

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vliv proteinu IDGF2 na expresi vybraných
genů u buněčné linie Cl.8+**

Bakalářská práce

Lenka Rouhová

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

České Budějovice 2015

Rouhová, L., 2015: Vliv proteinu IDGF2 na expresi vybraných genů u buněčné linie Cl.8+ [The effect of IDGF2 protein on expression of selected genes in cell line Cl.8+. Bc. Thesis, in Czech] – 31 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The imaginal discs growth factors (IDGFs) are proteins able to induce proliferation of Cl.8+ cells proliferation in collaboration with insulin. They are also connected with response to starvation stress and innate immunity. A genome-wide analysis of Cl.8+ cells treated with IDGF2, which was performed in our lab, detected tens of genes transcriptionally induced by this protein. The aim of this work was to confirm this effect with some of these genes using quantitative PCR.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské 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, 17.4.2015

.....

Lenka Rouhová

Poděkování

Chtěla bych na tomto místě poděkovat svému školiteli Doc. RNDr. Michalu Žurovcovi za pomoc při vypracování této práce. Dále mé díky patří všem členům naší laboratoře, kteří mi zejména v začátcích mé práce ochotně pomáhali naučit se všemu potřebnému, zvláště pak RNDr. Lucii Kučerové a Mgr. Václavu Brožovi. V neposlední řadě děkuji také své rodině za podporu nejen při psaní této práce, ale i po celou dobu studia.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Protein IDGF2 a jeho příbuzní.....	1
1.2. Imunita <i>Drosophila melanogaster</i>	3
1.3. Inzulínová signální dráha	6
2. Cíle práce	10
3. Materiály a metody	11
3.1. Pokusné organismy	11
3.2. Aplikace proteinu IDGF2 na buňky.....	11
3.3. Izolace RNA.....	11
3.4. Reverzní transkripce	11
3.5. Ředění vzorků cDNA.....	11
3.6. Navrhování primerů	12
3.7. Kvantitativní PCR.....	13
3.8. Kontrola délky amplifikovaných úseků na gelu	14
3.9. Analýza dat	14
4. Výsledky	16
4.1. Izolace RNA a příprava cDNA	16
4.2. Kvantitativní PCR a kontrola správného průběhu reakce.....	16
4.3. Analýza dat	18
5. Diskuse	23
5.1. Provedení experimentu	23
5.2. Výsledky experimentu	24
6. Závěr	28
7. Seznam literatury	29

1. Úvod

1.1. Protein IDGF2 a jeho příbuzní

Genová rodina *Idgf* (Imaginal Discs Growth Factors) je u *Drosophila melanogaster* tvořena šesti členy o podobné sekvenci, a to geny *Idgf1-5* a prvně objeveným *DS47*, známým též jako *Chit* (Kawamura et al. 1999; Žurovcová and Ayala 2002). Zatímco většina hmyzu má po jednom zástupci rodiny *Idgf*, u dvoukřídlého hmyzu došlo k jejich i několikanásobné duplikaci a to až na již zmiňovaných šest u *Drosophila melanogaster* (Asgari and Schmidt 2004, Attardo et al. 2006, Huang et al. 2006, Shi and Paskewitz 2004, Tsuzuki et al. 2001).

Produkty genové rodiny *Idgf* patří do širší rodiny 18-glykosyl hydroláz, konkrétně mezi tzv. Chitinase-like proteiny (CLP) (Badariotti et al 2007, Kirkpatrick et al. 1995). Svou sekvencí se totiž podobají chitinázám, z nichž se pravděpodobně vyvinuly a s nimiž sdílejí podobnou strukturu. Kvůli aminokyselinové substituci v aktivním místě však postrádají enzymatickou aktivitu (Kawamura et al. 1999, Varela 2002). I po ztrátě schopnosti štěpit cukerné řetězce jim ale zůstalo vazebné místo pro rozpoznání substrátu, a tak získaly novou funkci. Podle funkce je řadíme mezi lektiny nebo cukr-vazebné proteiny vázající se na oligosacharidové struktury na povrchu membránových proteinů (Varela 2002, Sun et al. 2001). Konkrétně u IDGF2 se jedná o cukerný motiv $\text{Gal}\alpha 1-3(\text{Fuc}\alpha 1-2)\text{Gal}\beta 1-3\text{GlcNAc}\beta$ (nepublikovaná data).

CLP jsou evolučně velmi konzervované, jejich zástupce nalezneme nejen u diptera, ale i u jiných druhů hmyzu, u měkkýšů a dokonce u obratlovců včetně člověka (Badariotti et al 2006, Kirkpatrick et al. 1995). Dělí se do dvou podskupin 18-glykosyl hydroláz - rodinu IDGF, kam patří kromě drozofilích IDGF1-5 a DS47 i ostatní hmyzí CLP jako např. EN03 u *Bombyx mori* či bourčí verze IDGF, a druhou rodinu do níž kromě některých chitináz patří např. Cg-Clp1 nalezený u *Crassostrea gigas*, myší YM-1 nebo lidské YKL39 a HC-gp39 (Badariotti et al 2006).

Příbuznost s lidskými proteiny HC-gp39 (YKL40) a YKL39 je jedním z hlavních důvodů pro výzkum drozofilích CLP, tedy rodiny IDGF. Protein HC-gp39 stimuluje růst lidských synoviálních buněk a fetálních plicních fibroblastů, což je v souladu s fungováním drozofilích proteinů IDGF jako růstových faktorů (Recklies et al. 2002). Koncentrace HC-gp39 je zvýšena v synoviální tekutině pacientů trpících revmatickými chorobami a osteoartritidou, kde byl původně objeven (Hakala et al. 1993). Protein YKL39 se velmi podobá svému nejbližšímu příbuznému HC-gp39 a je rovněž exprimován v chondrocytech (Hu et al. 1996).

Jak název napovídá, proteiny IDGF hrají u *Drosophila melanogaster* roli růstových faktorů. Bylo prokázáno, že ve spolupráci s inzulínem podporují růst buněk *in vitro*, dokonce i v médiu bez fetálního bovinního séra jsou díky nim buňky schopné se rozdělit (Kawamura et al. 1999). Mechanismus působení IDGF na dělení buněk a jeho napojení na inzulínovou dráhu však dosud nejsou známy. Fakt, že k rozdělení buněk je nutný jak IDGF i inzulín současně, napovídá, že fungují v paralelních drahách, jejichž signály se pro dosažení efektu musejí spojit.

Druhým procesem potenciálně souvisejícím s inzulínem, na němž se proteiny z rodiny IDGF podílejí, je reakce na nedostatek potravy. U drozofily byla při hladovění prokázána změna transkripce genů *Idgf1* a *Idgf3* (Harbison et al. 2005). Stejně tak nedostatek potravy ovlivňuje expresi IDGF i u *Bombyx mori* (Li et al. 2009).

Další úloha proteinů IDGF tkví zřejmě ve vrozené imunitě. Bylo pozorováno zvýšení exprese proteinů IDGF1 a IDGF3 po septickém poranění dospělé drozofily, nikoli však při infekci houbami (De Gregorio et al. 2001). U drozofilích larev infikovaných Gram pozitivními bakteriemi a houbami pak v hemolymfě dochází ke zvýšení koncentrace jedné formy IDGF2 a zároveň úbytku druhé formy téhož proteinu, což naznačuje aktivaci proteinu v reakci na napadení patogenem. Naopak blízce příbuzný protein DS47 po infekci Gram pozitivními bakteriemi v hemolymfě ubývá (Vierstraete et al. 2004). Pro zapojení IDGF do imunity hovoří i skutečnost, že jsou mimo jiné exprimovány i v hemocytech (Irving et al. 2005, Kirkpatrick et al. 1995). I u příbuzných proteinů v jiných organismech byly nalezeny imunitní funkce. Příkladem mohou být AgBR1 a AgBR2, které se ve zvýšené míře vyskytují v hemolymfě *Anopheles gambiae* po bakteriální infekci a jsou při styku s bakteriemi aktivovány proteolyticky (Shi and Paskewitz 2004). Tyto skutečnosti jsou obzvláště zajímavé, vezmeme-li v úvahu účast lidského homologu HC-GP39 v procesech souvisejících s autoimunitním onemocněním, jakým je revmatoidní artritida.

V souvislosti s vlivem IDGF2 na buňky Cl.8+, kterému se věnuji ve své práci, byla již provedena analýza transkripce na úrovni celého genomu pomocí expresních čipů. Tato analýza ukázala prokazatelný pozitivní vliv (fold change > 2, p < 0,05) na expresi 48 genů, z nichž největší podíl tvořily geny s přímou účastí ve vrozené obranyschopnosti proti mikroorganismům nebo s imunitou související (23) a geny související s morfogenezí (10). Další indukované geny byly např. z oblastí nervové soustavy, cytoskeletu či metabolismu (nepublikovaná data).

1.2. Imunita *Drosophila melanogaster*

Narozdíl od savců včetně člověka hmyz postrádá tzv. získanou imunitu, která funguje na principu tvorby specifických protilátek v reakci na napadení konkrétním patogenem. Oproti získané imunitě je vrozená imunita méně specifická a vyskytuje se u všech mnohobuněčných organismů. Její regulace vykazuje značnou evoluční konzervovanost, díky čemuž je drozofila vhodným modelovým organismem pro studium lidské vrozené imunity (De Gregorio et al. 2002)

Obrana drozofily před napadením mikroorganismy začíná bariérami bránícími vstupu patogenů do jejího těla. Těmi se rozumí kutikula kryjící tělo a chitinové membrány vystylající tracheje a trávicí soustavu, v níž je navíc udržováno nízké pH, které spolu s lysozomy tvoří extrémně nepříznivé prostředí pro mikroby (Tzou et al. 2002). Někdy však ani tato prevence není dostatečná a patogen se podaří proniknout do těla. V takovém případě dojde k aktivaci obranných mechanismů vrozené imunity. Jedním z nich je proteolytickými kaskádami zprostředkované srážení hemolymfy a melanizace. Dále jde o buněčnou odpověď sestávající z fagocytózy a enkapsulizace patogenů rozličnými typy hemocytů. V neposlední řadě pak vrozená imunita zahrnuje systémovou odpověď spočívající v syntéze tzv. antimikrobiálních peptidů (AMP), zejména v tukovém tělese, a jejich uvolnění do hemolymfy (Tzou et al. 2002).

Okamžitě po narušení hostitelské kutikuly nastává srážení hemolymfy a syntéza pro mikroorganismy toxického melaninu, následovaná produkcí volných radikálů. Cílem těchto procesů je zabránit šíření patogenů z místa poranění dále do organismu (Tzou et al. 2002).

V úzké spolupráci se srážením hemolymfy působí hemocyty. Dělíme je na plazmatocyty, lamelocyty a krystalové buňky. Plazmatocytů nalezneme v hemolymfě nejvíce a jejich úlohou je fagocytóza mikroorganismů a jiných cizorodých částic. Lamelocyty mají za úkol enkapsulizaci patogenů, které jsou příliš velké než aby mohly být fagocytovány, a krystalové buňky se podílejí na tvorbě melaninu (Tzou et al. 2002).

