

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vliv IDGF proteinů na srážení
hemolymfy u *Drosophila melanogaster***

Bakalářská práce

Nikola Kaislerová

Vedoucí práce: prof. RNDr. Michal Žurovec, CSc
Odborný konzultant: Mgr. Lucie Kučerová, Ph.D.

České Budějovice 2020

Kaislerová N., 2020: Vliv IDGF proteinů na srážení hemolymfy u *Drosophila melanogaster* [The effect of IDGF proteins on hemolymph clotting of *Drosophila melanogaster*. Bc. Thesis, in Czech.] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The topic of this thesis is a genetic analysis of the role of Imaginal Growth Factors (IDGFs) in the coagulation of fruit fly hemolymph. We tested the ability of the overexpressed *Drosophila* IDGF1, IDGF2, IDGF3 proteins as well as modified IDGF3 and mouse galectin 4 to functionally rescue the clotting-deficient *IDGF3 null* mutant. Our results revealed that the process of coagulation requires an intact IDGF3 protein containing appropriate glycosylation.

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 dne 12. 5. 2020

.....

Nikola Kaislerová

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Michalovi Žurovcovi za jeho rady a vedení mé práce. Zvláštní poděkování patří Mgr. Lucii Kučerové, Ph.D., Mgr. Václavu Brožovi Ph.D. a Mgr. Lence Rouhové za cenné připomínky v průběhu mé práce a za prvotní pomoc v laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině za podporu nejen při psaní této práce, ale i průběhu celého studia.

Obsah

1.	ÚVOD	1
1.1.	Růstové faktory imaginálních disků (IDGFs).....	1
1.2.	Mechanismus srážení hemolymfy	3
1.3.	Savčí homology chitináz a IDGF proteinů	4
2.	CÍLE PRÁCE	7
3.	MATERIÁLY A METODY	8
3.1.	Pokusné organismy a konstrukty	8
3.2.	Izolace DNA	8
3.2.1.	Chelexová izolace.....	8
3.2.2.	Izolace pomocí „Squishing“ pufru	9
3.3.	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	9
3.4.	Agarózová gelová elektroforéza	10
3.5.	Křížení geneticky upravených linií <i>Drosophila melanogaster</i>	10
3.6.	Výběr homozygotů	11
3.7.	Příprava vzorků a odběr hemolymfy	11
3.8.	Srážení v kapce (Hanging drop assay).....	12
3.9.	Imunohistochemie koagulátu protilátkou a lektinem.....	12
3.10.	„Bead Aggregation Assay“	13
3.11.	SDS-PAGE	14
3.12.	Western blot	15
3.13.	Složení pufrů.....	16
4.	VÝSLEDKY	17
4.1.	Ověření genotypů linií <i>Drosophila melanogaster</i>	17
4.2.	Lokalizace IDGF proteinů v koagulátu hemolymfy	19
4.3.	Záchrana fenotypu spojeného se srážením hemolymfy IDGF3 ^{L1} mutanta... 20	
4.4.	Kvantifikace srážení hemolymfy při použití záchranných konstruktů pro IDGF3 ^{L1}	23

5.	DISKUSE.....	27
6.	ZÁVĚR.....	31
7.	SEZNAM LITERATURY	32
8.	APPENDIX	37
8.1.	Detekce a porovnání produkce IDGF proteinů v hemolymfě vybraných linií	37
9.	PŘÍLOHY.....	39

1. ÚVOD

1.1. Růstové faktory imaginálních disků (IDGFs)

Růstové faktory „Imaginal disc growth factors“ (IDGFs) jsou sekretované glykoproteiny, které se svou strukturou řadí mezi evolučně vysoce konzervované chitinázy, hydrolyticky štěpící glykosidickou vazbu chitinových polymerů (Kawamura *et al.*, 1999; McCarter a Withers, 1994). Podobně jako chitinázy rodiny 18 glykosyl hydroláz tvoří klasický $(\alpha\beta)_8$ barel známý též jako TIM (triose-phosphate isomerase) barel. Nicméně IDGF proteiny se od této skupiny enzymů mimo jiné liší extra sekvencí tvořící smyčku mezi $\beta 4$ listem a $\alpha 4$ helixem a substitucí klíčového glutamového aminokyselinového zbytku (Glu-315) v hydrolytickém aktivním centru na glutaminový Gln-132. Tato substituce je zřejmě zodpovědná za ztrátu enzymatické aktivity těchto proteinů, a proto je řadíme spíše mezi tzv. „chitinázám podobné proteiny“ (CLP) rodiny 18 glykosyl hydroláz (Varela *et al.*, 2002), a to konkrétně do V. skupiny hmyzích chitináz (Zhu *et al.*, 2008).

Nedávné evoluční studie odhalily, že genová rodina *IDGF* se nejspíše vyvinula z chitináz u společného předka, jenž existoval ještě před rozdělením vývojových větví na Polyneoptera, Condylgnatha, a Holometabola. V rámci druhu se gen pro IDGF původně nacházel pouze v jedné kopii, jako je zřejmé u holometabolních Hymenoptera, Lepidoptera a některých primitivních Diptera. Fylogenetické analýzy navíc prozrazují, že rychlost vývoje *IDGF* byla v rámci druhu hmyzu asymetrická. Například oproti Lepidoptera s jednou kopií *IDGF* ovlivněnou převážně negativní selekcí, několikanásobná duplikace *IDGF* doprovázená pozitivní selekcí naznačuje u Diptera rychlejší vývoj (Žurovcová *et al.*, 2019). Tyto duplikace umožnily vznik několika paralogů *IDGF*.

Genová rodina *IDGF Drosophila melanogaster* zahrnuje minimálně 6 členů sdílejících přibližně 50% sekvenční identitu – IDGF1-5 a první objevený DS47, též známý jako IDGF6 (Kawamura *et al.*, 1999; Žurovcová a Ayala, 2002; Varela *et al.*, 2002; Zimmerman *et al.*, 2017). Jsou to poměrně krátké geny s podobnou stavbou intronů a exonů. Jak se zdá, fylogeneticky nejstarším je *IDGF5*, který leží na 2R ramenu druhého chromozomu v 55D úseku. Dále se fylogenetický strom dělí do 2 vývojových větví. Do první patří *IDGF6 (DS47)*, ležící také na 2R chromozomálním ramenu v úseku 53D, a *IDGF4*, jenž je jako jediný

lokalizovaný na X chromosomu 9A úseku. Druhou evoluční větev tvoří *IDGF1-3*, které v úzkém svazku leží opět na druhém chromozomu, nýbrž 2L rameni 36A úseku (Žurovcová a Ayala, 2002; Badariotti *et al.*, 2006).

IDGF proteiny *Drosophila melanogaster* jsou produkovány víceméně po celý život jedince a tvoří poměrně velkou část všech proteinů v hemolymfě. Za normálních podmínek např. IDGF2 protein dosahuje koncentrace 19 ± 3 ng/ μ l (přibližně 400 nM) a zraněním či infekcí může být tato koncentrace zvýšena (Brož *et al.*, 2017). Všeobecně jsou IDGF proteiny nejsilněji exprimovány žloutkem embrya, tukovým tělesem larev a hemocyty. Mimoto byly však detekovány např. v blízkosti tracheálního systému pozdního embrya, v mozku, „kruhové“ žláze, lymfatických a slinných žlázách, garlandových a perikardiálních buňkách larev, či v oocytech a podpůrných buňkách dospělců (Kawamura *et al.*, 1999; Brož *et al.*, 2017). Nicméně produkce jednotlivých IDGF proteinů se liší jak lokalizací, tak intenzitou. Například při porovnání exprese transkriptů *IDGF1-4* pomocí *in situ* hybridizace byly v embryonálním stádiu *IDGF2* a *IDGF4* transkripty exprimovány o něco silněji než *IDGF1* a *IDGF3* (Kawamura *et al.*, 1999).

Navzdory ztrátě enzymatické aktivity si IDGF proteiny zachovaly schopnost rozpoznávat a svým vazebným místem (carbohydrate binding site; CBS) vázat některé cukerné zbytky (Varela *et al.*, 2002). Pomocí glykanového čipu bylo zjištěno, že IDGF2 protein zřejmě rozpoznává Gal α 1-3(Fuca1-2)Gal β 1-3GlcNAc β cukerný motiv (Brož, nepublikováno). Dále pak u IDGF1 a IDGF4 byla v rámci Diptera převážně v α 7 β 7 doméně, podílející se na vazbě substrátu či u jiných chitináz na termální stabilitě proteinu, pozorována již zmíněná pozitivní selekce ovlivňující polaritu a přístupnost některých aminokyselinových sekvencí (Žurovcová *et al.*, 2019). Zřejmě tak evolucí u IDGF proteinů u Diptera došlo k zisku nových funkcí.

Jako růstové faktory mohou IDGF proteiny stimulovat proliferaci, spoluúčastnit se na polarizaci a pohyblivosti Cl.8+ buněk imaginálního disku *in vitro* (Kawamura *et al.*, 1999). Překvapivě bylo zjištěno, že IDGF2 protein *Drosophila melanogaster* je navzdory původním předpokladům zcela nezávislý na inzulinu a chrání buňky před buněčnou smrtí *in vitro* při sérové deprivaci, toxicitě xenobiotik a vysoké koncentraci extracelulárního adenosinu a deoxyadenosinu (Brož *et al.*, 2017). Dále pak jsou IDGF proteiny důležité pro svlékání kutikuly při metamorfóze a organizaci extracelulární matrix (ECM). Předpokládá se, že působí proti chitinolytické degradaci a jako strukturální proteiny udržují „kostru“ ECM. Spolu

s chitinázami tak zřejmě zajišťují dynamiku ECM (Pesch *et al.*, 2016). Také byla prokázána jejich ochranná role při infekci *D. melanogaster* entomopatogenními hlísticemi a spoluúčast na imunitní antimikrobiální odpovědi. K tomuto účinku zřejmě přispívá jejich vliv na koagulaci hemolymfy. Bylo totiž potvrzeno, že IDGF3 protein je nezbytnou součástí „strupu“ kryjícího poranění kutikuly (Kučerová *et al.*, 2016). Z tohoto zjištění se odvíjí hlavní otázka této práce, a to které proteiny z rodiny *IDGF* se účastní srážení hemolymfy a jak velkou mírou se na koagulaci podílí.

1.2. Mechanismus srážení hemolymfy

Členovci mají oproti obratlovcům otevřený cirkulační systém postrádající získanou imunitu, který musí být schopen po poranění udržet homeostázu, zastavit krvácení a zároveň zachytit mikrobiální patogeny šířící se do hemocoelu. Proto je srážení hemolymfy jedním z klíčových mechanismů vrozené imunity hmyzu a často je regulováno mikrobiálními spouštěči (Theopold *et al.*, 2004).

