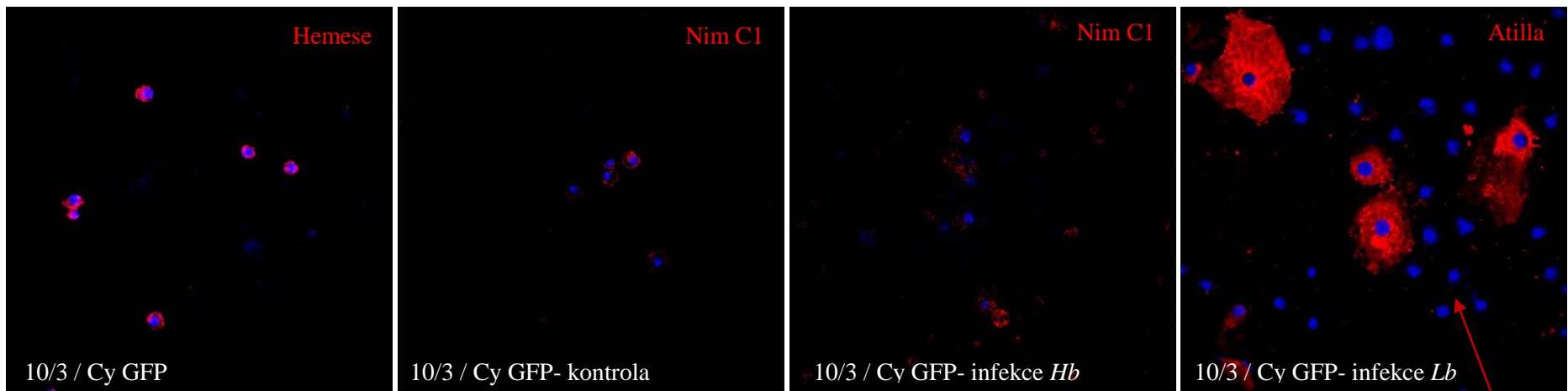
fagocytující plasmatocyty  
s bakteriemi uvnitř



Pro Hemese typické  
obarvení membrány  
hemocytů



lamelocyty  
 vytvářející shluky



Jádra ostatních  
 hemocytů