Nejlépe poznaným imunitním mechanismem drozofily je syntéza AMP. *Drosophila melanogaster* má přinejmenším 34 AMP rozdělených do 8 rodin, z nichž některé mají široké spektrum cílových organismů, které zabíjejí, a jiné jsou specializované jen na určitý druh patogenů, např. Gram pozitivní bakterie či houby (Hultmark 2003). Expresí těchto AMP je regulována dvěma signálními drahami – Toll a immune deficiency (Imd) (Aggarwal and Silverman 2008). Zatímco dráha Toll zprostředkovává reakci na napadení houbami a většinou Gram pozitivních bakterií, dráha Imd řídí odpověď na infekci Gram negativními

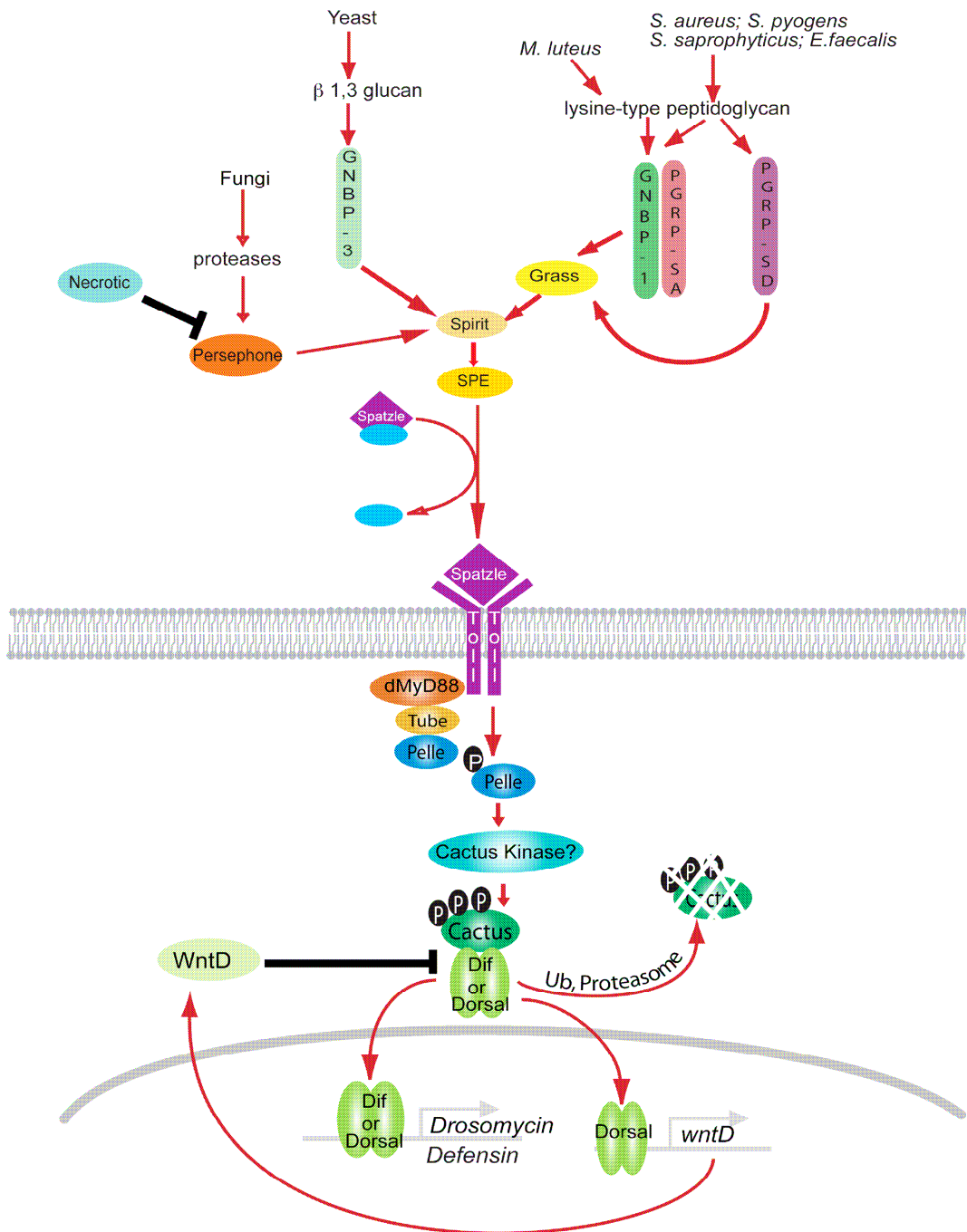
bakteriemi a některými Gram pozitivními. Dráhy Toll a Imd jsou nezávislé, ale existuje mezi nimi určitá interakce – dvojití mutanti s poškozením drah Imd i Toll jsou vůči napadení Gram negativními bakteriemi citlivější než drozofily, které mají poškozenou jen dráhu Imd (Tzou et al. 2002, De Gregorio et al. 2002). Dráha Toll má navíc kromě imunitní funkce úlohu i ve vytváření dorzoventrální polarita v raném embryu (Aggarwal and Silverman 2008).

Protein Toll, po němž je signální dráha (Obr. 1) pojmenována, je transmembránový receptor, který však nemá funkci rozpoznávání peptidoglykanů, nýbrž je aktivován cytokinem Spätzle. Ten je zase aktivován rozštěpením proteázou „Spätzle-processing enzyme“ (SPE). SPE je však rovněž nutno aktivovat proteolýzou, a to enzymem Serine „Protease Immune Response Integrator“ (Spirit). Ke Spirit vedou tři různé cesty od proteinů rozpoznávajících patogen – cesta z proteinů zaznamenávajících napadení Gram pozitivními bakteriemi aktivující Spirit proteázou Grass, cesta přes proteázu Persephone aktivovanou entomopatogenními plísněmi a konečně přímá aktivace receptorem GNBP3, který reaguje na přítomnost kvasinek. Nastane-li aktivace Spätzle signálem z alespoň jedné z větví této kaskády, naváže se na Toll a způsobí jeho dimerizaci. Dimer receptoru Toll spustí vnitrobuněčnou kaskádu vedoucí k degradaci proteinu Cactus, který poutá transkripční faktory „Dorsal-related immunity factor“ (DIF) a Dorsal. Tyto transkripční faktory se po uvolnění translokují do jádra, kde nasedají na DNA a umožní transkripci určitých AMP (Aggarwal and Silverman 2008).

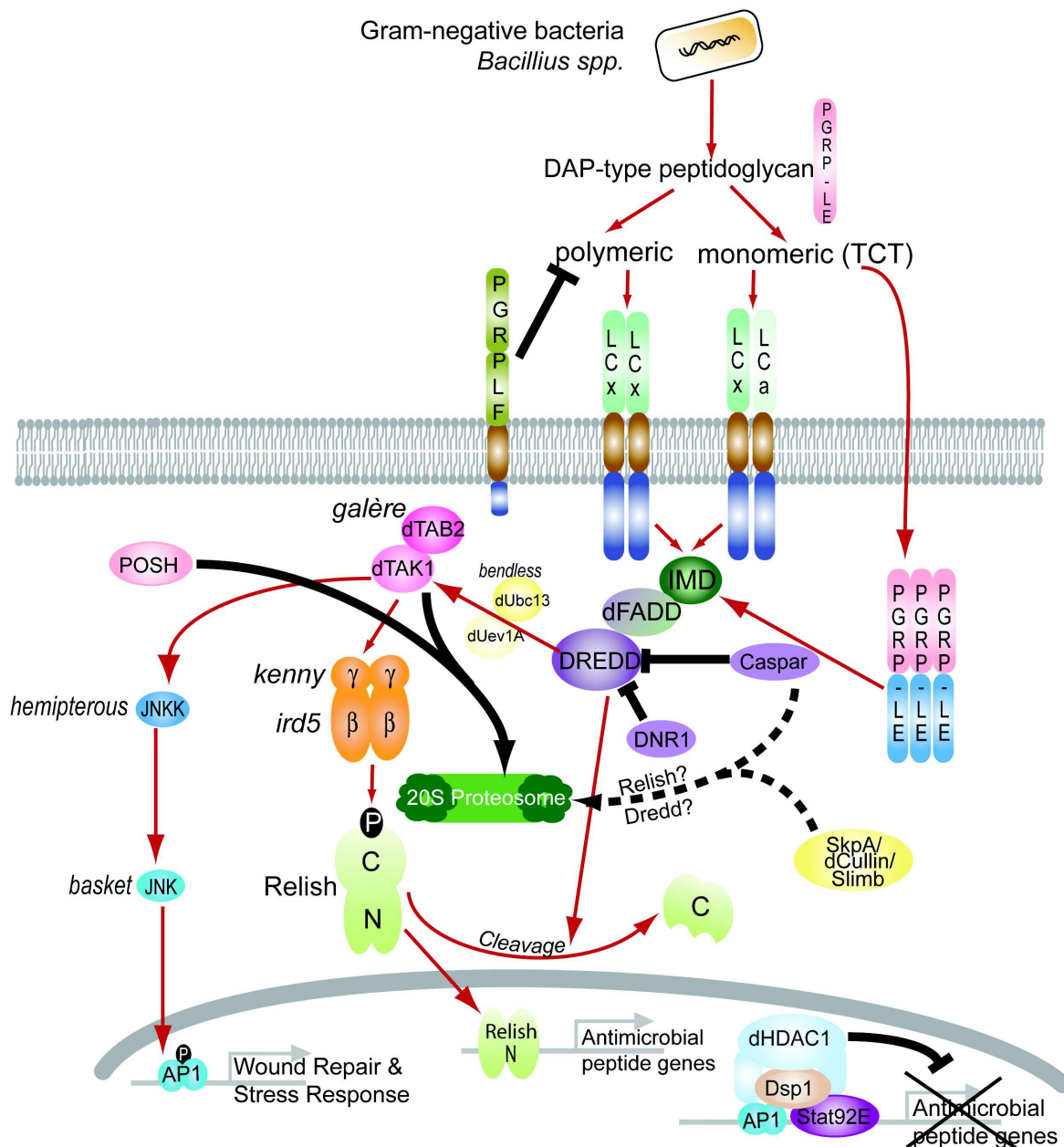
Dráha Imd (Obr. 2) začíná některými druhy proteinů rozpoznávajících evolučně konzervované peptidoglykany z buněčných stěn bakterií (PGRP) (jiné se zapojují na počátku dráhy Toll), což jsou převážně membránové receptory. Tyto receptorové proteiny utvoří po navázání patogenového ligandu oligomery, které aktivují protein Imd, jenž dal jméno celé dráze. Aktivovaný Imd spustí vnitrobuněčnou kaskádu vedoucí buď ke spuštění dráhy „Jun-N-terminal Kinase“ (JNK), která řídí hojení ran a odpověď na stres, nebo k proteolytické aktivaci proteinu Relish, po níž jeho N-koncová doména putuje do jádra, kde spustí transkripci genů kódujících AMP (Aggarwal and Silverman 2008).

Jak již bylo zmíněno, patogen je rozeznáván pomocí tzv. „Pattern Recognition Receptors“ (PRR), které vážou ligandy typické pro mikroorganismy. PRR dělíme do dvou rodin: „Gram-negative Binding Proteins“ (GNBP) a „Peptidoglycan Recognition Proteins“ (PGRP). PGRP jsou velmi konzervované a mají společnou tzv. PGRP doménu. Tato doména má ale dvě odlišné podoby, které dělí PGRP do dvou skupin. První skupině v PGRP doméně chybí aminokyselinové zbytky vázající zinek, což jejím členům znemožňuje amidázovou

aktivitu. Do této skupina řadíme PGRP-SA, SD, LA, LC, LD, LE a LF. Druhá skupina PGRP má díky zinek vázajícím aminokyselinovým zbytkům amidázovou aktivitu a patří do ní PGRP-SC1, LB, SB1 a pravděpodobně i PGRP-SC2 a SB2 (Lemaitre and Hoffmann 2007).



Obr. 1: Signální dráha Toll. Signál z různých proteinů rozeznávajících patogen aktivuje Spirit, který aktivuje SPE. SPE rozštěpí Spätzle, a ten nasedne na receptor Toll, který odstartuje vnitrobuňčnou kaskádu vedoucí k degradaci Cactus. Tím jsou uvolněny transkripční faktory Dif a Dorsal a může začít transkripce genů kódujících AMP (Aggarwal and Silverman 2008).



Obr. 2: Signální dráha Imd. Patogen je rozpoznán PGRP, které aktivují Imd. Ten stojí na začátku vnitrobuněčné kaskády vedoucí buď k aktivaci dráhy JNK nebo k proteolytické aktivaci Relish. Jeho N-koncová doména pak putuje do jádra a zprostředkuje transkripci genů pro AMP (Aggarwal and Silverman 2008).

1.3. Inzulínová signální dráha

Inzulínová dráha je evolučně velmi konzervovaná, což se kromě sekvenční podobnosti jejích členů projevuje i tím, že drozofilí inzulínový receptor reaguje i na savčí inzulín, přestože u drozofily je inzulín nahrazen tzv. Insulin-like peptides (ILP), jichž je v současné době známo osm (Fernandez et al. 1995, Reyes-DelaTorre 2012). Kromě její dlouho známé úlohy v metabolismu živin hraje roli i v řadě jiných klíčových procesů jako jsou například dělení a růst buněk, reprodukce nebo stárnutí (Claeys et al. 2002).