Vrozená imunita *Drosophila melanogaster* zahrnuje jak buněčné (fagocytující plasmatomy), tak humorální složky (Elrod-Erickson *et al.*, 2000). U *Drosophila* bylo identifikováno několik strukturálních komponentů koagulátu hemolymfy a také enzymů, kteréžto tvoří v koagulátu příčné vazby a zpevňují ho. Mezi tyto strukturální komponenty například patří lipophorin, hemolektin, fondue, hemomucin, mucin slinných žláz Eig71eE, triggrin či mnou studovaný IDGF3 (Schmid *et al.*, 2019; Dziedziech *et al.*, 2020). Jak již bylo naznačeno, tyto komponenty jsou pak spolu se zachycenými bakteriemi spojovány a zpevňovány enzymy jako je transglutamináza (Tg) a profenoxidáza (PPO).

Exosomálně sekretovaná bílkovina Tg působí u *D. melanogaster* v časně fázi koagulace a je to jediný identifikovaný homolog jedné z osmi transglutamináz lidského genomu, srážecího faktoru XIIIa. Podobně jako lidská transglutamináza tvoří kovalentní vazby mezi glutaminovými zbytky a primárními aminy zejména lysinových zbytků, díky čemuž pomáhá formovat primární sraženinu (Theopold *et al.*, 2014; Schmid *et al.*, 2019).

V pozdější fázi koagulace nastupuje na scénu bílkovina PPO. Ta je prasknutím krystalové buňky v krystalické formě uvolňována do hemolymfy a po rozpuštění je dodatečně aktivována proteolytickou kaskádou. Aktivní PPO pak kromě melaninu produkuje

v molekulárním množství deriváty tyrosinu, které mají cytotoxický účinek a dále zpevňují sraženinu v „pevný koagulát“ (Theopold *et al.*, 2014).

U Lepidoptera bylo navíc při poranění vyzorováno, že po vytvoření „pevného koagulátu“ jsou k němu přitahovány plasmatocyty. Ty se dále rozmísťují podél koagulátu a oddělují ho od hemocoelu. Nakonec dochází k regeneraci vrstvy epidermis, jenž naroste skrz poranění a nahradí vytvořený strup. Tento strup však zřejmě nepodléhá žádnému degradačnímu systému. V porovnání s obratlovci, kteří si vyvinuli fibrinolytický a anti-koagulační systém, si hmyz vyvinul jiný efektivní mechanismus. Ten zejména pomocí regulace aktivity PPO pouze omezuje srážení a odstranění strupu je pro ně již méně naléhavá záležitost (Theopold *et al.*, 2004).

Jak již bylo řečeno, strukturní součástí koagulátu je i IDGF3 protein. Ten si zachoval schopnost specificky vázat cukerné zbytky a má tedy zřejmě podobný charakter jako lektiny. Naskytla se zde tedy další otázka. Je vazba na cukerné složky a vlastní glykosylace IDGF proteinů limitujícím faktorem pro jejich správnou funkci? Proto se tento výzkum mimo jiné zabývá i bližším osvětlením role glykosylace v rámci mechanismu působení IDGF3 proteinu při koagulaci. Naši hypotézou je, že IDGF3 protein váže sám na sebe a funguje tzv. jako „zámek a klíč“. Pomocí svého cukerného vazebného místa se podobně jako lektiny specificky váže svou cukernou složku a tvoří tak kompaktní „sít“ sraženiny.

1.3. Savčí homology chitináz a IDGF proteinů

Přestože doposud nebyl v žádném savci detekován chitin či chitin-syntetázy, je známo, že myš, ba i dokonce člověk exprimuje chitinázy rodiny 18 glykosyl hydroláz. Z toho minimálně dva zástupci představují enzymaticky aktivní tzv. „pravé“ chitinázy – „acidic mammalian chitinase“ neboli AMCáza (neboli CHIA, eosinophil chemotactic cytokine) a chitotriosidáza (neboli chitináza 1). Vzhledem k absenci chitinu se ovšem předpokládá, že místo něj tyto chitinázy interagují s molekulami s podobnou strukturou, jako jsou heparan sulfát či kyselina hyaluronová, a účastní se tak ochrany před patogeny (Lee *et al.*, 2011).

U myši i lidí byly však objeveny i proteiny podobné hmyzím IDGF proteinům, „chitinase-like“ proteiny (CLP). Tyto savčí CLP mimo jiné analogie také postrádají enzymatickou aktivitu, a to rovněž díky substituci klíčové glutamové aminokyseliny v aktivní doméně (v případě YKL-40 na aminokyselinu leucin) (Renkema *et al.*, 1998; Kzhyshkowska

et al., 2007). Mezi uvedenou skupinu CLP patří: YKL-40 (neboli CHI3L1/chitinase 3-like 1, HcGP-39), YKL-39 (neboli CHI3L2/chitinase 3-like 2, chondrocyte pretein 39), SI-CLP (stabilin-1-interacting CLP) a oviductin (neboli oviduct-specific glycoprotein, mucin 9) (Lee *et al.*, 2011; Ranok *et al.*, 2015).

Je pravděpodobné, že současná rodina lidských chitináz, stejně jako chitináz *Drosophila melanogaster*, vznikla z prastarých genů existující v době expanze Bilateria. Nicméně vývoj a expanze lidských CLP zřejmě probíhal na hmyzí rodině zcela nezávisle dle modelu „birth-and-death“. Přestože se zdá, že savčí CLP neměly společného předka s vývojovou větví IDGF hmyzu a jejich evoluce byla individuální, mají mnoho znaků a funkcí společných (Badariotti *et al.*, 2006; Bussink *et al.*, 2007; Funkhouser a Aronson Jr., 2007).

Podobně jako IDGF proteiny, jež jsou ve velké míře produkovány hemocyty, savčí CLP jsou exprimovány zejména makrofágy a neutrofilny, ale také chondrocyty, fibroblasty, buňkami vaskulárního hladkého svalu, endoteliálními buňkami aj. (Kzhyshkowska *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011). Například nejprozkoumanější YKL-40 má zřejmě vliv na proliferaci a diferenciaci buněk, působí proti apoptóze, stimuluje angiogenezi, reguluje extracelulární tkáňovou „remodelaci“ a přispívá tak tvorbě fibrózy a hojení ran (Schultz a Johansen, 2010; Lee *et al.*, 2011). YKL-40 se také spoluúčastní zánětlivých reakcí a považuje se za tkáňově specifický protein akutní fáze (Schultz a Johansen, 2010). Avšak zásadní roli YKL-40 hraje i v adaptivní Th2 imunitě, tedy proti extracelulárním patogenům (Lee *et al.*, 2011).

Vyšší množství plazmatického YKL-40 bylo detekováno u pacientů s lokalizovanou či pokročilou rakovinou (Schultz a Johansen, 2010). Usuzuje se, že YKL-40 pomocí regulace růstu, podpory životaschopnosti a diferenciaci rakovinných buněk napomáhá tumorové invazi a tvorbě metastáz (Lee *et al.*, 2011). Nicméně jeho zvýšená exprese doprovází u pacientů i řadu chorobných stavů jako jsou kardiovaskulární onemocnění, diabetes, CHOPN, astma, jaterní fibróza a revmatoidní artritida. Proto nelze říct, že je pro rakovinu vysoce specifický. YKL-40 je tedy považován pouze za nezávislý „biomarker“ pro pacienty se špatnou prognózou, a zda je vhodný pro „monitoring“ a předpověď vývoje nemoci jsou nutné další studie (Schultz a Johansen, 2010).

Na závěr je nutné zmínit, že navzdory divergentnímu evolučnímu vývoji lidských CLP nám výzkum hmyzích IDGF proteinů poskytuje stále významné a cenné informace. Strukturní

a funkční podobnosti IDGF proteinů nám totiž mohou pomoci lépe pochopit jejich další funkce a mechanismy.

2. CÍLE PRÁCE

1. Zvládnutí metod izolace DNA, PCR, agarózová gelová elektroforéza a SDS-PAGE, Western blot, imunohistochemie, „Hanging drop assay“, „Bead aggregation assay“.
2. Detekovat IDGF proteiny v koagulátu hemolymfy.
3. Obnovit fenotyp srážení hemolymfy u nulového mutantu *IDGF3* pomocí exprese různých rekombinantních konstruktů (například: jiných členů rodiny IDGF, modifikované molekuly IDGF3 apod.).
4. Kvantifikovat účinnost jednotlivých rekombinantních proteinů při srážení hemolymfy.

3. MATERIÁLY A METODY

3.1. Pokusné organismy a konstrukty

Genotypy výchozích linií *Drosophila melanogaster* z chovu na ENTÚ (Tab. I).

Tab. I: Použité genotypy *Drosophila melanogaster*.

číslo	genotyp
1.	$w; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; UAS - Idgf3$
2.	$w, UAS - Idgf2; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; +$
3.	$w; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; UAS - Idgf1$
4.	$w; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; UAS - Idgf3^{WGS}$
5.	$w; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; UAS - Galectin$
6.	$w; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; +$
7.	$w; +; + (w^{1118})$
8.	$w; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; hml - Gal4$
9.	$w; +; hml - Gal4$
10.	Canton S

Po příslušném křížení mušek s těmito genotypy vznikly tzv. záchranné (rescue) linie, které byly použity v následujícím výzkumu (viz níže 3.5.).

3.2. Izolace DNA

Pro PCR reakce (viz níže) byly vyzkoušeny 2 různé způsoby izolace.

3.2.1. Chelexová izolace

Na jeden vzorek izolované DNA byli ve 100 μ l 5% roztoku Chelexu 100 (Bio-Rad) mechanicky homogenizováni dva dospělci *Drosophily melanogaster* daného genotypu a následně byl homogenát „vortexován“ a odstředěn. Do této směsi byla přidána pteináza K o výsledné koncentraci 500 μ g/ml a směs byla znovu protřepána a následně inkubována 45 min

při 56 °C. Po inkubaci byly vzorky jen „vortexovány“ a dále inkubovány 10 min při 95-100 °C pro inaktivaci proteinázy K. Nakonec se vzorky opět protřepaly a centrifugovaly 5 min při maximální rychlosti. Do PCR reakce byl poté použit získaný supernatant.

3.2.2. Izolace pomocí „Squishing“ pufru

Na jeden vzorek bylo potřeba připravit 50 µl „Squishing“ pufru (10 mM Tris-Cl pH 8.2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl) smíchaného s proteinázou K o výsledné koncentraci 1,25 mg/ml. Do tohoto pufru byl vždy mechanicky homogenizován jeden dospělec *Drosophila melanogaster* daného genotypu a poté byl homogenát „vortexován“ a odstředěn. Takto připravené vzorky byly dále inkubovány 1 hod při 56 °C. Po inkubaci byly vzorky opět „vortexovány“ a dále pro inaktivaci proteinázy K inkubovány 5 min při 95 °C. Nakonec byly vzorky protřepány a odstředěny. Vzniklý supernatant s izolovanou DNA byl dále použit do PCR jako templát.

3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Jako kontrolní gen pro standardní průběh reakce PCR byl použit gen kódující ribozomální protein rp49, který je exprimován nezávisle na sledovaných IDGF proteinech. Pro amplifikaci kontrolovaných genů v daném genotypu byly použity primery IDGF3^{L1} a Gal4 (viz níže Přílohy Tab. IV).

Reakční směs na jednu reakci obsahovala 1× „Dream Taq Green PCR Master Mix“ (Thermo Scientific), 0,25 µM „Forward“ (Fw) primeru, 0,25 µM „Reverse“ (Rev) primeru a 1 µl izolované templátové DNA. Celkový objem reakce činil 10 µl.

Takto připravené vzorky reakčních směsí byly vloženy do PCR cyklieru s přednastaveným programem počínaje „predenaturací“ při 94 °C/1 min. Samotná amplifikace genových úseků probíhala ve 35 cyklech, kdy na sebe navazovaly kroky denaturace 94 °C/30 s, nasedání primerů (annealing) 55 °C/30 s, a extenze 72 °C/1 min. Teplota nasedání primerů byla stanovena na 55 °C vzhledem k zastoupení GC bazí použitých primerů. Po amplifikaci byl program zakončen finální extenzí při 72 °C/5 min.

Výsledné PCR produkty byly analyzovány pomocí gelové elektroforézy (viz níže).

3.4. Agarózová gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza probíhala na 1,5% agarózovém gelu obarveném ethidium bromidem (0,5 µg/ml) v 1×TAE pufru (viz níže 3.13). Gely byly vyfoceny přes červený filtr a délka sledovaných fragmentů byla stanovena dle standardu délek 100 bp DNA „Ladder“ (Solis BioDyne) a porovnávána s teoretickou délkou amplifikovaných fragmentů.

3.5. Křížení geneticky upravených linií *Drosophila melanogaster*

Pro křížení určitých genotypů bylo vždy nejprve nutné nasbírat dostatečné množství neoplozených samic *Drosophila melanogaster*, které byly rozpoznány dle přítomnosti meconia (Chyb a Gompel, 2013). Ty byly poté kříženy se samci dle následujícího schématu (Tab. II).

Tab. II: Použité genotypy *Drosophila melanogaster* a jejich křížení.

pohlaví	číslo	genotyp	křížení	genotyp po křížení
♂	A)	$w; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; hml - Gal4$	/	/
	B)	$w; +; + (w^{1118})$	/	/
×				
♀	a)	$w; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; UAS - Idgf3$	A) × a)	$w; Idgf3^{L1}; \frac{UAS - Idgf3}{hml - Gal4}$
	b)	$w, UAS - Idgf2; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; +$	A) × b)	$w, UAS - Idgf2; \frac{Idgf3^{L1}}{hml - Gal4}; +$
	c)	$w; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; UAS - Idgf1$	A) × c)	$w; Idgf3^{L1}; \frac{UAS - Idgf1}{hml - Gal4}$
	d)	$w; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; UAS - Idgf3^{WGS}$	A) × d)	$w; Idgf3^{L1}; \frac{UAS - Idgf3^{WGS}}{hml - Gal4}$
	e)	$w; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; UAS - galektin4$	A) × e)	$w; Idgf3^{L1}; \frac{UAS - galektin4}{hml - Gal4}$
	f)	$w; \frac{Idgf3^{L1}}{CyO, GFP}; +$	A) × f)	$w; Idgf3^{L1}; \frac{hml - Gal4}{+}$
	g)	$w; +; + (w^{1118})$	A) × g)	$w; \frac{Idgf3^{L1}}{+}; \frac{hml - Gal4}{+}$
	h)	$w; +; hml - Gal4$	B) × h)	$w; +; \frac{hml - Gal4}{+}$

Tabulka shrnuje jednotlivé použité záchranné (rescue) konstrukty jejichž exprese je řízena *UAS-Gal4* expresním systémem a jejichž úkolem je funkční záchrana fenotypu nulové mutace *IDGF3^{L1}* ležící na 2. chromozomu. Jako negativní kontrola byl použit *IDGF3^{L1}* mutant s *hml-Gal4* „backgroundem“ (A × f) a jako pozitivní kontroly *IDGF3^{L1}* heterozygot (A × g) a „wild type“ (wt; B × h), také s *hml-Gal4* pozadím. Veškeré křížení probíhalo na živném médiu z jablečného džusu (2% agar, 2,5% cukr, 25% jablečný džus, 0,125% methylparaben) pokrytém „pastou“ z kvasnic (rozpuštěné v dH₂O) při 25 °C.

3.6. Výběr homozygotů

24 hodin po naklazení vajíček křížených jedinců nesoucích požadované konstrukty, a tedy bezprostředně po vylíhnutí larev do prvního larválního stádia (L1), byly vždy vytříděny „non-GFP“ (nesvítící) larvy bez balancerového chromozomu.

Tito homozygoti pro *IDGF3^{L1}* s příslušným „backgroundem“ spolu s pozitivními kontrolami (heterozygot $w; \frac{Idgf3^{L1}}{+}; \frac{hml-Gal4}{+}$ a $wt w; +; \frac{hml-Gal4}{+}$) byli dále inkubováni na živném médiu s kukuřičným šrotem (10% kukuřičný šrot, 1,25% agar, 6,25% cukr, 5% kvasnice, 0,2% methylparaben) ve 25 °C do třetího larválního stádia (L3) a následně použiti v dalších pokusech (Hanging drop assay, Bead aggregation assay, Western blot).

3.7. Příprava vzorků a odběr hemolymfy

V destilované vodě, etanolu a 50% Savu byly larvy 3. instaru (viz výše 3.6.) opláchnuty od zbytků potravy a nečistot, a to dle pořadí: dH₂O-EtOH-dH₂O-Savo-dH₂O-EtOH-dH₂O. Šesti až sedmi takto omytým a na papírovém ubrousku osušeným larvám totožného genotypu byla pod binokulární lupou pitevnými pinzetami roztrhnuta svrchní kutikula a automatickou pipetou se co nejrychleji odsály 3 μl hemolymfy (2,5 μl při „Bead aggregation assay“). Při odsávání byla hemolymfa v pipetě důkladně promíchána, aby byla směs homogenní pro další použití a v poslední řadě pro aktivaci látek podílejících se na srážení hemolymfy.

3.8. Srážení v kapce (Hanging drop assay)

Pomocí metody „Hanging drop“ (Lesch *et al.*, 2007; Bidla *et al.*, 2005) byla testována schopnost jednotlivých proteinů IDGF a jim příbuzných zachránit koagulační deficit *IDGF3 nulového* mutanta a vytvořit sraženinu v kapce Ringerova roztoku.

Bez míchání se do připravené 15 μ l kapky Ringerova roztoku na diagnostickém sklíčku „multiwell 10“ (Thermo Scientific, 6,7 mm, ER-308B-CE24) přenesly 3 μ l čerstvě odebrané hemolymfy (viz výše 3.7.). Sklíčko se otočilo o 180° kapkou dolů a vše se nechalo inkubovat 30 min pro vytvoření sraženiny ve vlhké komůrce. Nakonec byl z vrcholku kapky kulatým krycím sklem opatrně sňat vzorek roztoku s koagulátem či bez něj, který byl pozorován na podložním skle pod mikroskopem (Zeiss LSM 780) s diferenciálním interferenčním kontrastem (Nomarski DIC).

3.9. Imunohistochemie koagulátu protilátkou a lektinem

Nejprve byly z larev linie *Canton S* připraveny vzorky koagulátů dle protokolu na „Hanging drop assay“ (viz výše 3.8.), s tím rozdílem, že sraženiny byly z kapky chytány na měděnou mřížku pro elektronovou mikroskopii (electron grid).

Samotná imunohistochemická detekce probíhala v kapkách různých roztoků na parafilmové pásce ve vlhké komůrce. Jednotlivá mřížka pro elektronovou mikroskopii s naneseným koagulátem byla zpracována následujícím způsobem:

- 1) Nejprve se tato mřížka dala na 10 min fixovat do kapky 4% paraformaldehyd v 10 \times PBS (Phosphate Buffered Saline) (10 μ l).
- 2) Pro odstranění fixáže byla 2 \times inkubována na 10 min v 1 \times PBS (50 μ l).
- 3) Dále pak byly vzorky blokovány 1 hod v 1% BSA (hovězí sérum albumin) v 1 \times PBS (20 μ l).
- 4) Následně byly vzorky inkubovány přes noc ve 4 °C s primární protilátkou (králičí Anti-IDGF3, IDGF2 nebo IDGF1 dle Kučerová *et al.*, 2016, Brož *et al.*, 2017 a Žurovec nepublikováno) v 1% BSA v 1 \times PBS (25 μ l), jenž byla v poměru 1:50.
- 5) Další den byly vzorky 2 \times po 10 min omyty od primární protilátky v 1 \times PBS (50 μ l).

- 6) Vzorčky byly 1 hod inkubovány se sekundární protilátkou (oslí „Anti Rabbit“ značená Alexa Fluor 568) v 1× PBS (28 µl) v poměru 1:200 v temné komůrce (inkubace všech následujících kroků již probíhala ve tmě).
- 7) Následně byly vzorčky omyty 10 min v 1× PBS (50 µl).
- 8) Na 10 min byly inkubovány s PNA (arašídový aglutinin) lektinem konjugovaným s fluorescentní barvou FITC (10 µl) o hmotnostní koncentraci 50 µg/µl.
- 9) A opět byly 1× vzorčky omyty na 10 min v 1× PBS (50 µl).
- 10) K penetraci buněk a „solubilizaci“ jejich membránových proteinů byl použit detergent 0,1% Triton v 1× PBS (30 µl) na 10 min.
- 11) Následně byly obarveny jádra buněk pomocí DAPI v poměru 1:1000 v 1× PBS s 0,1% Tritonem (10 µl).
- 12) Nakonec byly vzorčky naposledy omyty 10 min v 1× PBS (50 µl) a zafixovány v 30 µl „fluoromount G“ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) mezi krycí a řádně popsané podložní sklíčko. Takto obarvené vzorčky byly následně pozorovány a vyhodnoceny na konfokálním mikroskopu.

3.10. „Bead Aggregation Assay“

„Bead aggregation assay“ (Kučerová *et al.*, 2016; Lesch *et al.*, 2007; Scherfer *et al.*, 2004) je metoda, která umožňuje kvantifikovat míru srážení hemolymfy pomocí paramagnetických kuliček „Dynabeads“ (M-280, obsahující tosylové funkční skupiny, o standardní velikosti 2,8 µm, Dynal Biotech ASA).

Před vlastním experimentem bylo nutné tyto paramagnetické kuličky o koncentraci $2,0 \times 10^9$ kuliček/ml blokovat v 1% BSA v 1× PBS pro zabránění nespecifické aglutinace kuliček. Nejprve se tedy potřebné množství kuliček (ml) promylo pipetou 2 min ve 4× větším objemu 10× PBS. Následně byl pomocí silného magnetu, který kuličky srazil ke dnu mikrozkušavky, promývací roztok vyměněn za blokující 1% BSA v 1× PBS stejného objemu jako byl originální roztok kuliček. Takto připravené kuličky se inkubovaly přes noc při 4 °C.