Proteinem spouštějícím inzulínovou signální dráhu (Obr. 3) je Inzulínový receptor (InR). Nachází se na cytoplazmatické membráně a je tvořen dvěma podjednotkami α a dvěma podjednotkami β . ILP se váží na podjednotky α , které jsou lokalizovány na vnější straně membrány. Po navázání ILP následuje dimerizace receptoru a vzájemná fosforylace podjednotek β na aminokyselině tyrosinu (Kahn and White 1988). Takto aktivovaná forma inzulínového receptoru pak je schopna fosforylovat tyrosinové zbytky tzv. substrátů inzulínového receptoru (IRS), které se u *Drosophila melanogaster* nazývají Chico a Lnk (Fernandez et al. 1995, Reyes-DelaTorre 2012). Odtud vede signál dále k fosfatidylinositol-3 kináze (PI3K), která z fosfatidylinositolu 4,5-bisfosfátu (PI(4,5)P₂) tvoří fosforylací fosfatidylinositol 3,4,5-trisfosfát (PI(3,4,5)P₃), který je druhým poslem a dá signál k fosforylaci proteinkinázy B (Akt/PKB) pomocí PIP₃ dependentní kinázy 1 (Eleftherianos and Castillo 2012, Reyes-DelaTorre 2012). Takto aktivovaná Akt/PKB fosforyluje celou řadu substrátů, jako jsou „Glycogen Synthase Kinase 3 β “ (GSK-3 β nebo též Shaggy), „Tuberous Sclerosis Complex 2 Protein“ (Tsc2 či Gigas), „Salt-inducible Kinase 2“ (SIK2) nebo transkripční faktor „Forkhead Box O“ (FOXO) (Reyes-DelaTorre 2012).

U GSK-3 β a SIK2 působí fosforylace Akt/PKB aktivačně (Obr. 3). Aktivovaná GSK-3 β fosforyluje glykogen syntázu a inhibuje tak tvorbu glykogenu (Reyes-DelaTorre 2012). Oproti tomu SIK2 fosforylací inaktivuje transkripční koaktivátor TORC a tím mu zabrání aktivovat transkripční faktor „cAMP Response Element-binding Protein“ (CREB), který je nezbytný v embryonálním vývoji (Reyes-DelaTorre 2012, Rose et al 1997).

Fosforylace proteinu FOXO prostřednictvím Akt/PKB (Obr. 3) naopak zapříčiní jeho zadržení v cytoplazmě a tím inhibici transkripce jím pozitivně regulovaných genů, jako jsou mimo jiné inhibitor iniciace translace „4E-binding protein“ (4E-BP) nebo InR, jehož exprese je takto regulována negativní zpětnou vazbou. To znamená, že při hladovění organismu a tím pádem nízké koncentraci ILP roste koncentrace InR a tedy i citlivost buňky vůči inzulínové signalizaci, zatímco při zvýšení koncentrace ILP je exprese InR utlumena a snižuje se citlivost buňky k nim. Tato zpětná vazba umožňuje rychlejší reakci organismu na změny množství živin (Puig and Tjian 2005).

Tsc2 propojuje inzulínovou signální dráhu s dráhou TOR (Obr. 3). Je inhibován fosforylací od Akt/PKB a nemůže tak vykonávat svou přirozenou funkci inhibitoru GTPázy Rheb, která tím pádem může aktivovat „Target of Rapamycin Complex 1“ (TOR-C1), jehož součástí je kináza „Target of Rapamycin“ (TOR), která je ústředním anabolickým regulátorem a zasahuje do mnoha oblastí metabolismu. Mezi substráty, které TORC1

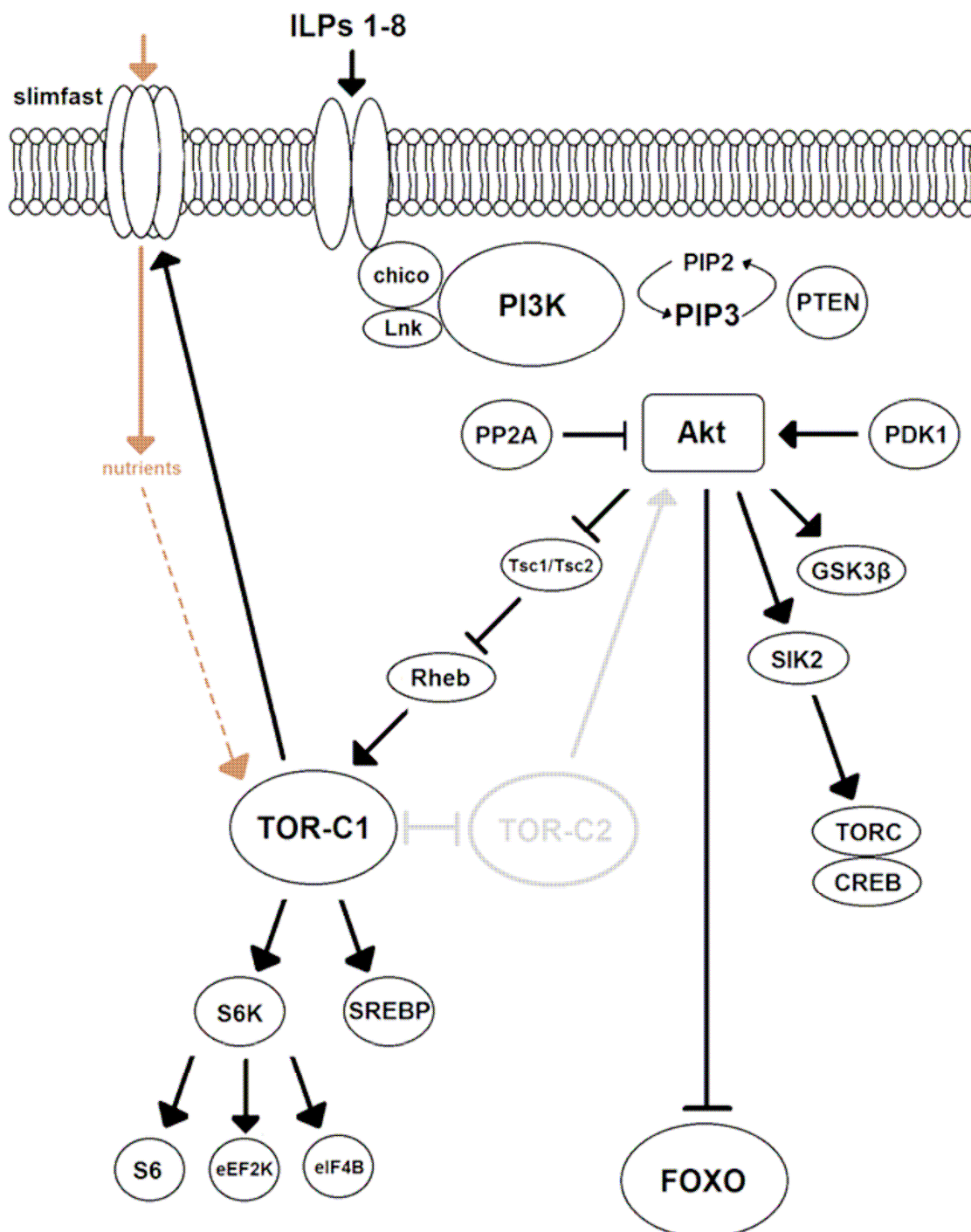
fosforyluje jsou transkripční faktor „Sterol Regulatory Element Binding Protein“ (SREBP), regulující transkripci genů zapojených v syntéze sterolu, a ribozomální S6 kináza, která reguluje proteiny zapojené v translaci (Reyes-DelaTorre 2012). Dalším cílovým proteinem TOR je 4E-BP, jehož exprese je řízena FOXO a tedy rovněž závislá na signálu z InR. V hypofosforylovaném stavu je 4E-BP navázán na protein eIF4E, který je součástí translaci iniciujícího komplexu eIF4F. Díky fosforylaci pomocí TOR a dalších kináz se 4E-BP disociuje a umožní tak translaci (Lasko and Sonenberg 2007).

Kromě dráhy TOR je inzulínová dráha propojená i s dalšími signálními dráhami. Jednou z nich je dráha Ras/MAPK, která řídí proliferaci buněk. V regulaci Ras/MAPK inzulínovou dráhou je zřejmě nezbytný signál druhého posla PIP₃. Mutanti v genu *Chico* totiž vykazují redukci velikosti jen v případě, že je mutací postižena doména p60, která je zodpovědná za aktivaci PI3K. Navíc mutace v tumor supresorovém genu *Pten*, který kóduje enzym působící proti PI3K, dokáže snížit efekt mutací *PI3K*, které, stejně jako mutace *Chico*, způsobují menší velikost jedince. I drozofily s jinak embryonálně letální mutací *InR* je touto mutací možné zachránit. Sama o sobě pak má za následek větší velikost mutantů (Oldham et al. 2002).

Další dráhou, která interaguje s kaskádou signalizace ILP je JNK, která zajišťuje reakci organismu na stres. Aktivovaná dráha JNK působí proti efektům inzulínové dráhy a to jak na buněčné, tak na systémové úrovni. Na buněčné úrovni aktivovaná JNK zprostředkovává inhibiční fosforylaci proteinů negativně regulujících FOXO čímž dojde k inhibici buněčného růstu larválních tukových těles a ke změně citlivosti buněk vůči ILP. Na systémové úrovni pak JNK snižuje expresi ILP2 v mediálních neurosekrečních buňkách, čímž ovlivňuje signalizaci přes InR v celém organismu (Biteau et al. 2011).

Nejnovější výzkumy dokonce naznačují interakci inzulínové dráhy i s tumor-supresorovou dráhou Salvador-Warts-Hippo. Snížení exprese genu *Warts* stejně jako nadměrná exprese *InR* v trachejích larvy totiž při hypoxii působí jejich četnější větvení, čímž zabraňují přirozenému omezení růstu larvy při nedostatku kyslíku (Wong et al. 2014). Autoři této práce navrhují model, podle něhož zesílení signalizace ILP dosud neznámým mechanismem inhibuje dráhu Salvador-Warts-Hippo, což má za následek stimulaci proliferace buněk. Tato dráha je velice významným regulátorem proliferace buněk. Po obdržení signálu k inhibici proliferace komplex Hippo-Salvador fosforylačně aktivuje komplex Warts-Mats, který fosforylací naopak inhibuje transkripční koaktivátor Yorkie, který tak nemůže zprostředkovat transkripci genů pro buněčnou proliferaci a inhibici apoptózy (Edgar 2006).

Kromě výše uvedených má inzulinová dráha ještě mnoho dalších cílů a regulátorů. Spolu s přidruženými dráhami tvoří nesmírně komplexní systém aktivací, inhibicí a zpětných vazeb, který je důležitý pro regulaci mnoha zásadních procesů jak na úrovni buňky, tak na úrovni celého organismu.



Obr. 3: Zjednodušené schéma inzulinové signální dráhy. InR po přijetí signálu ILP fosforyluje Chico a Lnk, které vedou signál k PI3K. PI3K fosforyluje PIP2 na PIP3, což je signálem pro aktivaci Akt/PKB. Aktivovaná Akt/PKB fosforylací aktivuje GSK-3 β a SIK2 a inhibuje FOXO a Tsc2. Inhibice Tsc2 pak vede k aktivaci signální dráhy TOR, která reguluje transkripci genů zapojených v syntéze sterolu a translaci (Reyes-DelaTorre 2012).

2. Cíle práce

- a) Zvládnutí metod izolace RNA, reverzní transkripce a kvantitativní PCR
- b) Změření vlivu proteinu IDGF2 na expresi genů vybraných ze skupiny kandidátů, kteří byli v dřívější práci laboratoře odhaleni pomocí expresních čipů.

3. Materiály a metody

3.1. Pokusné organismy

Adherentní buněčná linie Cl.8+ odvozená z buněk imaginálního terčku *Drosophila melanogaster* (Currie et al. 1988)

3.2. Aplikace proteinu IDGF2 na buňky

Obdržela jsem vzorky buněk Cl.8+ v kompletním médiu, které byly 1,5 hodiny inkubovány při teplotě 25 °C s proteinem IDGF2 o koncentraci 30 µg/1 ml média. Jako kontrola posloužily buňky Cl.8+ inkubované za stejných podmínek s roztokem PBS.

3.3. Izolace RNA

Po odstranění média jsem lyzovala a zafixovala buňky pomocí 800 µl reagentu pro izolaci RNA „Ribozol™“ (AMRESCO), a zmrazila v –20 °C pro pozdější izolaci. Poté jsem dále postupovala podle návodu výrobce až k získání vodného roztoku RNA, který jsem pro dosažení lepší čistoty vzorku a zamezení kontaminaci genomovou DNA přečistila pomocí purifikačního sloupečku, chemikálií a DNázy z kitu pro izolaci RNA „NucleoSpin® RNA“ (MACHEREY-NAGEL). Množství vyizolované RNA jsem určila spektrofotometricky pomocí „nanodropu“ (Thermo Scientific) a uskladnila ji v teplotě –80 °C.