Na sklíčku „multiwell 10“ (Thermo Scientific, 6,7 mm, ER-308B-CE24) se smíchalo 10 µl Ringerova roztoku a 5 µl připravených vyblokováných kuliček. Z 6 pozdních L3 larev *Drosophila melanogaster* se odebralo 2,5 µl hemolymfy (viz výše 3.7.), a ta se řádně 30 s promíchala s kuličkovou suspenzí. Takto připravený vzorek se vždy nechal 2 min inkubovat

při pokojové teplotě pro dostatečné vysrážení hemolymfy a následně se ihned vyfotil pod binokulární lupou vždy za stejných podmínek. Výsledky pak byly vyhodnoceny v programu „Image J“ spočítáním průměrné velikosti vzniklých agregátů pomocí aplikace „Analyze particles“.

3.11. SDS-PAGE

Odebraná hemolymfa (viz výše 3.7.) byla v poměru 1:39 promíchána s 1× RIPA pufrem smíchaného v poměru 4:1 s 1× nanášecím pufrem a ihned byla zamrazena pro zamezení degradace proteinů. Takto připravené vzorky byly později separovány vertikální elektroforézou SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis) složené ze „zaostřovacího“ (stacking) a separačního gelu zalitého v 1× SDS-PAGE pufrem.

Při přípravě separačního gelu bylo smícháno 6,26 ml dH₂O, 3,75 ml separačního pufru a 5 ml akrylamidu (akrylamid:bisakrylamid v poměru 29:1). Pro odstranění přebytečných vzduchových bublin byla tato směs v mikrovlnné troubě přivedena k varu, dále na ledu zchlazena, a nakonec byla do směsi přidána polymerační činidla – 11,5 µl TEMED (tetramethylethyldiamin, USB) a 120 µl 10% APS (persulfátu amonného; Serva). Takto připravená směs byla po krátkém promíchání ihned napipetována mezi skla aparatury do výšky asi 1 cm pod hřebínky (viz níže) a byla převrstvena isopropanolem pro vyhlazení nerovností. Po ztuhnutí gelu byl isopropanol smyt destilovanou vodou.

„Zpolymerizovaný“ separační gel byl až po okraj aparatury převrstven „zaostřovacím“ gelem, jehož příprava probíhala stejným způsobem jako u separačního gelu ovšem s rozdílem množství přidávaných látek a jiného pufru. Pro přípravu bylo tedy potřeba 4,5 ml dH₂O, 1,88 ml „stacking“ pufru a 1 ml akrylamidu (akrylamid:bisakrylamid v poměru 29:1). Po zahřátí a následném zchlazení této směsi byly opět přidány polymerační činidla – 10 µl TEMED a 30 µl APS. Ihned po převrstvení byl do výřezu mezi skla v aparatuře umístěn hřebínek pro vytvoření jamek.

Do jamek takto připraveného gelu byly po 20 µl napipetovány jednotlivé vzorky a pro prvotní zaběhnutí vzorků do gelu bylo do aparatury zalité 1× SDS-PAGE pufrem na 30 min přivedeno napětí 60 V. Na samotnou separaci bylo napětí zvýšeno na 90 V na přibližně 2 hod, dokud čelo vzorku značené bromfenolovou modří neuniklo z gelu. Po separaci byl výsledný gel dále použit k analýze metodou Western blot (viz níže 3.12.).

3.12. Western blot

Před použitím byla nylonová membrána (hybond P) namočena asi na 20 s do 100% metanolu, řádně opláchnuta v dH₂O asi 2 min a následně ponořena do 1× elektrotransferového pufru minimálně na 5 min. V této lázni byla membrána přitisknutá na gel se separovanými proteiny z SDS-PAGE (viz výše 3.11.) a společně s gelem byla vložena mezi soustavu tvořenou tvrdým filtračním papírem, drátěnými houbičkami a plastovými destičkami, které tuto soustavu pevně zafixovaly. Pro přenos proteinů, jenž probíhá směrem ke kladnému náboji, byla takto zkompletovaná soustava nainstalována do transferové aparatury tak, aby gel směřoval k záporné katodě a membrána ke kladné anodě. Za stálého míchání byl přes noc v ledem chlazené aparatuře spuštěn elektropřenos v 1× transferovém pufru při napětí 35 V.

Po přenosu byla membrána vyjmuta ze všech vrstev, opláchnuta dH₂O a zpracována dle následujícího postupu:

- 1) Za stálého míchání byla blokována 1-2 hod v 5% BSA v 1× PBS s 0,05% TWEEN 20 detergentem.
- 2) Dále byla na třepačce membrána 3× po 5 min opláchnuta v 1× PBS s 0,05% TWEEN 20.
- 3) Poté byla membrána 1 hod inkubována s primární protilátkou (králičí) ředěnou v poměru 1:1000 v 5% BSA s 1x PBS a 0,05% TWEEN 20. Byly používány polyklonální protilátky proti IDGF3 (Kučerová *et al.*, 2016), IDGF2 (Brož *et al.*, 2017) a IDGF1 (Žurovec nepublikováno).
- 4) Membrána se znovu opláchla 3× po 5 min v 1× PBS s 0,05% TWEEN 20.
- 5) Následně se membrána inkubovala 30 min se sekundární protilátkou (oslí Anti králičí), jenž byla ředěna v poměru 1:5000 v 5% BSA v 1× PBS a 0,05% TWEEN 20.
- 6) Membrána pak byla naposledy 3× po 5 min omyta v 1× PBS s 0,05% TWEEN 20.

K detekci proteinů značenými sekundární protilátkou konjugovanou s křenovou peroxidázou byl dle návodu výrobce použit substrát z „Thermo SuperSignal kit“ (inkubace suché membrány 5 min v plastové fólii). Vizualizace a pořízení snímku membrány poté probíhala na přístroji "LAS-3000 Imager" (Fujifilm).

3.13. Složení pufřů

50× TAE pufr - 2 M Tris; 1 M ledová kyselina octová; 50 mM EDTA o pH 8,0

1× TAE pufr – 40 mM Tris; 20 mM ledová kyselina octová; 1 mM EDTA o pH 8,0

10× PBS - 1,37 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na₂HPO₄; 18 mM KH₂PO₄; pH 7,4

1× PBS – 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4

separační pufr – 1,5 M Tris; 2% SDS; dH₂O pro doplnění objemu na 1 l; pH je pomocí HCl upraveno na 8,8

„stacking“ pufr – 1,0 M Tris; 2% SDS; dH₂O pro doplnění objemu na 1 l; pH je pomocí HCl upraveno na 6,8

1× RIPA pufr - 150 mM NaCl; 1.0% NP-40; 0.5% deoxycholát sodný; 0.1% SDS (sodium dodecyl sulfate); 50 mM Tris-HCl o pH 8.0; inhibitor proteáz PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride); dH₂O pro doplnění objemu na 100 ml

6× nanášecí pufr (Sample buffer) - 250 mM TrisHCl; 10% SDS; 30% glycerol; 5% β-merkaptotanol; 0,02% bromfenolová modř; dH₂O pro doplnění objemu na 100 ml

1× nanášecí pufr – 41,67 mM TrisHCl; 1,67% SDS; 5% glycerol; 0,83% β-merkaptotanol; 0,003% bromfenolová modř

10× SDS-PAGE pufr – 250 mM Tris; 1,92 M glycin; 1.0% SDS pH 8.3; dH₂O pro doplnění objemu na 1 l

1× SDS-PAGE pufr – 25 mM Tris; 192 mM glycin; 1.0% SDS pH 8.3; dH₂O pro doplnění objemu na 1 l

10× elektrotransferový pufr – 250 mM Tris; 1,92 M glycin; dH₂O pro doplnění objemu na 1 l

1× elektrotransferový pufr – namíchaný v poměru 2:7:1 – 100% methanol, dH₂O a 10× elektrotransferový pufr

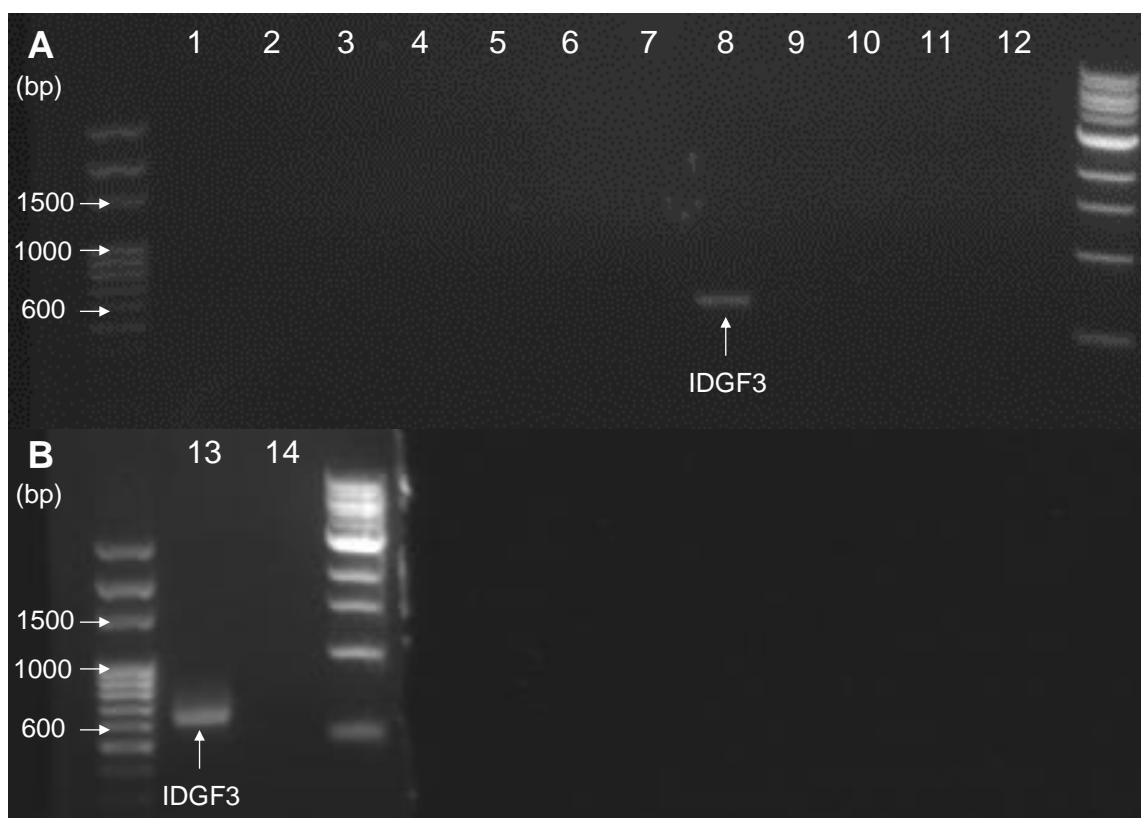
4. VÝSLEDKY

4.1. Ověření genotypů linií *Drosophila melanogaster*

Pro vyloučení kontaminace užívaných linií a spolehlivost výsledků, byly v průběhu výzkumu pomocí PCR prověřeny linie *IDGF3^{L1}* mutanta (z více chovů). Linie, které testem neprošly byly v následujících experimentech používány jako negativní kontrola. Mimoto pak byly prověřeny i linie obsahující transkripční faktor *Gal4* pod hemolektinovým promotorem (*hml*).

K amplifikaci příslušných genových sekvencí při PCR byly použity primery specifické pro *IDGF3*, *Gal4* a *rp49*. Výsledné amplifikované fragmenty odpovídaly očekávaným velikostem sledovaných sekvencí *IDGF3* - 680 bp, *Gal4* - 364 bp a *rp49* - 150 bp.

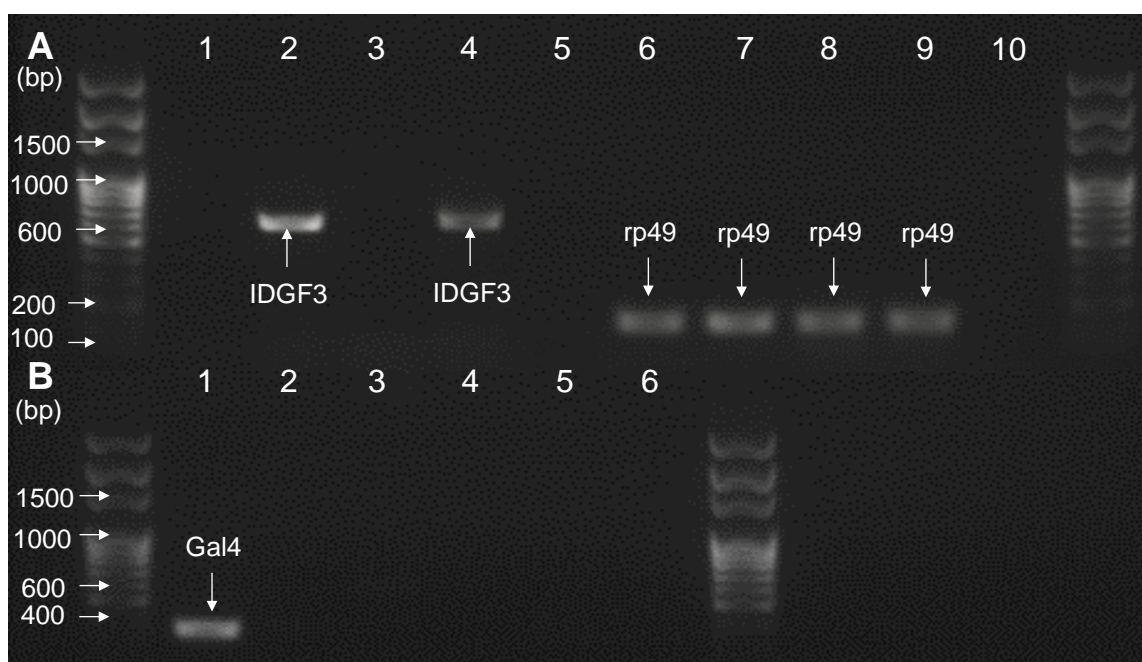
Z ověření čistoty linií *IDGF3^{L1}* mutantů z různých chovů (Obr. 1) je zřejmé, že linie z chovu a) (chov užívaný v tomto výzkumu) a c) (hlavní rezervní chov laboratoře ENTÚ) byly



Obr. 1: Výsledky PCR kontroly čistoty linií *IDGF3^{L1}* mutantů *D. melanogaster* ze 3 linií laboratoře ENTÚ. A - *IDGF3*: 1-4 z chovu a) - negativní; 5-8 z chovu b) - 5-7 negativní, 8 pozitivní; 9-12 z chovu c) - negativní. B - *IDGF3*: 13 pozitivní kontrola *w¹¹¹⁸* - pozitivní; 14 negativní kontrola *dH₂O* - negativní.

v pořádku. Pouze u jednoho vzorku z chovu b) (sekundární chov laboratoře ENTÚ) se vyskytla kontaminace (vzorek č. 8), která byla následně včas podchycena a nahrazena čistou linií.

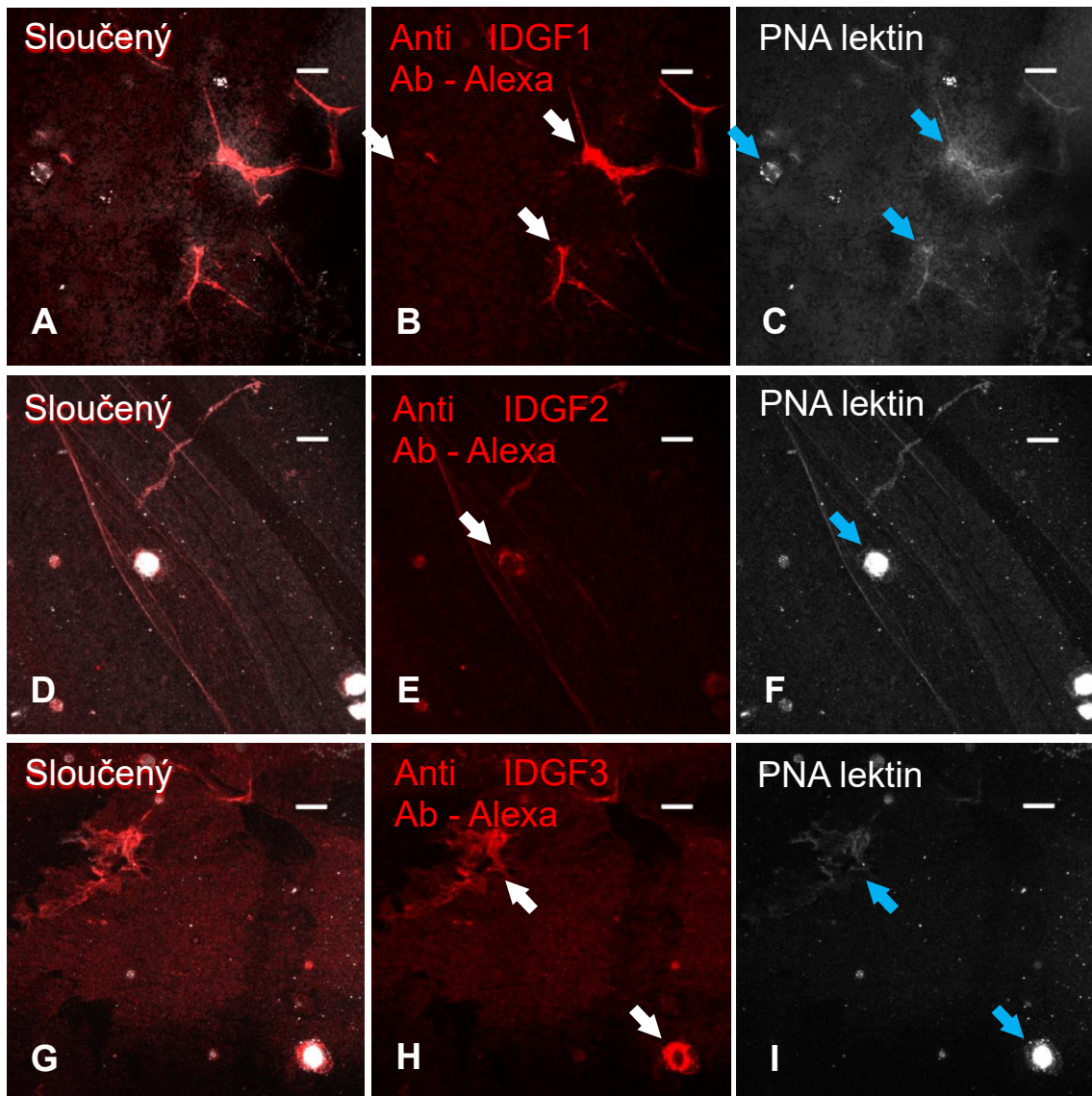
Kontrolní PCR linií *IDGF3^{L1}* mutantů a linií *Gal4* (Obr. 2) potvrdila genotypy užívaných linií. Pouze v případě linie *w; +; hml-Gal4* nebyl detekován žádný *Gal4* fragment. Jelikož však byla tato linie v tomto výzkumu používána jen jako pozitivní kontrola přirozeně produkující IDGF proteiny, nebyl tento faktor limitujícím a nijak neovlivnil výzkum.



Obr. 2: Výsledky PCR kontroly čistoty linií *IDGF3^{L1}* mutantů a linií *Gal4* *D. melanogaster*. A - (1-5) IDGF3: 1 (*w; Idgf3^{L1}; hml-Gal4*) - negativní; 2 (*w; +; hml-Gal4*) - pozitivní; 3 (*w; Idgf3^{L1}; +*) - negativní; 4 pozitivní kontrola *w¹¹¹⁸* - pozitivní; 5 negativní kontrola *dH₂O* - negativní; (6-10) rp49: 1 (*w; Idgf3^{L1}; hml-Gal4*) - pozitivní; 2 (*w; +; hml-Gal4*) - pozitivní; 3 (*w; Idgf3^{L1}; +*) - pozitivní; 4 pozitivní kontrola *w¹¹¹⁸* - pozitivní; 5 negativní kontrola *dH₂O* - negativní. B - (1-6) Gal4: 1 (*w; Idgf3^{L1}; hml-Gal4*) – pozitivní; 2 (*w; +; hml-Gal4*) – negativní; 3 negativní kontrola *wt* - negativní; 4 negativní kontrola *dH₂O* – negativní; 5-6 negativní kontrola *w¹¹¹⁸* - negativní.

4.2. Lokalizace IDGF proteinů v koagulátu hemolymfy

Pomocí imunohistochemické metody barvení byly primární králičí Anti IDGF1-3 a sekundární oslí Anti králičí protilátkou lokalizovány v koagulátu hemolymfy linií *Canton S D. melanogaster* IDGF1-3 proteiny. Mimoto byl jako nástroj pro detekci sacharidů použit fluorescenčně značený PNA lektin, jenž je specifický pro sacharidovou složku Gal- β (1-3)-GalNAc (Obr. 3).



Obr. 3: Imunohistochemická lokalizace IDGF1-3 proteinů v koagulátu hemolymfy linií *Canton S D. melanogaster* pomocí IDGF1-3 protilátek a PNA lektinu (specifického pro Gal- β (1-3)-GalNAc). A-C: vzorek sraženiny barvený Anti IDGF1 protilátkou a PNA lektinem. D-F: vzorek sraženiny barvený Anti IDGF2 a PNA lektinem. G-I: vzorek sraženiny barvený Anti IDGF3 a PNA lektinem. Pomocné šipky označují obarvený koagulát a hemocyty. Měřítko: 20 μ m (A-I).