3.4. Reverzní transkripce

Složení reakční směsi: 1 µg RNA, 4 µl dNTP směsi (2,5 mM) (TaKaRa), 4 µl pufru 5× PSRT Buffer (TaKaRa), 0,5 µl primeru oligo dT (Generi Biotech), 0,5 µl inhibitoru RNáz RR I (TaKaRa), 0,5 µl reverzní transkriptázy PrimeScript (TaKaRa) a DEPC H₂O pro doplnění objemu reakce na výsledných 20 µl.

Příprava směsi a reakce: Ke vzorkům RNA jsem přidala příslušný objem DEPC H₂O, směs nukleotidů a primer oligo dT. Směs jsem umístila do termocykleru (Biometra) inkubovat 5 minut při 65 °C, aby byly odstraněny sekundární struktury RNA. Posléze jsem směs prudce zchladila na ledu a přidala k ní enzymy RR I a PrimeScript a 5× PSRT „Buffer“. Následně jsem nechala směs inkubovat v termocykleru 50 minut při 42 °C a nakonec nechala inaktivovat enzymy 15 minut při teplotě 72 °C.

3.5. Ředění vzorků cDNA

Vzorky cDNA z reverzní transkripce jsem ředila autoklávovanou ddH₂O 10×, 50× a 250× pro vytvoření ředící křivky nutné pro stanovení procentuální úspěšnosti reakce kvantitativní PCR. 250× ředěný vzorek jsem při tvorbě ředící křivky pro každou novou sadu primerů připravovala čerstvý, aby se snížilo zkreslení výsledku způsobené degradací vzorku

při opakovaném zmrazování a rozmrazování, která je zvláště patrná u silně zředěné DNA. Pro stanovení množství transkriptu jsem používala 50× ředěné vzorky.

3.6. Navrhování primerů

K navrhování primerů jsem používala program PrimerSelect (DNASTAR® Lasergene). Volila jsem délku 17-22 bp a teplotu tání primerů pokud možno v rozmezí 50-52 °C, aby při 60 °C nasedaly co nejspecifičtěji. Amplifikovaný úsek jsem pak vybírala tak, aby jeho délka byla v rozmezí 80-180 bp a zároveň, aby byl pokud možno na úrovni genomové DNA rozdělen intronem (Tab. 1). Některé z primerů, které jsem používala, již byly navrženy dříve, a tudíž jsem pro tyto geny nové primery nenavrhovala (Tab. 2).

Tab. 1: Přehled mnou navrhovaných primerů. U genu *Gpdh* se nepodařilo najít vhodnou dvojici primerů, která by amplifikovala úsek rozdělený intronem. Geny *Rel* a *CG13482* nemají introny. U primerů, které nasedají na sekvenci, která je v genomové DNA přerušena intronem, je místo intronu značeno symbolem //.

CG	Název genu, symbol	Sekvence primerů	Úsek na cDNA	Intron
1322	Zn finger homeodomain, Zfh1	Fw: 5' ATCCCGATCTGCCCTATG 3' Rv: 5' GCCTTCGGACACTCTATGC 3'	124 bp	68 bp
6725	Sulfated, Sulf1	Fw: 5' CGGCGACACCAGAATCAC 3' Rv: 5' GCCCGCGAGAGGAG//AGT 3'	102 bp	63 bp
7635	Mec2	Fw: 5' GCCGAGGGTGAGAAGAAGT 3' Rv: 5' ATGGGCAGAGGAAAGATAATG 3'	149 bp	79 bp
8046	-	Fw: 5' ATGAGCGCG//GCAAAATC 3' Rv: 5' AAAATCCCCGGTTCAGTGTT 3'	118 bp	67 bp
9042	Glycerol 3 phosphate dehydrogenase, Gpdh	Fw: 5' ACTTCCGCGTGGTGGTC 3' Rv: 5' AGCCGCCTTGGTGTTGT 3'	125 bp	-
11992	Relish, Rel	Fw: 5' CTATGTGGCGCAATTTATCAAC 3' Rv: 5' TGGCCTCACGCTCTGTCTC 3'	167 bp	-
13482	-	Fw: 5' GCCTGAATTTGGGTGGAG 3' Rv: 5' GGAGGCGGTGGGTGATA 3'	82 bp	-
17090	homeodomain interacting protein kinase, hipk	Fw: 5' AGTCGCCGGCTCATCATA 3' Rv: 5' CCTTCACCCGCTTCTTCAC 3'	102 bp	68 bp

Tab. 2: Přehled již hotových primerů. Geny *CecA1* a *AttA* nejsou amplifikovány přes intron, gen *PGRP-SD* nemá introny. U primerů, které nasedají na sekvenci, která je v genomové DNA přerušena intronem, je místo intronu značeno symbolem //.

CG	Název genu, symbol	Sekvence primerů	Úsek na cDNA	Intron
1365	Cecropin A1, CecA1	Fw: 5'CTTCGTTTTTCGTCGCTCTC Rv: 5'TTTTCTTGCCAATTTTCTTCAG	80 bp	-
4740	Attacin-C, AttC	Fw: 5'GGCAACACGCAGACCAA 3' Rv: 5'GAAGCTATCCCGCACACC 3'	123 bp	64 bp
7111	Receptor of activated protein kinase C 1, Rack1	Fw: 5'CCCGTG//ACAAGACCCTGAT 3' Rv: 5'TAGTTGCCATCGGAGGAGAG 3'	130 bp	79 bp
7496	Peptidoglycan recognition protein SD, PGRP-SD	Fw: 5'AGCTTGTGCGGATGATGTTA 3' Rv: 5'CTTGACTTCTGCCTTCGTAT 3'	141 bp	-
7629	Attacin-D, AttD	Fw: 5'CGGAGTAAGGGTCGGTGAT 3' Rv: 5'GCCATGCTGCAGTGAGAGT 3'	139 bp	77 bp
7939	Ribosomal protein L32 (rp49), RpL32	Fw: 5'CTTCATCCGCCACCAGTC 3' Rv: 5'GGCGACGCACTCTGTTGT 3'	98 bp	50 bp
10146	Attacin-A, AttA	Fw: 5'TGGTCATGGTGCCTCTTTG 3' Rv: 5'GATTGTGTCTGCCATTGTTGA 3'	101 bp	-
14704	Peptidoglycan recognition protein LB, PGRP-LB	Fw: 5'GGCGATGGCATGATTTACA 3' Rv: 5'GCGGCAGTTCGG//TTCTC 3'	118 bp	152 bp

Primery byly navrhovány převážně pro geny, které byly u buněk Cl.8+ indukovány působením proteinu IDGF2 podle výsledků z dříve prováděné analýzy expresními čipy. Pouze u genu *Gpdh* nebyla na čípech prokázána změna exprese.

3.7. Kvantitativní PCR

Jako referenční geny s expresí nezávislou na působení proteinu IDGF2 jsem použila receptor aktivované protein kinázy C 1, *Rack1*, a ribozomální protein L32, známý též jako *rp49*.

Složení reakční směsi: 5 μ l vzorku cDNA, 4 μ l směsi 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) (Solis BioDyne), 1 μ l primeru forward (10 μ M), 1 μ l primeru reverse (10 μ M) a autoklávovaná ddH₂O pro doplnění objemu reakce na 20 μ l. Kvůli zvýšení úspěšnosti reakce u dosud nevyzkoušených sad primerů jsem používala poměrně vysoké koncentrace primerů. U již vyzkoušeného referenčního genu *Rack1* jsem objem každého z použitých primerů snížila na 0,5 μ l. U referenčního genu *rp49*, který byl rovněž již vyzkoušen, jsem použila od každého primeru 0,75 μ l.

Příprava reakce: Na míchání reakční směsi jsem pro co nejlepší přesnost používala elektronické pipety (Eppendorf) a „low binding“ špičky. Abych zamezila případné kontaminaci lidskou DNA, používala jsem při míchání reakce rukavice. Pro reakce jsem používala 48-jamkové destičky (Illumina) kompatibilní s přístrojem „Eco Real-Time PCR System“ (Illumina).

Program reakce kvantitativní PCR: Amplifikaci předcházelo 15 minut aktivace polymerázy při 95 °C. Amplifikace samotná probíhala ve 40 cyklech při teplotách 95 °C na 15 s, 60 °C na 30 s a 72 °C na 20 s, v nichž byla vždy na konci fáze amplifikace změřena hladina fluorescence. Po dokončení amplifikace pak byly vzorky inkubovány 15 s při 95 °C, 15 s při 55 °C a 15 s při 95 °C pro sestrojení křivky tání, přičemž byla během pomalého nárůstu teploty z 55 °C na 95 °C snímána úroveň fluorescence v jednotlivých jamkách.

3.8. Kontrola délky amplifikovaných úseků na gelu

Délku úseků DNA amplifikovaných v reakci kvantitativní PCR jsem kontrolovala gelovou elektroforézou prováděnou v TAE pufru na 1,5% agarózovém gelu barveném pomocí ethidium bromidu. Ke stanovení velikosti fragmentů jsem použila „size marker“ GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Pro sady primerů, kde v kvantitativní PCR měly všechny jamky ze 48-jamkové destičky stejnou křivku tání, jsem vybrala pro kontrolu pouze jednu. U genů, u nichž křivka tání v jedné nebo více jamkách destičky vykazovala abnormální tvar, jsem gelovou elektroforézou kontrolovala jeden vzorek s předpokládaným správným průběhem reakce a alespoň jeden z abnormálních vzorků. Délku fragmentů zjištěnou elektroforézou jsem pak porovnávala s teoretickou délkou podle umístění primerů.

3.9. Analýza dat

Pro každý vzorek jsem prováděla kvantitativní PCR reakci ve třech opakováních. Pokud se v triplicátu jedna z jamek výrazně lišila (standardní odchylka > 0,5) od ostatních dvou

hodnotou Ct, tedy cyklem, ve kterém hladina fluorescence přesáhla prahovou hodnotu, nebo měla-li odlišnou křivku tání, byla vyloučena ze statistiky.

Pro výpočet změny exprese jsem použila vzorec s korekcí rozdílu úspěšnosti reakce mezi zkoumaným (target) a referenčním (ref) genem (Vzorec 1). Hodnota r udává relativní množství kopií zkoumaného genu vůči genu referenčnímu a koriguje rozdíly v koncentraci cDNA, vzniklé nepřesností pipetování při reverzní transkripci a ředění vzorků. Hodnota úspěšnosti reakce (E) je určena jako zlomkem vyjádřená úspěšnost reakce + 1.

$$r = \frac{E_{ref}^{Ct_{ref}}}{E_{target}^{Ct_{target}}} \quad (1)$$

Následně jsem určila průměr z hodnot r pro oba referenční geny a porovnávala tyto průměrné hodnoty mezi vzorkem z buněk ošetřených proteinem IDGF2 a kontrolním vzorkem.

Pro určení, zda je zjištěná změna exprese průkazná či nikoliv, jsem použila T-test. U většiny genů (kromě *Gpdh*) jsem mohla použít silnější jednostranný T-test, protože jsem u nich měla k dispozici data z analýzy expresními čipy a byla očekávána pozitivní změna. Protože izolace a reverzní transkripce u třech opakování pokusu nebyly prováděny najednou, použila jsem párovou variantu T-testu.

4. Výsledky

4.1. Izolace RNA a příprava cDNA

Vyizolovala jsem RNA z proteinem ošetřeného (IDGF2) a kontrolního (K) vzorku a změřila její koncentraci a určila čistotu. Žádný ze získaných vzorků neměl příliš nízkou koncentraci, která by naznačovala možnou výraznější degradaci, což by mohlo mít za následek zkreslení výsledků. Poměr absorbance záření o vlnových délkách 260 a 280 nm u žádného ze vzorků nenavědčoval možnému znečištění genomovou DNA nebo proteiny. Výtěžky z izolací a poměry absorbance v 260 a 280 nm jsou zaneseny v tabulce 3.