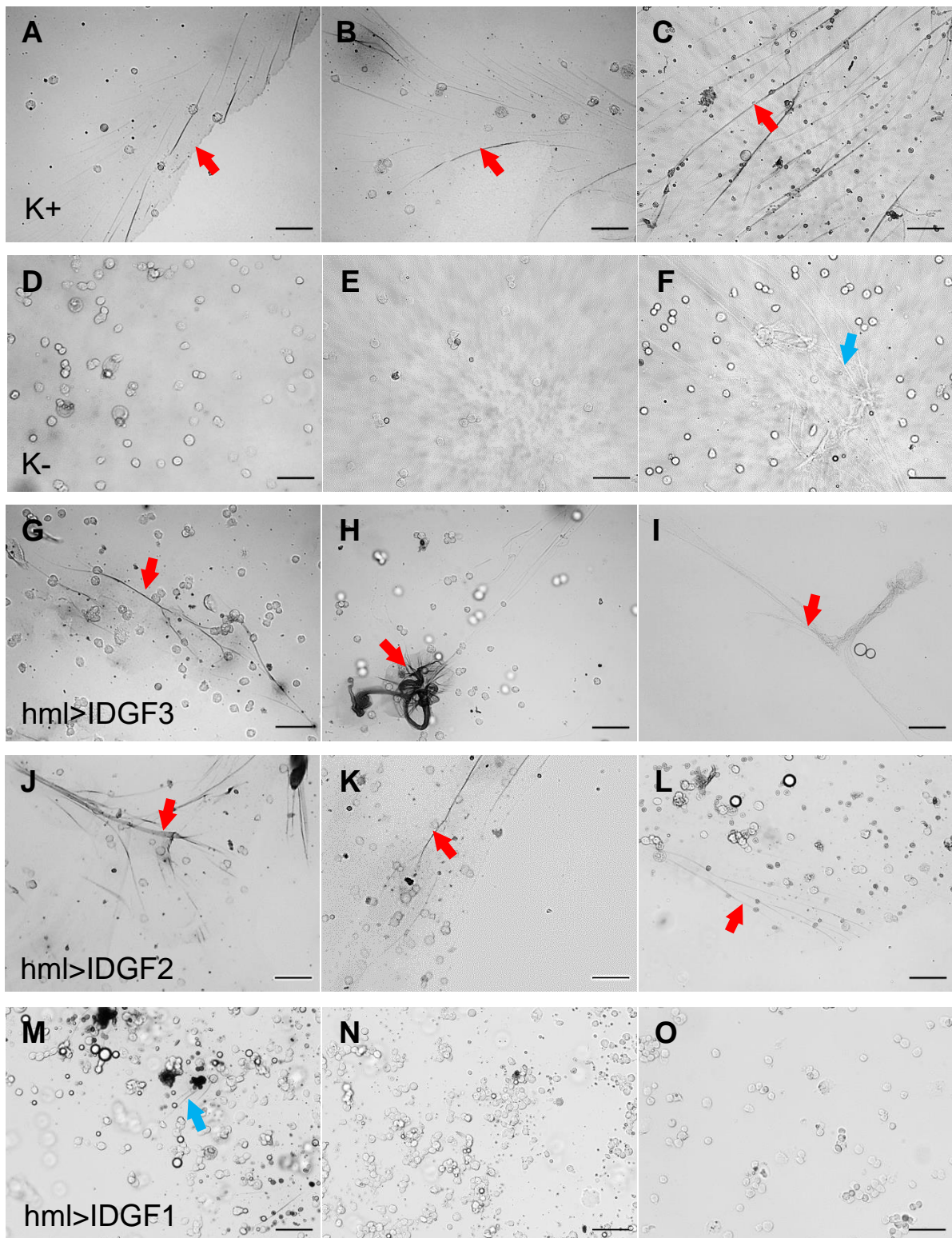
Kromě IDGF proteinů, byl ve sraženině hemolymfy detekován i PNA lektin. Jeho distribuce v koagulátu se od IDGF proteinů však nepatrně lišila. Mimoto se tyto proteiny nacházely i v hemocytech, přičemž IDGF proteiny byly detekovány spíše po obvodu hemocytu a PNA lektin byl spíše v jeho středu (Obr. 3).

4.3. Záchrana fenotypu spojeného se srážením hemolymfy IDGF3^{L1} mutantu

Detekce IDGF1-3 proteinů v koagulátu *D. melanogaster* naznačovala, že se tyto proteiny alespoň z malé části koagulace účastní. Pro studium jejich vlivu na srážení hemolymfy byla tedy genetickými metodami provedena záchrana koagulačního deficitu u IDGF3 nulového mutantu. Tato záchrana jednotlivými IDGF proteiny a jim příbuzných byla stanovena metodou „Hanging drop“ a byla provedena vždy v několika sériích opakování (viz výše 3.8.).

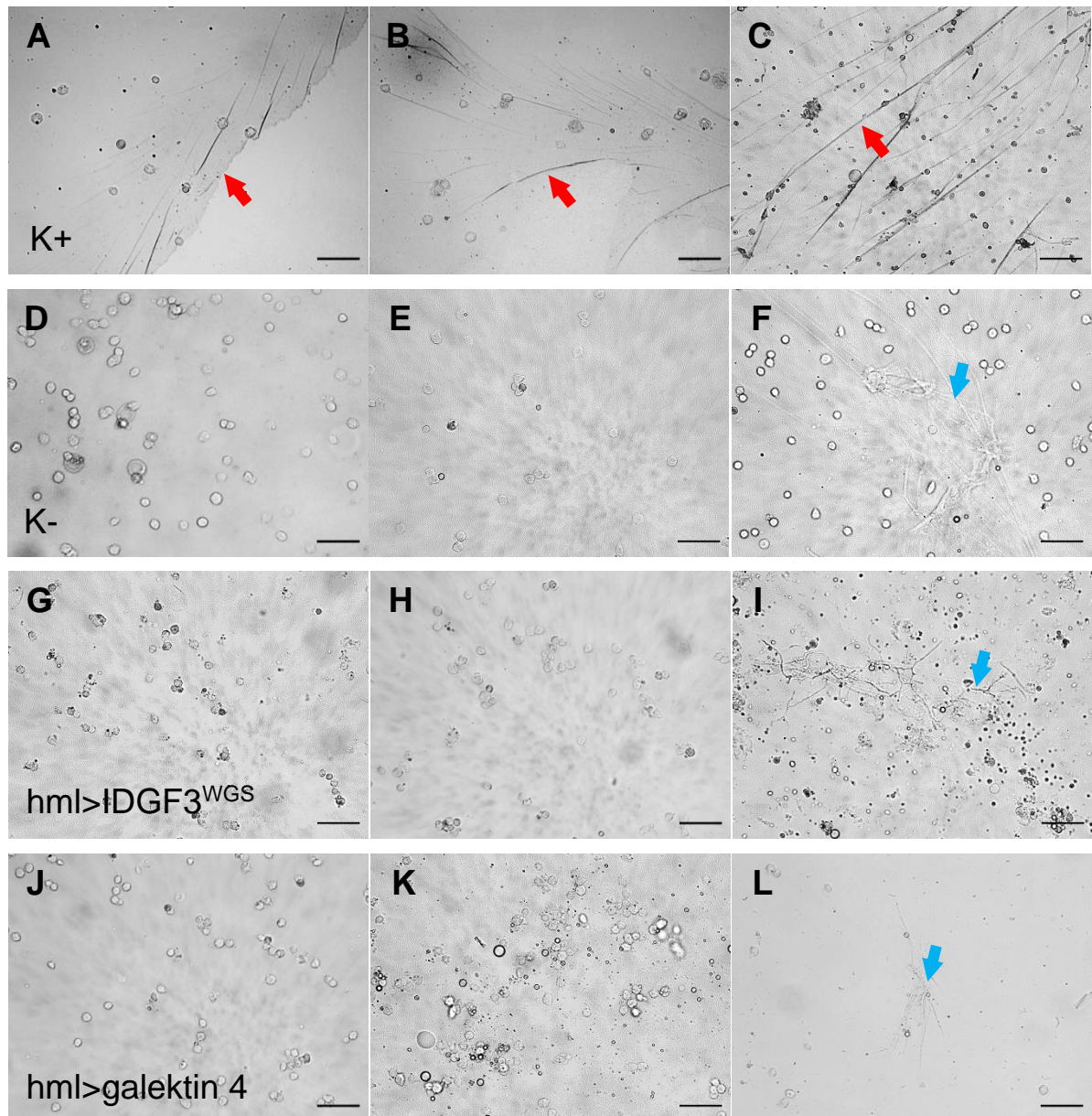
Jako pozitivní kontrola byl použit IDGF3^{L1} heterozygot ($w; \frac{Idgf3^{L1}}{+}; \frac{hml-Gal4}{+}$), který v kapce Ringerova roztoku tvořil „záclonku“ pevného a kompaktního koagulátu (Obr. 4 A-C, Obr. 5 A-C). K tomu jako negativní kontrola byl použit IDGF3^{L1} mutant ($w; Idgf3^{L1}; \frac{hml-Gal4}{+}$). Ten naopak nebyl schopen náležité koagulace, jeho hemocyty volně plavaly ve vícero vrstvách, a tvořil pouze jemné sraženiny či útvary jim podobné, které však byly k tvorbě „pevného koagulátu“ nedostatečné (Obr. 4 D-F, Obr. 5 D-F).

Abychom zjistili, zda proteiny IDGF mají redundantní funkci, připravili jsme záchranné konstrukty s nadprodukcí IDGF1 a IDGF2. Jak je zřejmé z Obr. 4, nadprodukovaný IDGF3 protein a stejně tak IDGF2 protein byl schopen vytvořit „pevný koagulát“ a zachránit tak koagulační deficit IDGF3^{L1} mutantu (Obr. 4 G-I, J-L). Naopak „overexprimovaný“ protein IDGF1 záchrany nebyl schopen (Obr. 4 O-N). V tomto případě hemocyty volně plavaly ve vícero vrstvách a žádný „pevný koagulát“ se zde nenacházel. Nicméně, tvořil se pouze něco jako náznak sraženiny, která však vzhledem k silné melanizaci mohla být rovněž způsobena nadměrnou činností PPO (Obr. 4 M).



Obr. 4: Fenotypová záchrana $IDGF3^{L1}$ mutanta „overexpresí“ IDGF1-3 proteinů pomocí UAS-Gal4 systému. Tato záchrana byla provedena metodou „Hanging drop“ a její mikroskopické snímky byly vizualizovány Nomarského diferenciálním interferenčním kontrastem (DIC). A-C: K^+ - pozitivní kontrola $IDGF3^{L1}$ heterozygot. D-F: K^- - negativní kontrola $IDGF3^{L1}$ mutant. G-I: $hml>IDGF3$ - pozitivní. J-L: $hml>IDGF2$ - pozitivní. M-O: $hml>IDGF1$ - negativní. Měřítko: 40 μm (A-O). Červené šipky označují „pevné koaguláty“ a modré šipky jemné sraženiny.

Abychom ověřili význam glykosylace IDGF3 proteinu pro jeho správnou funkci, připravili jsme mouchu produkující mutantní formu IDGF3 bez glykosylačního místa (IDGF3^{WGS}). Ve výsledných vzorcích "overexprimovaného" IDGF3^{WGS} se nevytvořil žádný „pevný koagulát“ a hemocyty volně plavaly ve více vrstvách (Obr. 5 G-I). Ojedinele se zde objevovaly pouze náznaky jemných sraženin, které však byly zpozorovány i u negativní kontroly. Očividně tedy IDGF3^{WGS} jako záchranný konstrukt nefungoval.