Tab. 3: Výtěžky ze tří izolací RNA

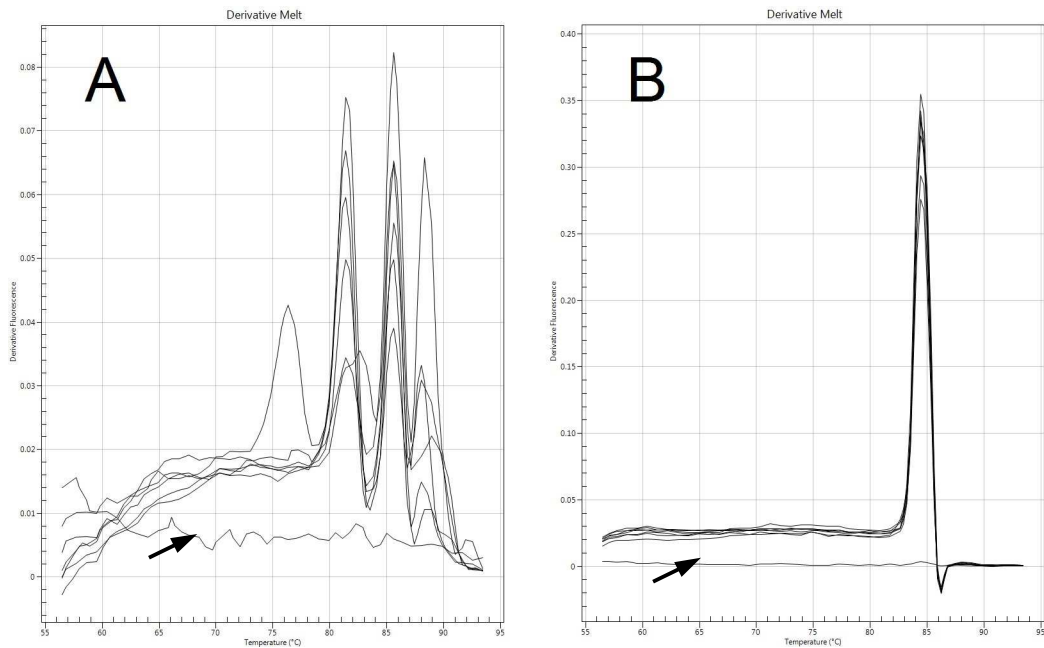
Izolace	Vzorek	Koncentrace vzorku [ng/μl]	$A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$
1.	K	423,2	2,24
	IDGF2	358,9	2,22
2.	K	640,8	2,18
	IDGF2	469,8	2,17
3.	K	674,1	2,25
	IDGF2	619,9	2,24

Po izolaci RNA jsem reverzní transkripcí připravila cDNA a naředila ji způsobem popsaným v kapitole 3.

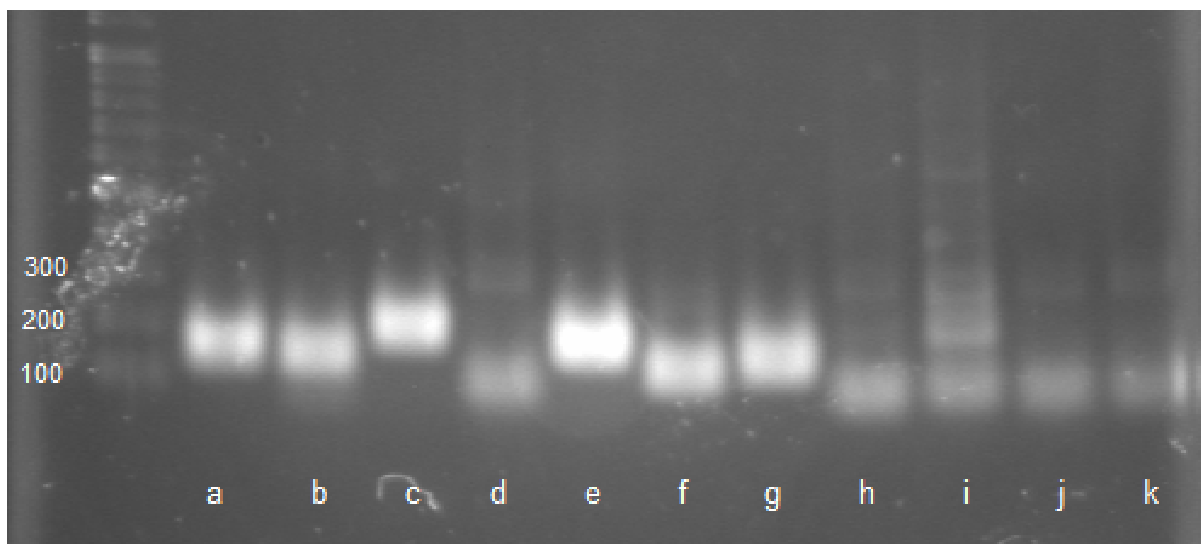
4.2. Kvantitativní PCR a kontrola správného průběhu reakce

Provedla jsem reakci kvantitativní PCR se všemi vzorky pro celkem 14 zkoumaných genů a dva referenční. S primery pro gen *CGI3482* se nepodařilo dosáhnout amplifikace správného specifického produktu. Křivky tání se u tohoto genu lišily mezi jednotlivými jamkami na 48-jamkové destičce a měly více vrcholů, což znamená více produktů (Obr. 4A). I na gelu bylo vidět více proužků (Obr. 5d, 5h-k). Kvůli velmi krátké sekvenci tohoto genu nebylo možné navrhnout primery na jiném úseku.

U ostatních sad primerů vznikaly specifické fragmenty o správné velikosti. Specifita produktu je vidět na křivkách tání, které jsou pro všechny jamky na destičce stejné a mají vždy pouze jeden vrchol (Příklad na Obr. 4B). Správnou velikost amplifikovaných úseků pak potvrdila gelová elektroforéza (Příklady na Obr. 5a-c, 5e-g). Přestože rozdíly v řádu jednotlivých bází nejsou na gelu příliš výrazné, je možné rozlišit rozdíly v délkách různých amplifikovaných úseků, které poměrně odpovídají rozdílům v předpokládaných délkách.



Obr. 4: Křivky tání produktu kvantitativní PCR. Vodorovná osa ukazuje teplotu, zatímco svislá ukazuje změnu intenzity fluorescence. Každá křivka reprezentuje jednu jamku na 48-jamkové destičce. Šipky ukazují negativní kontrolu (reakční směs bez templátu). (A) Sada primerů pro gen *CG13482* (2. izolace). Křivky tání mají více vrcholů a liší se mezi jednotlivými jamkami. (B) Sada primerů pro gen *PGRP-SD* (1. izolace) jako příklad správného průběhu reakce. Křivka tání je ve všech jamkách stejná a má pouze jeden vrchol.



Obr. 5: Gelová elektroforéza DNA amplifikované při kvantitativní PCR. (a) Sada primerů pro gen *Rack1* (1. izolace, 130 bp)., (b) *Gpdh* (1. izolace, 125 bp)., (c) *Rel* (1. izolace, 167 bp)., (d) *CG13482* (1. izolace, 82 bp). Na gelu je vidět delší vedlejší produkt a také menší množství amplifikovaného fragmentu *CG13482* v porovnání s jinými sadami primerů., (e) *Mec2* (1. izolace, 149 bp)., (f) *Sulf1* (1. izolace, 102 bp)., (g) *CG8046* (1. izolace, 118 bp)., (h-k) *CG13482* (h,i – 2. izolace, j,k - 1. izolace, 82 bp). Na gelu jsou vidět delší vedlejší produkty a také menší množství fragmentu *CG13482* v porovnání s jinými sadami primerů.

4.3. Analýza dat

Hodnoty r u vzorků z různých izolací si nebyly příliš podobné, a to částečně i kvůli referenčním genům, které měly mezi izolacemi rozdílnou expresi, zvláště *Rack1*. Mezi vzorkem z buněk ošetřených proteinem a kontrolou se však exprese referenčního genu v žádné z izolací výrazněji nelišila, směrodatná odchylka mezi vzorky v žádné izolaci a u žádného referenčního genu nepřesáhla 2,5 %. Takové směrodatné odchylky lze vysvětlit rozdílem v koncentraci cDNA vzniklým pipetovací chybou. Navíc jsem nepozorovala žádný trend pozitivního nebo negativního vlivu IDGF2 na expresi referenčních genů, což nasvědčuje tomu, že jejich exprese je na IDGF2 opravdu nezávislá (Tab. 4).

Tab. 4: Přehled Ct hodnot referenčních genů a jejich variability

Izolace	Referenční gen	Vzorek	Průměr Ct triplikátů	SD Ct mezi triplikáty	Průměr Ct K a IDGF2	SD Ct mezi K a IDGF2	% SD
1	rp49	K	17,5538	0,1746	17,8526	0,4227	2,3675
		IDGF2	18,1515	0,0686			
	Rack1	K	17,4579	0,0918	17,5996	0,2004	
		IDGF2	17,7413	0,1007			
2	rp49	K	18,0829	0,0378	18,0829	0,3491	1,9306
		IDGF2	18,5767	0,1667			
	Rack1	K	17,5012	0,0373	17,4432	0,0821	
		IDGF2	17,3851	0,0885			
3	rp49	K	18,5480	0,1001	18,3361	0,2998	1,6349
		IDGF2	18,1241	0,0419			
	Rack1	K	19,3947	0,1471	19,2086	0,2632	
		IDGF2	19,0225	0,0820			

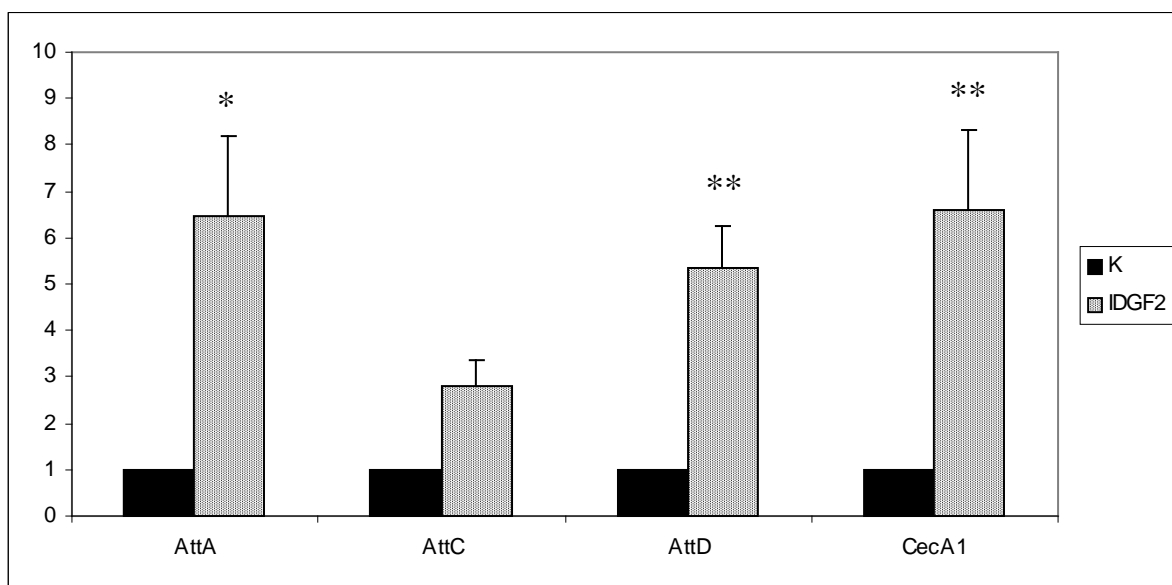
Po vypočítání dílčích hodnot r s každým referenčním genem zvlášť jsem pro každý gen určila výslednou hodnotu r jejich zprůměrováním. Tyto průměrné hodnoty r pro jednotlivé referenční geny jsem použila pro vyhodnocení průkaznosti pomocí T-testu, konkrétně jeho párové varianty, kvůli již zmíněné variabilitě mezi izolacemi. Z téhož důvodu bylo také nutné data normalizovat vůči kontrole ještě před vypočtením průměru a střední chyby průměru. Změny vzorků s IDGF2 oproti kontrole rovněž vykazovaly rozdíly mezi izolacemi, ale téměř vždy byl u všech izolací pozorován pozitivní vliv na expresi daného genu. U sedmi ze zkoumaných genů šlo přitom o průkaznou změnu (Tab. 5).

Tab. 5: Množství zkoumaných genů oproti referenčním genům v jednotlivých izolacích, průměrné množství, střední chyba průměru a průkaznost změny jejich exprese.

Gen	Izolace	r_K	r_{IDGF2}	r_{IDGF2}/r_K	Průměr r_{IDGF2}/r_K	SE r_{IDGF2}/r_K	P
AttA	1	0,03193	0,23930	7,49544	6,45932	1,74068	0,02345
	2	0,02711	0,23913	8,81958			
	3	0,04576	0,14015	3,06295			
AttC	1	0,00056	0,00199	3,52776	2,81405	0,56420	0,05512
	2	0,00052	0,00163	3,21410			
	3	0,00040	0,00068	1,70028			
AttD	1	0,00242	0,01560	6,43599	5,35028	0,90043	0,00811
	2	0,00238	0,01443	6,05173			
	3	0,00706	0,02517	3,56314			
CecA1	1	0,03872	0,26381	6,81404	6,59467	1,71719	0,00519
	2	0,02311	0,21843	9,45319			
	3	0,11008	0,38713	3,51680			
PGRP-LB	1	0,01109	0,02299	2,07258	2,45610	0,21877	0,00628
	2	0,00676	0,01914	2,83023			
	3	0,02150	0,05325	2,46548			
PGRP-SD	1	0,00084	0,00211	2,52401	3,05801	1,18048	0,05424
	2	0,00042	0,00226	5,31668			
	3	0,00118	0,00157	1,33334			
Mec2	1	0,30920	0,41956	1,35691	1,37299	0,22070	0,12317
	2	0,34932	0,61585	1,76303			
	3	0,32329	0,32298	0,99903			
CG8046	1	0,00171	0,00330	1,92845	1,79955	0,22267	0,07283
	2	0,00199	0,00418	2,10427			
	3	0,00066	0,00090	1,36593			
Sulf1	1	0,02860	0,06495	2,27096	1,81225	0,29495	0,06247
	2	0,02860	0,05445	1,90409			
	3	0,02299	0,02900	1,26169			
Gpdh	1	0,09318	0,11023	1,18298	1,15336	0,13851	0,43798
	2	0,13052	0,17973	1,37708			
	3	0,13813	0,12432	0,90001			

hipk	1	0,02624	0,04407	1,67945	1,59779	0,04523	0,04575
	2	0,05191	0,08257	1,59063			
	3	0,01748	0,02663	1,52328			
Zfh1	1	0,05135	0,08278	1,61218	1,33075	0,14848	0,03605
	2	0,10788	0,11953	1,10796			
	3	0,06725	0,08555	1,27209			
Rel	1	0,37349	0,67282	1,80146	1,67980	0,17207	0,04086
	2	0,55570	1,05459	1,89776			
	3	0,47794	0,64053	1,34019			

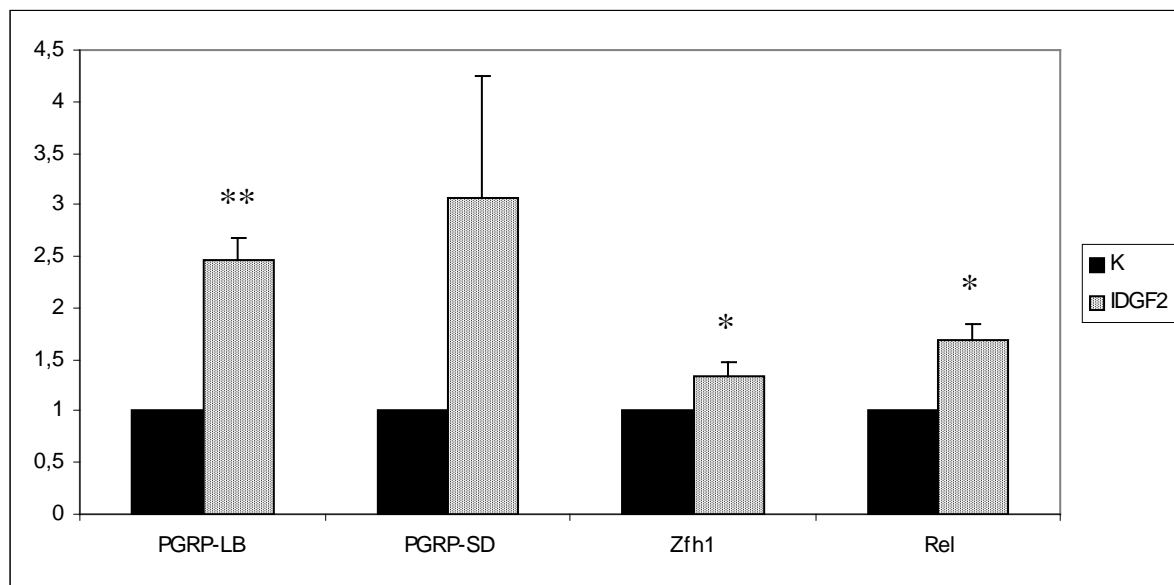
Nejprůkaznějších výsledků jsem dosáhla u imunitních genů. Geny kódující AMP byly proteinem IDGF2 indukovány nejsilněji a u tří ze čtyř zkoumaných bylo zvýšení exprese průkazné ($p < 0,05$), u dvou, *Attacinu D* a *Cecropinu A1*, byla dokonce průkaznost ještě lepší ($p < 0,01$) (Obr. 6). Čtvrtý z nich, *Attacin C*, neprošel kritériem průkaznosti jen těsně (Tab. 5).



Obr. 6: Změny exprese AMP proteinem IDGF2. Geny, jejichž změna exprese byla průkazná s $p < 0,05$ jsou značeny *, geny, jejichž změna exprese byla průkazná s $p < 0,01$ jsou značeny **. Chybové úsečky ukazují střední chybu průměru.

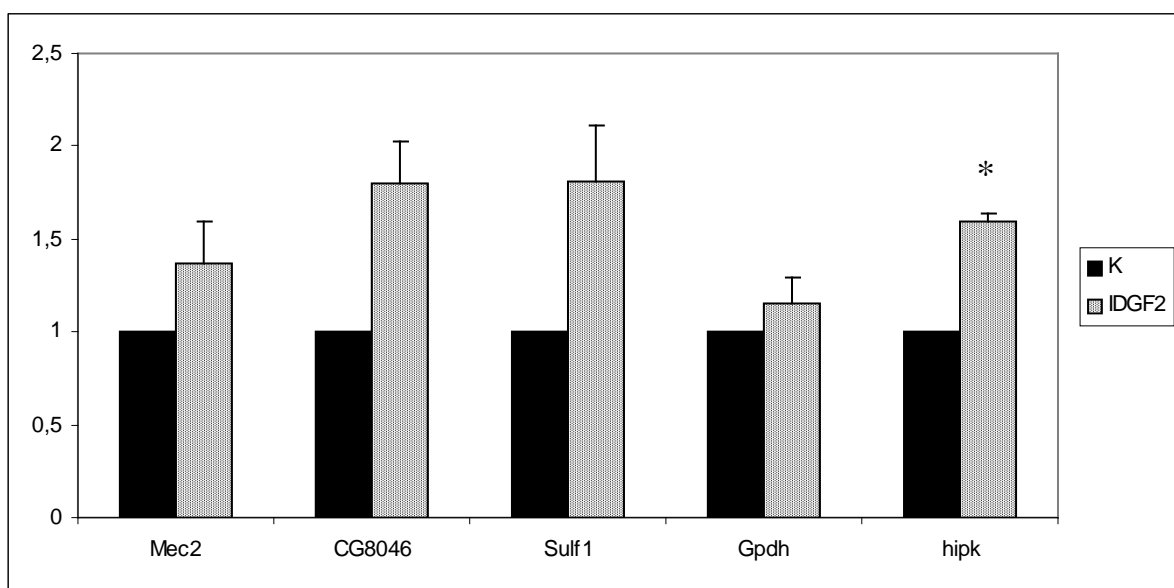
Kromě AMP jsem pozorovala průkazné změny exprese i u jiných genů účastnících se imunitní odpovědi. Poměrně výrazná změna exprese nastala po přidání IDGF2 u proteinů rozeznávajících peptidoglykany, ale jen u *PGRP-LB* byla tato změna průkazná, zato však s $p < 0,01$. Příliš velká variabilita dat u *PGRP-SD* způsobila, že těsně neprošel kritériem

průkaznosti (Tab. 5). U genů *Relish* a *Zfh1* nebyla indukce tolik výrazná, ale u obou byla statisticky průkazná (Obr. 7).



Obr. 7: Změny exprese dalších imunitních genů (nepatřících mezi AMP) působením proteinu IDGF2. Geny, jejichž změna exprese byla průkazná s $p < 0,05$ jsou značeny *, geny, jejichž změna exprese byla průkazná s $p < 0,01$ jsou značeny **. Chybové úsečky ukazují střední chybu průměru.

U ostatních zkoumaných genů se mi podařilo statisticky prokázat změnu exprese jen u jednoho, u *hipk*, který kóduje kinázu aktivující protein Yorkie, jenž podporuje proliferaci (Obr. 8). I v této skupině byly nalezeny neprůkazné geny, které se blížily limitu průkaznosti $p < 0,05$, ale nebyly nad tímto limitem tak těsně, jako ty z řad imunitních genů (Tab. 5).



Obr. 8: Změny exprese neimunitních genů proteinem IDGF2. Geny, jejichž změna exprese byla průkazná s $p < 0,05$ jsou značeny *. Chybové úsečky ukazují střední chybu průměru.

Ze třinácti zkoumaných genů jsem prokázala indukci u sedmi. Ostatní geny vykazovaly příliš vysokou variabilitu dat, ale převážně byl i u nich patrný trend pozitivní regulace prostřednictvím IDGF2. Výjimkou jsou geny *Mec2* a *Gpdh*, u nichž ve vzorku z jedné izolace došlo k mírnému poklesu oproti kontrole (Tab. 5). Zvláště u *Gpdh* se zdá indukce exprese proteinem IDGF2 značně nepravděpodobná, a to kvůli nízkým pozitivním změnám ve zbylých dvou izolacích.

Obecně lze říci, že aplikace proteinu IDGF2 na buňky měla vliv obzvláště na geny související s imunitou, z nichž u většiny došlo k průkaznému zvýšení exprese. U jiných genů je vliv IDGF2 rovněž možný, ale ne vždy průkazný.

5. Diskuse

5.1. Provedení experimentu

Hlavním problémem mé práce bylo, že tři opakování procedury vystavení buněk proteinu IDGF2, izolace RNA a reverzní transkripce nebyla kvůli nedostatečnému množství proteinu prováděna najednou. Buňky z každého opakování se mohly lišit pasáží a kvůli směsí živočišného a kvasinkového původu mohly nastat drobné změny ve složení média. V důsledku toho mohlo mezi opakováními dojít ke změnám v expresi mnoha genů. Geny, které jsem použila jako referenční, mají sice expresi nezávislou na působení proteinu IDGF2, ale ta nemusí být konstantní při některých změnách prostředí, k nimž patrně došlo. Z toho vyplývá problematičnost srovnání poměrů koncentrace transkriptů zkoumaného a referenčního genu mezi jednotlivými izolacemi. Tento problém jsem řešila použitím párového T-testu a normalizací dat vůči kontrole ještě před spočtením průměru a střední chyby průměru, přestože jsem pak kvůli tomu nemohla určit variabilitu v kontrolním vzorku.

Izolace RNA pravděpodobně proběhla bez problémů a nebyla tedy zřejmě původcem variability v získaných datech. Soudím tak podle srovnatelnosti výtěžků a absorbancí tří nezávisle prováděných izolací (Tab. 3). Ani u reverzní transkripce nepředpokládám, že by způsobila výše zmíněnou variabilitu, přestože jsem ji u každého vzorku RNA prováděla pouze jednou, a tudíž jsem nemohla porovnat dva vzorky lišící se pouze reverzní transkripcí. Při reverzní transkripci jsem totiž postupovala vždy podle protokolu a využívala velmi přesné elektronické pipety s „low binding“ špičkami. Při používání stejných chemikálií a protokolu nebyla v naší laboratoři pozorována žádná větší variabilita vzorků mezi nesouběžně provedenými reakcemi reverzní transkripce.

Až na gen *CG13482*, jehož primery byly nespecifické a kvůli krátké sekvenci genu nebylo možné navrhnout do jiného místa, všechny reakce kvantitativní PCR proběhly víceméně bez problémů. Při kontrole gelovou elektroforézou měly amplifikované úseky všech genů takovou velikost, jakou podle umístění primerů v sekvenci mít měly. Vzhledem k sadám primerů navrhovaným tak, aby amplifikace probíhala přes intron, tedy prokazatelně nedošlo k žádné kontaminaci genomovou DNA. Jen výjimečně došlo v některé z jamek 48-jamkové destičky k amplifikaci nesprávného produktu nebo k výraznější variabilitě hodnot Ct v triplikátu.