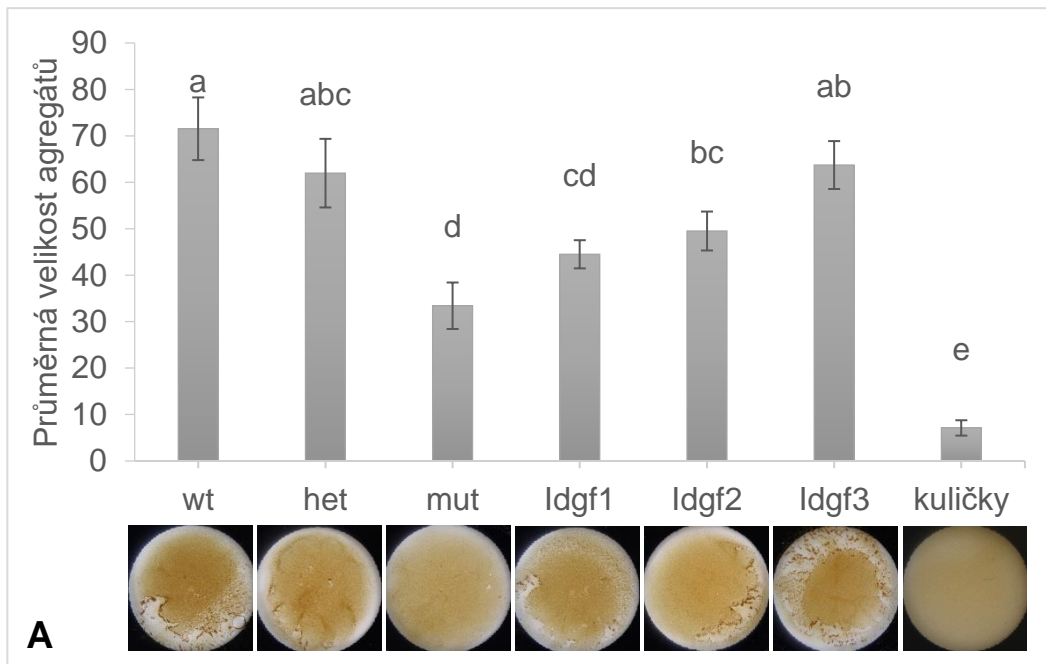
Obr. 5: Fenotypová záchrana IDGF3^{L1} mutanta „overexpresí“ proteinu IDGF3^{WGS} (IDGF3 bez glykosylačního místa) a myšičí galektinu 4 (specifického pro Gal-β) pomocí UAS-Gal4 systému. Tato záchrana byla provedena metodou „Hanging drop“ a její mikroskopické snímky byly vizualizovány Nomarského diferenciatním interferenčním kontrastem (DIC). A-C: K+ - pozitivní kontrola IDGF3^{L1} heterozygot. D-F: K- - negativní kontrola IDGF3^{L1} mutant. G-I: *hml>IDGF3^{WGS}* - negativní. J-L: *hml>galektin 4* - negativní. Měřítka: 40 μm (A-L). Červené šipky označují „pevné koaguláty“ a modré šipky jemné sraženiny.

Pro napodobení koagulačního účinku IDGF3 proteinu byla užita i „overexprese“ myšího galektinu 4, jež má cukr-vázající specifitu podobnou jako IDGF2 (Gal-β) (Brož, nepublikováno) (Obr. 5 J-L). Galektin 4 však koagulační deficit *IDGF3^{L1}* mutanta rovněž nebyl schopen zachránit. Jako u negativní kontroly i zde volně plavaly hemocyty ve vícero vrstvách a sporadicky zde byly pozorovány pouze jemné sraženiny, které ovšem nebyly schopné utvořit „pevný koagulát“.

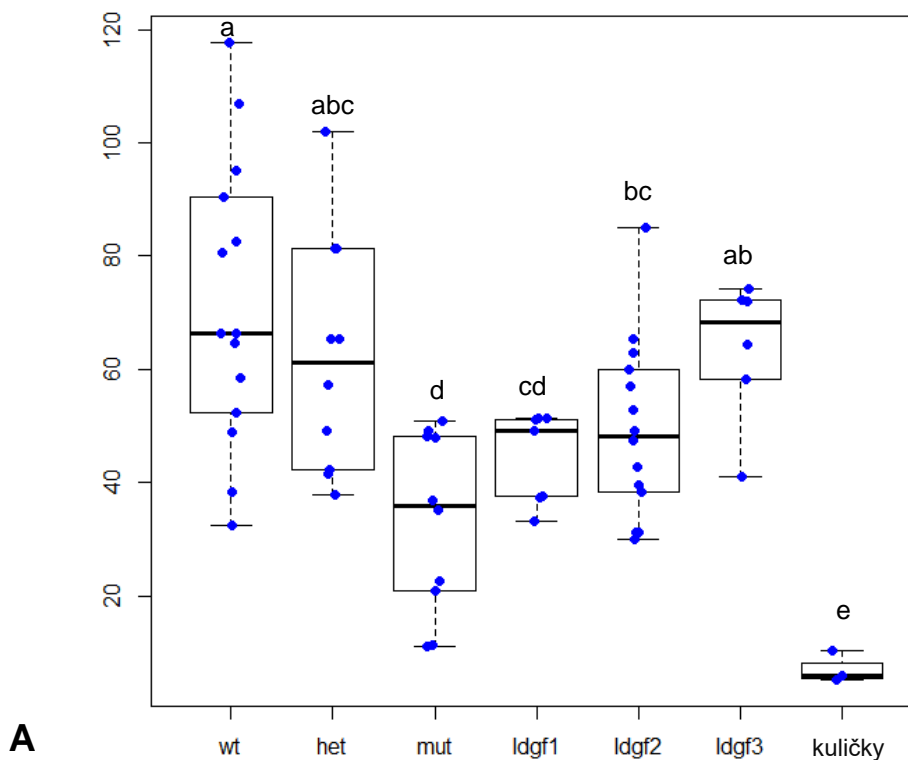
4.4. Kvantifikace srážení hemolymfy při použití záchranných konstruktů pro *IDGF3^{L1}*

Vzhledem k předchozím výsledkům bylo zřejmé, že „overexprimované“ proteiny IDGF3 a IDGF2 jsou schopny zachránit koagulační deficit mutanta *IDGF3^{L1}*, kdežto protein IDGF1 spíše nikoliv. Nicméně nebylo jasné, zda byla kvalita koagulátu v rámci sledovaného genotypu totožná či byla v některém případě míra srážení rozdílná. Proto byla tato míra srážení jednotlivých genotypů kvantifikována (Obr. 6; Obr. 7) pomocí metody „Bead aggregation assay“ (viz výše 3.10.).

Výsledky kvantifikace jsou shrnuty v Obr. 6 a Obr. 7, které pro názornost prezentují totožné hodnoty jinými způsoby. Bylo zjištěno, že „overexprimovaný“ normální IDGF3 protein dokáže srážet hemolymfu téměř stejnou mírou jako „wild type“ a *IDGF3^{L1}* heterozygot, a tedy nejefektivněji ze sledovaných IDGF proteinů. O něco méně srážel „overexprimovaný“ protein IDGF2. Ten byl schopen vyrovnat se efektu *IDGF3^{L1}* heterozygota a IDGF3 proteinu, avšak jeho účinek se od účinku hemolymfy z „wild type“ linie již statisticky lišil (Obr. 6; Obr. 7). Nejméně efektivně agregoval „overexprimovaný“ IDGF1 protein, který se v tomto testu signifikantně nelišil od *IDGF3^{L1}* mutanta, IDGF2 proteinu, ale překvapivě ani od *IDGF3^{L1}* heterozygota (Obr. 6; Obr. 7). A naopak se lišil od IDGF3 proteinu a hemolymfy z „wild type“ linie. Z Obr. 6 a Obr. 7 je zřejmé, že jediná skupina vzorků, jenž se na první pohled lišila od všech skupin, byla kontrola – samotné kuličky bez příměsi hemolymfy.



Obr. 6: Srovnání míry srážení hemolymfy „wild type“ larev, kontrolních linií a $IDGF3^{L1}$ záchranných linií s „overexpresí“ $IDGF1-3$ proteinů a kvantifikace pomocí kuliček „Dynabeads“ (M-280, obsahující tosylové funkční skupiny, o standardní velikosti $2,8 \mu\text{m}$, Dynal Biotech ASA). Snímky byly pořízeny pod binokulární lupou vždy při totožném zvětšení, intenzitě světla a nastavení fotoaparátu tak, že byla zachycena celá oblast jamky s kuličkami a přidanou hemolymfou. A: wt - „wild type“ - pozitivní kontrola; het - $IDGF3^{L1}$ heterozygot - pozitivní kontrola; mut - $IDGF3^{L1}$ mutant - negativní kontrola; Idgf1 - $hml > IDGF1$; Idgf2 - $hml > IDGF2$; Idgf3 - $hml > IDGF3$; kuličky - kuličky bez přidané hemolymfy. Písmeny označené signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly vyhodnoceny Kruskal-Wallis testem ($p < 0,001$) následovaným párovým Wilcoxon testem ($p < 0,05$).



Obr. 7: Srovnání průměrných velikostí agregátů kuliček „Dynabeads“ (M-280, obsahující tosylové funkční skupiny, o standardní velikosti 2,8 μm , Dynal Biotech ASA) smíchanými s hemolymfou „wild type larev“, kontrolních linií či $IDGF3^{L1}$ záchranných linií s „overexpresí“ $IDGF1-3$ proteinů. A: wt - „wild type“ - pozitivní kontrola; het - $IDGF3^{L1}$ heterozygot - pozitivní kontrola; mut - $IDGF3^{L1}$ mutant – negativní kontrola; Idgf1 - $hml>IDGF1$; Idgf2 - $hml>IDGF2$; Idgf3 - $hml>IDGF3$; kuličky - kuličky bez přidané hemolymfy. Modré body označují průměrné velikosti agregátů jednotlivých vzorků. Písmeny označené signifikantní rozdíly mezi jednotlivými skupinami byly vyhodnoceny Kruskal-Wallis testem ($p < 0,001$) následovaným párovým Wilcoxon testem ($p < 0,05$).

Ze shromážděných výsledků provedených experimentů byla vytvořena shrnující tabulka (Tab. III). Ta naznačuje, že na srážení hemolymfy *D. melanogaster* má největší vliv protein $IDGF3$. Dálepak, ačkoliv o něco méně, ale stále poměrně významně, se srážení účastní i $IDGF2$ protein. Protein $IDGF1$ se podle všeho sice koagulace účastní, ale na srážení hemolymfy má nejmenší vliv. Modifikovaný $IDGF3^{WGS}$ protein či ani myší Galectin 4 nakonec jako záchrana nulového $IDGF3$ mutanta nefungoval a hemolymfu nesrážel. Dle předpokladu nejlépe hemolymfu srážela wt kontrola, poté $IDGF3^{L1}$ heterozygot a $IDGF3^{L1}$ mutant hemolymfu nesrážel.

Tab. III: Shrnující tabulka míry srážení hemolymfy *D. melanogaster* záchranných konstruktů a kontrol dle provedených experimentů. Značky + a - znázorňují sílu koagulace.