Občas nastala amplifikace artefaktu v jamce s negativní kontrolou (reakční směs bez templátu). Tyto artefakty se však nikdy nevyskytovaly v jamkách s templátem a podle vrcholu křivky tání měly jinou (menší) velikost než požadovaný fragment zkoumaného genu,

z čehož vyplývá, že výrazně neovlivnily výsledek kvantitativní PCR. Pokud dosáhly prahové koncentrace pak vždy mnohem později než amplifikované úseky z jamek s templátem a zpravidla nebyly amplifikovány v dostatečném množství, aby mohly být odhaleny gelovou elektroforézou. Pravděpodobně jsou tyto artefakty následkem párování primerů mezi sebou podle částečné komplementarity v nepřítomnosti templátu, přestože byly navrhovány tak, aby k něčemu podobnému pokud možno nedocházelo. U některých sad primerů totiž docházelo k tvorbě artefaktu opakovaně. Není však vyloučena ani náhodná kontaminace nečistotou ze vzduchu, zvláště u genů, kde byl výskyt artefaktu ojedinělý. Kvůli minimálnímu množství takové kontaminující nukleové kyseliny by amplifikace byla zpožděna, výsledné množství produktu by nebylo velké a kvůli neúplné komplementaritě v kombinaci se zmíněnou malou koncentrací by byl kontaminant v jamkách s templátem z reakce kompetičně vytlačen.

Z výše uvedených informací soudím, že výsledky mé práce nebyly zkresleny ničím jiným než variabilitou buněk kvůli rozdílu v pasáži a ve složení média, která by mohla být odstraněna souběžným prováděním všech opakování pokusu. Jsem přesvědčena, že při takovém uspořádání experimentu by variabilita dat byla menší a výsledky ještě průkaznější.

5.2. Výsledky experimentu

Nejvíce genů s transkripcí průkazně indukovanou proteinem IDGF2 jsem našla ve skupině imunitních genů. Zvláště výrazná byla tato indukce u AMP *Attacin-A*, *Attacin-D* a *Cecropin A1*. Zřetelně zvýšená byla i exprese peptidoglykany rozpoznávajícího proteinu *PGRP-LB*. Proteiny *Attacin-C* a *PGRP-SD* rovněž vykazovaly výrazné zvýšení exprese po přidání IDGF2 k buňkám, ale tyto změny nebyly statisticky průkazné kvůli příliš vysoké variabilitě. Při kontrole hodnot Ct jsem si všimla, že ze zkoumaných genů mají právě tyto dva v buňkách Cl.8+ nejnižší expresi, což patrně přispělo ke zvýšení již tak dosti vysoké variability. Domnívám se tedy, že navzdory statistické neprůkaznosti jsou proteinem IDGF2 indukovány i *Attacin-C* a *PGRP-SD*. Méně výrazné, avšak statisticky průkazné bylo zvýšení exprese u transkripčních faktorů *Zn finger homeodomain (Zfh1)* a *Relish*.

Z 23 imunitních genů, které byly v dřívější práci naší laboratoře pomocí expresních čipů prokázány jako indukované proteinem IDGF2, je 14 regulováno genem *Relish*, a tedy dráhou Imd, nebo zároveň genem *Relish* i *Spätzle*, a tudíž zároveň dráhou Imd i Toll (nepublikovaná data, De Gregorio et al. 2002). Z genů, které byly v De Gregoriově (2002) práci regulovány pouze dráhou Toll, nebyl podle čipů proteinem IDGF2 indukován žádný kromě samotného genu *Relish*, důležité součásti dráhy Imd, jehož exprese je pravděpodobně ovlivněna dráhami Toll i Imd, ale vzhledem k tomu, že jeho nulový mutant byl v De Gregoriově (2002) práci

použit pro zkoumání vlivu dráhy Imd, nebylo možné zjistit její vliv na změnu exprese *Relish* při infekci. Ze mnou testovaných imunitních genů jsou podle této práce dráhou Imd ovlivněny všechny kromě *Zfh1*, který se však účastní regulace rovněž v dráze Imd, stejně jako *PGRP-LB* (Myllymäki and Rämet 2013, Zaidman-Rémy et al. 2006). Testované AMP Attacin-A, Attacin-C, Attacin-D a Cecropin A1 se účastní odpovědi na Gram negativní bakterie, a jsou tedy řízeny přímým působením dráhy Imd (Lemaitre and Hoffman 2007). Naproti tomu protein PGRP-SD působí jako receptor Gram pozitivních bakterií aktivující dráhu Toll, ale přesto je jeho exprese regulována dráhou Imd (De Gregorio et al. 2002, Lemaitre and Hoffman 2007). Zde jde tedy pravděpodobně o interakci obou imunitních signálních drah. Z výše uvedených informací soudím, že IDGF2 stimulačně působí na dráhu Imd a jí regulované geny, a to nad genem *Relish*. Vzhledem k tomu, že proteiny IDGF mohou vázat cukry, mohl by IDGF2 být dalším z rozpoznávajících proteinů, „Pattern Recognition Receptors“ (PRR), které se vážou na cukry na povrchu bakterií, a svým signálem aktivují signální dráhu (Varela et al. 2002). Tomu odpovídá i pozorovaná změna formy IDGF2 v hemolyfě po napadení patogenem (Vierstraete et al. 2004).

IDGF2 kromě AMP, které jsou výstupy dráhy Imd, a jejich transkripčního faktoru *Relish* zvyšuje transkripci i u negativních regulátorů dráhy *PGRP-LB* a *Zfh1*, což se může zdát na první pohled překvapivé, ale jde o vysvětlitelný jev (Zaidman-Rémy et al. 2006, Myllymäki and Rämet 2013). PGRP-LB je sekreční protein, který je stejně jako příslušné AMP regulovaný dráhou Imd. Po uvolnění do hemolymfy je schopen degradovat bakteriální peptidoglykany, a tak snížit jejich koncentraci, která je vnímána jinými, imunitu stimujícími, PGRP, což tvoří negativní zpětnou vazbu pro regulaci intenzity imunitní odpovědi a její včasné ukončení (Zaidman-Rémy et al. 2006). O ZFH1 víme, že inhibuje expresi AMP, a to v kaskádě buď na úrovni *Relish* nebo pod ním, avšak o regulaci jeho exprese toho zatím není mnoho známo (Myllymäki and Rämet 2013). Není sice mezi geny regulovanými genem *Relish*, ale nemůžeme vyloučit jeho regulaci dráhou Imd nad *Relish* (De Gregorio et al. 2002).

U ostatních genů došlo k průkaznému zvýšení exprese pouze u „*homeodomain interacting protein kinase*“ (*hipk*). Změny transkripce genů *CG8046* a *Sulfated* nebyly průkazné, ale nepřekračovaly limit průkaznosti příliš výrazně (Tab. 5). Navíc jsem v každém opakování pokusu získala data ukazující zvýšení exprese ve vzorku s proteinem oproti kontrole, nikdy nedošlo ke snížení. Zdá se tedy pravděpodobné, že dochází k pozitivnímu vlivu IDGF2 na expresi a neprůkaznost dat byla způsobena nevhodným uspořádáním experimentu. Toto tvrzení je ovšem nutno považovat za ne zcela potvrzené. Jinak tomu bylo

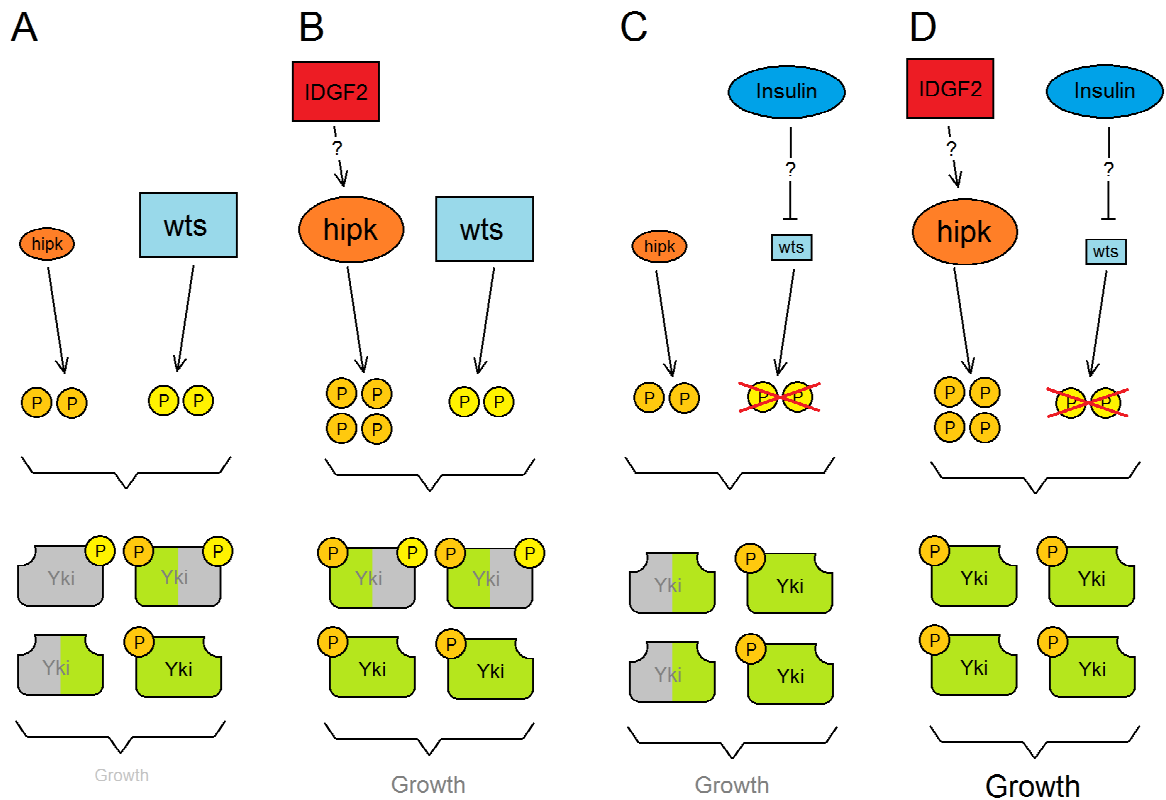
v případě genů *Mec2* a „*Glycerol 3 phosphate dehydrogenase*“ (*Gpdh*), u nichž v jednom ze tří opakování došlo dokonce ke snížení exprese oproti kontrole. *Mec2* byl IDGF2 indukován podle výsledků z čipů a dvě naměřené pozitivní změny byly výraznější než u *Gpdh*, a proto lze zvážit možnost, že zmíněný negativní výsledek z jednoho opakování byl náhodným výkyvem a i *Mec2* je indukován (nepublikovaná data). Bylo by však nutné věnovat tomuto genu pozornost v dalším experimentu, aby byl více osvětlen vliv IDGF2 na tento gen. U *Gpdh* se pak domnívám, že proteinem IDGF2 skutečně indukovaný není. Pozitivní změny exprese byly menší než u zmíněného *Mec2* a negativní naopak větší. Ani analýza expresních čipů žádnou prokazatelnou indukci IDGF2 neukázala, a proto jsem toho názoru, že exprese *Gpdh* je na IDGF2 nezávislá.

Gen *CG8046* kóduje FAD dependentní glycerol-3-fosfát dehydrogenázu, a tedy má svou funkci v metabolismu, ale jinak o něm není téměř nic známo. Je však pozoruhodné, že zatímco tento gen je pravděpodobně, ač neprůkazně, IDGF2 indukovaný, jiná glycerol-3-fosfát dehydrogenáza, tentokrát NAD dependentní, kódovaná genem *Gpdh*, s největší pravděpodobností indukovaná není.

Zato druhý z možná indukovaných genů, *Sulfated*, je zajímavější. Jde o 6-O endosulfatázu, která působí jako negativně zpětnovazební regulátor morfogenetického proteinu wingless, a to zprostředkováním jeho degradace (Kleinschmit et al. 2013, You et al. 2011). Exprese *wingless* je totiž zprostředkována proteinem Yorkie, který je aktivován mnou zkoumaným a prokazatelně IDGF2 indukovaným proteinem HIPK (viz níže) (Chen and Verheyen, 2012).

Protein HIPK stimuluje proliferaci buněk a působí proti apoptóze. Má kinázovou aktivitu a fosforylačně aktivuje protein Yorkie, který je koncovým článkem dráhy Salvador-Warts-Hippo a zprostředkovává transkripci genů jako např. *cyclin E* či *wingless* (Chen and Verheyen, 2012). Velice zajímavou informací pak je, že dráha Salvador-Warts-Hippo může být regulována prostřednictvím inzulínové dráhy (Wong et al. 2014). Pokud tento model platí a tato regulace se uplatňuje i v jiných tkáních než v trachejích, jak bylo popsáno, pak inzulín posiluje účinek IDGF2 na aktivaci Yorkie, protože inhibiční vliv dráhy Salvador-Warts-Hippo a stimulační účinek HIPK působí nezávisle na sobě (Obr. 9) (Chen and Verheyen, 2012, Wong et al. 2014). Nehledě na to, zda je v buňkách dráha Salvador-Warts-Hippo regulována inzulínovou dráhou nebo ne, výsledky z expresních čipů a z mého experimentu ukazují, že protein IDGF2 má pozitivní vliv na proliferaci díky stimulaci transkripce *hipk* (nepublikovaná data). Tento signál vysvětluje přispění IDGF k tomu, že se buňky Cl.8+ díky nim dokáží rozdělit i v médiu bez fetálního bovinního séra (Kawamura et

al. 1999). Role inzulínu ve stimulaci proliferace buněk v minimálním médiu však zatím není zcela jasná. Mohlo by jít o již zmíněné zesílení aktivace Yorkie, o interakci s další proliferaci stimulující dráhou Ras/MAPK či jiný vliv nebo o jejich součet (Oldham et al. 2002, Wong et al. 2014). Předpokládám však, že ať už je stimulační vliv inzulínu na proliferaci jakýkoliv, působení IDGF ho zesílí natolik, že buňky jsou díky němu schopné překonat i tak nepříznivé prostředí, jakým médium bez séra bezesporu je, a rozdělit se.



Obr. 9: Model společného působení IDGF2 a inzulínu na růst zprostředkovaný Yorkie (Yki). (A) Běžný stav bez působení IDGF2 a inzulínu. HIPK stimuluje Yorkie v omezené míře, zatímco Warts (wts) Yorkie inhibuje. Výsledná aktivita Yorkie je velmi nízká. (B) Působení IDGF2. IDGF2 zvýší koncentraci HIPK, a tím vzroste aktivace Yorkie, zatímco inhibice ze strany Warts zůstává nezměněna. Důsledkem je nárůst aktivity Yorkie. (C) Působení inzulínu. Inzulínová signalizace vede ke snížení aktivity Warts, čímž dojde k poklesu inhibice a tím pádem vyšší aktivitě Yorkie. (D) Současné působení IDGF2 a inzulínu. IDGF2 vyvolá nárůst koncentrace HIPK a inzulín inhibici Warts. Dochází tedy k pozitivní regulaci Yorkie ze strany HIPK a zároveň k poklesu negativní regulace ze strany Warts. Výsledkem je součet působení dvou aktivátorů Yorkie, což má za následek velice silný signál k proliferaci.

6. Závěr

Úspěšně jsem provedla izolaci RNA z buněk linie Cl.8+, které byly vystaveny působení proteinu IDGF2. Ze získané RNA jsem reverzní transkripcí připravila cDNA, kterou jsem pak využila pro kvantitativní PCR. Touto metodou jsem otestovala vliv proteinu IDGF2 na expresi 13 genů.

Z testovaných genů jsem dosáhla průkazného zvýšení exprese po přidání proteinu IDGF2 u sedmi. U několika dalších lze i přes ne zcela průkazný výsledek o pozitivním vlivu na transkripci spekulovat

Nejvíce genů, které jsou prokazatelně indukovány proteinem IDGF2, bylo nalezeno ve skupině genů souvisejících s imunitou, konkrétně se signální dráhou Imd, z čehož usuzuji, že protein IDGF2 má schopnost stimulovat tuto dráhu. Je možné, že IDGF2 působí jako rozpoznávací protein, který váže bakteriální cukerné struktury a vytváří signál pro aktivaci dráhy Imd.

Kromě imunitních genů měl protein IDGF2 prokazatelně pozitivní vliv i na expresi proteinkinázy HIPK, která hraje důležitou roli v regulaci proliferace buněk pomocí transkripčního koaktivátoru Yorkie. Tento poznatek by mohl být klíčovým při objasnění již dlouho známého pozitivního vlivu IDGF na proliferaci buněk *in vitro*.

7. Seznam literatury

- Aggarwal, K.; Silverman, N. (2008): Positive and negative regulation of the *Drosophila* immune response; *BMB reports*; 41(4); 267-277.
- Asgari, S.; Schmidt, O. (2004): Isolation of an imaginal disc growth factor homologue from *Pieris rapae* and its expression following parasitization by *Cotesia rubecula*; *Journal of Insect Physiology*; 50; 687-694.
- Attardo, G.M.; Strickler-Dinglasen, P.; Perkin, S.A.H.; Caler, E.; Bonaldo, M.F.; Soares, M.B.; El-Sayed, N.; S. Aksoy (2006): Analysis of fat body transcriptome from the adult tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*; *Insect Molecular Biology*; 15; 411-424.
- Badariotti, F.; Kypriotou, M.; Lelong, C.; Dubos, M.P.; Renard, E.; Galera, P.; Favrel, P. (2006): The phylogenetically conserved molluscan Chitinase-like protein 1 (*Cg-Clp1*), homologue of human *HC-gp39*, stimulates proliferation and regulates synthesis of extracellular matrix components of mammalian chondrocytes; *The Journal of Biological Chemistry*; 281; 29583-29596.
- Badariotti, F.; Lelong, C.; Dubos, M.P.; Favrel, P. (2007): Characterization of chitinase-like proteins (*Cg-Clp1* and *Cg-Clp2*) involved in immune defence of the mollusc *Crassostrea gigas*; *FEBS Journal*; 274; 3646-3654.
- Biteau, B.; Karpac, J.; Hwangbo, D.; Jasper, H. (2011): Regulation of *Drosophila* lifespan by JNK signaling; *Experimental Gerontology*; 46 (5); 349-354.
- Chen, J.; Verheyen, E.M. (2012): Homeodomain-Interacting Protein Kinase Regulates Yorkie Activity to Promote Tissue Growth; *Current Biology*; 22; 1582-1586.
- Claeys, I.; Simonet, G.; Poels, J.; Van Loy, T.; Vercammen, L.; De Loof, A.; Vanden Broeck, J. (2002): Insulin-related peptides and their conserved signal transduction pathway; *Peptides*; 23(4); 807-816.
- Currie, D.A.; Milner, M.J.; Evans, C.W. (1988): The growth and differentiation in vitro of leg and wing imaginal disc cells from *Drosophila melanogaster*; *Development*; 102; 805-814.
- De Gregorio, E.; Spellman, P.T.; Rubin, G.M.; Lemaitre, B. (2001): Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays; *PNAS*; 98 (22); 12590-12595.
- De Gregorio, E.; Spellman, P.T.; Tzou, P.; Rubin, G.M.; Lemaitre, B. (2002): The Toll and Imd Pathways are the major regulators of the immune response in *Drosophila*; *The EMBO Journal*; 21 (11); 2568-2579.
- Edgar, B.A. (2006): From Cell Structure to Transcription: Hippo Forges a New Path; *Cell*; 124 (2); 267-273.
- Eleftherianos, I.; Castillo, J.C. (2012): Molecular Mechanisms of Aging and Immune System Regulation in *Drosophila*; *International Journal of Molecular Sciences*; 13(8); 9826-9844.
- Fernandez, R.; Tabarini, D.; Azpiazu, N.; Frasch, M.; Schlessinger, J. (1995): The *Drosophila* insulin receptor homologue: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential; *The EMBO Journal*; 14 (14); 3373-3384.

- Hakala, B.E.; White, C.; Recklies, A.D. (1993): Human cartilage GP-39, a major secretory product of articular chondrocytes and synovial cells, is a mammalian member of a chitinase protein family; *The Journal of Biological Chemistry*; 268; 25803-25810.
- Harbisson, S.T.; Chang, S.; Kamdar, K.P.; Mackay, T.F.C. (2005): Quantitative genomics of starvation stress resistance in *Drosophila*; *Genome Biology*; 6 (4); R36.
- Hu, B.; Trinh, K.; Figueira, W.F.; Price, P.A. (1996): Isolation and sequence of a novel human chondrocyte protein related to mammalian members of the chitinase protein family; *The Journal of Biological Chemistry*; 271; 19415-19420.
- Huang, Z.; Hunter, W.B.; Cleland, C.A.; Wolinsky, M.; Lapointe, S.L.; Powell, C.A. (2006): A new member of the growth-promoting glycoproteins from diapreps root weevil (Coleoptera: Curculionidae); *Florida Entomologist*; 89 (2); 223-232.
- 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 (3); 335-350.
- Kahn, C.R.; White, M.F. (1988): The Insulin Receptor and the Molecular Mechanism of Insulin Action; *Journal of Clinical Investigation*; 82 (4); 1151-1156.
- Kawamura, K.; Shibata, T.; Saget, O.; Peel, D.; Bryant, P.J. (1999): A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells; *Development*; 126 (2); 211-219.
- 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(2); 147-154.
- Kleinschmit, A.; Takemura, M.; Dejima, K.; Choi, P.Y.; Nakato, H. (2013): *Drosophila* Heparan Sulfate 6-O-Endosulfatase Sulf1 Facilitates Wgless (Wg) Protein Degradation; *The Journal of Biological Chemistry*; 288 (7); 5081-5089.
- Lasko, P.; Sonenberg, N. (2007): Coordinated transcriptional and translational control in metabolic homeostasis in flies; *Genes & Development*; 21; 235-237.
- Lemaitre, B.; Hoffmann, J. (2007): The Host Defense of *Drosophila melanogaster*; *Annual Review of Immunology*; 25; 697-743.
- Li, Y.; Chen, K.; Yao, Q.; Li, J.; Wang, Y.; Liu, H.; Zhang, C.; Huang, G. (2009): The effect of calorie restriction on growth and development in silkworm, *Bombyx mori*; *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*; 71 (3); 159-172.
- Myllymäki, H.; Rämetsä, M. (2013): Transcription factor zfh1 downregulates *Drosophila* Imd pathway; *Developmental and Comparative Immunology*; 39; 188-197.
- Oldham, S.; Stocker, H.; Laffargue, M.; Wittwer, F.; Wymann, M.; Hafen, E. (2002): The *Drosophila* insulin/IGF receptor controls growth and size by modulating PtdInsP3 levels; *Development*; 129; 4103-4109.
- Puig, O.; Tjian, R. (2005): Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1; *Genes & Development*; 19; 2435-2446.

- Recklies, A.D.; White, C.; 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; *Biochemical Journal*; 365; 119-126.
- Reyes-DelaTorre, A.; Peña-Rangel, M.T.; Riesgo-Escovar, J.R.: Carbohydrate Metabolism in *Drosophila*: Reliance on the Disaccharide Trehalose. In *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology* (2012); ISBN 978-953-51-0864-1; Kapitola 14; 317-338. (Online verze na www.intechopen.com)
- Shi, L., Paskewitz, S.M. (2004): Identification and molecular characterization of two immune-responsive chitinase-like proteins from *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular biology*; 13 (4); 387-398.
- Sun, Y.J.; Chang, N.C.; Hung, S.I.; Chang, A.C.; Chou, C.C.; Hsiao, C.D. (2001): The Crystal Structure of a Novel Mammalian Lectin, Ym1, Suggests a Saccharide Binding Site; *The Journal of Biological Chemistry*; 276; 17507–17514.
- Tsuzuki, S.; Iwami, M.; Sakurai, S. (2001): Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis; *Insect Biochemistry and Molecular Biology*; 31; 321–331.
- Tzou, P.; De Gregorio, E.; Lemaitre, B. (2002): How *Drosophila* combats microbial infection: a model to study innate immunity and host–pathogen interactions; *Current Opinion in Microbiology*; 5; 102–110.
- Varela, P. F.; Llera, A. S.; Mariuzza, R. A.; Tormo, J. (2002): Crystal Structure of Imaginal Disc Growth Factor-2; *The Journal of Biological Chemistry*; 277; 13229–13236.
- Vierstraete, E.; Verleyen, P.; Sas, F.; Van den Bergh, G.; 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.
- Wong, D.M.; Shen, Z.; Owyang, K.E; Martinez-Agosto, J.A. (2014): Insulin- and Warts-Dependent Regulation of Tracheal Plasticity Modulates Systemic Larval Growth during Hypoxia in *Drosophila melanogaster*; *PLOS ONE*; 9 (12); e115297.
- You, J.; Belenkaya, T.; Lin, X. (2011): Sulfated Is a Negative Feedback Regulator of Wingless in *Drosophila*; *Developmental Dynamics*; 240; 640–648.
- Zaidman-Rémy, A.; Hervé, M.; Poidevin, M.; Pili-Floury, S.; Kim, M.S.; Blanot, D.; Oh, B.H.; Ueda, R.; Mengin-Lecreulx, D.; Lemaitre, B. (2006): The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection; *Immunity*; 24 (4); 463-473.
- Žurovcová, M.; Ayala, F. J. (2002): Polymorphism patterns in two tightly linked developmental genes, *Idgf1* and *Idgf3*, of *Drosophila melanogaster*; *Genetics*; 162 (1); 177-188.