<u>záchranné konstrukty a kontroly</u>	<u>srážení v kapce</u>	<u>„Bead aggregation assay“</u>
hml>IDGF1	-	+
hml>IDGF2	++	++
hml>IDGF3	+++	+++
hml>IDGF3 ^{WGS}	-	/
hml>galektin 4	-	/
IDGF3 ^{L1} mutant	-	-
IDGF3 ^{L1/+}	+++	+++
+/+	/	++++

5. DISKUSE

Ve srovnání s poznatky o srážení hemolymfy a hojení ran Lepidoptera (*Galleria mellonella*) můžeme obdobně rozlišit průběh koagulace hemolymfy *Drosophila melanogaster* do několika fází. 1) Degranulace hemocytů, 2) agregace koagulačních proteinů (IDGF aj.), hemocytů a jiných komponentů primární sraženiny zpevněné činností Tg, 3) aktivace PPO kaskády a s ní spojené další zpevnění sraženiny, a nakonec 4) chemotaxe plazmatocytů izolující strup od hemocoelu a regenerace tkáně. (Theopold *et al.*, 2004; Theopold *et al.*, 2014).

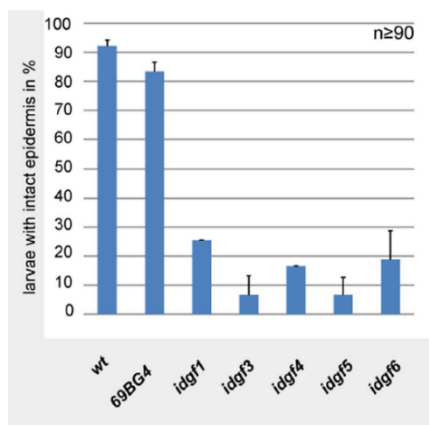
Již dříve bylo objeveno, že IDGF3 je jednou z významných strukturních součástí koagulátu a akumuluje se v blízkosti poranění (Kučerová *et al.*, 2016). Kromě IDGF3 proteinu byla v koagulátu *wt* mouchy (*Canton S*) imunohistochemicky prokázána i přítomnost proteinu IDGF2 a IDGF1 (Obr. 3). IDGF1-3 proteiny byly mimoto detekovány na hemocytech, přesněji po jejich obvodu. Tento výsledek tak může naznačovat, že podobně jako transglutamináza (Schmid *et al.*, 2019) zůstávají IDGF proteiny po uvolnění z hemocytů na membránu vázané či se dodatečně v rámci koagulace vážou na cukerné zbytky jiných membránových glykoproteinů a glykolipidů.

Naproti tomu lokalizace Gal- β (1-3)-GalNAc specifického PNA lektinu v hemocytech se poněkud lišila (Obr. 3). Podobnou distribuci v rámci hemocytů uvádí ve své práci i Lesch *et al.*, 2007 u hemolektinu, jenž se také účastní procesu tvorby „primárního koagulátu“. Hemolektin byl pomocí Anti-hml protilátky detekován ve vezikulech intaktních hemocytů a cytoplasmě již zřejmě degranulovaných (plazmatocytů i krystalových buněk) (Lesch *et al.*, 2007). Stejně jako IDGF proteiny byl PNA lektin detekován i v koagulátu hemolymfy. Je tak docela možné, že by se IDGF proteiny mohly vázat na podobné cukry na bázi galaktózy. Distribuce těchto proteinů v rámci koagulátu byla však mírně odlišná od rozložení PNA lektinu. Proto pro potvrzení této domněnky by byl nutný další výzkum. Tuto závislost IDGF proteinů na galaktóze by bylo možné potvrdit například pomocí glykanového čipu.

Výzkum Kučerová *et al.*, 2016 prostřednictvím metody „Bead aggregation assay“ dříve prokázal, že *IDGF3^{LI}* mutant vykazuje známky defektu při tvorbě sraženiny a žádnou nevytváří. Nicméně ektopickou expresí IDGF3 proteinu byl tento fenotyp zachráněn (Kučerová *et al.*, 2016). Na tomto principu byl postaven i tento výzkum. Pomocí „overexpresních“ záchranných linií byla metodami „Hanging drop“ a „Bead aggregation

assay“ verifikována fenotypová záchrana *IDGF3^{Ll}* pomocí intaktního proteinu IDGF3 a nově prověřena i záchrana pomocí IDGF2 a IDGF1 (Obr. 4; Obr. 6; Obr. 7). Dle předpokladů bylo potvrzeno, že „overexprimovaný“ IDGF3 protein na pozadí *IDGF3^{Ll}* mutanta je schopen se funkčně vyrovnat *IDGF3^{Ll}* heterozygotovi či *wt* a obnovit svůj fenotyp (Obr. 6 a Obr. 7). Zároveň však dle předpokladu heterozygot s jednou funkční alelou byl o něco méně účinný než nejefektivněji koagulující *wt* linie, což by korespondovalo i se zjištěným porovnáním míry exprese (viz níže Appendix 8.1, Obr. 10). Tento výsledek je tak v souladu s již dříve vyslovenou hypotézou, že míra koagulace koreluje s množstvím exprimovaného IDGF3 proteinu (Kučerová *et al.*, 2016). Dále bylo objeveno, že IDGF2 je rovněž schopen zachránit defekt *IDGF3^{Ll}* mutanta a tvoří poměrně „pevný koagulát“ (Obr. 4). Naopak IDGF1 protein této záchrany nebyl schopen. Ačkoliv u jednoho vzorku tvořil pouze něco jako náznak sraženiny, nedalo se říct, že by stačil plně zastoupit funkci IDGF3 proteinu. Navíc tento náznak sraženiny mohl být vzhledem k zjevné silné melanizaci způsoben nadměrnou činností PPO (Theopold *et al.*, 2004). Tyto výsledky byly tak i relativně v souladu s výsledky kvantifikace míry srážení hemolymfy pomocí metody „Bead aggregation assay“ (Obr. 6 a Obr. 7). Ačkoliv se při koagulaci hemolymfy IDGF1 tedy neuplatňuje tolik jako IDGF2 nebo IDGF3 protein, znamená to, že jednotlivé IDGF proteiny jsou do různé míry funkčně redundantní.

Je pozoruhodné, že v práci Kawamura *et al.*, 1999, kde byly k testům pro schopnost aktivovat růst buněk *in vitro* použity rekombinantní IDGF1 a IDGF2 proteiny připravené v bakteriálním expresním systému, tedy bez posttranslačních modifikací. V testech na stimulaci růstu buněk tyto proteiny fungovaly a u IDGF2 se tento vliv navíc ukázal jako na množství závislý (Kawamura *et al.*, 1999). Mimo funkční redundantnost při srážení hemolymfy tato práce tak rovněž naznačuje redundantnost IDGF proteinů také v rámci proliferace buněk *in vitro*. Redundance mezi proteiny IDGF byla pozorována i při výzkumu další fenotypické vlastnosti – vytváření kutikuly (Pesch *et al.*, 2016). RNAi jednotlivých IDGF měla podobné účinky, přičemž v tomto případě se zdá být IDGF3 nejslabší (Obr. 8). Mohlo by to znamenat, že se mohou překrývat do určité míry a specializují se na odlišné funkce.



Obr. 8: Účinek RNAi IDGF proteinů a jejich vliv na integritu epidermální kutikuly následkem poranění. Převzato a upraveno z publikace od Pesch et al., 2016.

Již několik homologů IDGF proteinů bylo nalezeno v rámci různých druhů hmyzu. Patří mezi ně například AgBR1 a AgBR2 *Anopheles gambiae*, TcIDGF *Tribolium castaneum*, BmIDGF *Bombyx mori* či HAIP *Manduca sexta* (Shi a Paskewitz, 2004; Zhu *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2010; Kanost *et al.*, 1994). HAIP neboli „Hemocyte aggregation inhibitor protein“ byl objeven jako koagulační faktor, jenž, jak již název napovídá, na rozdíl od srážení inhibuje agregaci hemocytů v buněčných kulturách (Kanost *et al.*, 1994). To je ovšem naprosto odlišné chování, než jaké pozorujeme u IDGF proteinů. Možná že si HAIP vyvinul či zachoval tak silnou vazebnou kapacitu, že navázáním na povrch hemocyty vyblokuje a zamezí jejich agregaci. To je však pouze spekulace. Krystalografickou analýzou vazebné domény HAIP a například pokusem vyblokovat tuto doménu jiným substrátem a zamezit tak inhibici agregace hemocytů, by mohlo výrazně přispět při studiu tohoto proteinu.

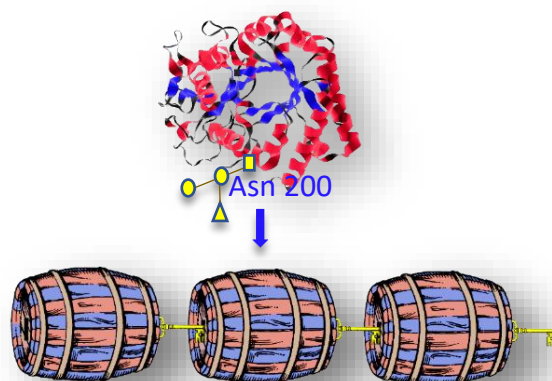
IDGF proteiny jsou sekretované proteiny a jednou z běžných posttranslačních modifikací sekretovaných proteinů a lipidů představuje glykosylace. Ta mimo jiné vytváří vazebná místa pro lektiny a galektiny specifické pro cukerné složky na bázi galaktózy. Vazbou a spojováním těchto glykoproteinů a glykolipidů na površích buněk tvoří galektiny něco jako síť, díky čemuž se podílí na buňčném adhezi, migraci a signalizaci. Podobně jako IDGF proteiny mohou tak galektiny zřejmě regulovat imunitní odpověď, proliferaci, diferenciaci a buňčný osud (Boscher *et al.*, 2011; Krejčířiková *et al.*, 2011). Mezi tyto galektiny patří i galektin 4. Mimo jiné cukerné motivy galektin 4 svými vazebnými doménami (CRD1 a CRD2) váže např. i Galβ1-4(3)GlcNAc a Fuc1-2Galβ1-3(4)-GlcNAc (Ideo *et al.*, 2005), podobající se motivu vázající IDGF2 (Brož, nepublikováno). Navíc bylo prokázáno, že se galektin 4 také spoluúčastní hojení ran v intestinálním traktu (Paclik *et al.*, 2008). Proto byl do tohoto výzkumu zahrnut i myší galektin 4. Aplikací tohoto proteinu pro fenotypovou

záchranu srážení hemolymfy *IDGF3^{L1}* mutanta *D. melanogaster* (Obr. 5) bylo zjištěno, že tento původně myší protein zřejmě není schopen srážet hemolymfu a jako koagulační faktor nefunguje. Je možné, že tak myší galektin 4 v tomto experimentálním modelu *D. melanogaster* není schopen správné funkce, zřejmě díky rozdílnosti imunitních systémů.

Jak již bylo řečeno, IDGF proteiny jsou posttranslačně glykosylovány, a proto v rámci ověření důležitosti glykosylace IDGF proteinů byla v experimentu fenotypové záchrany *IDGF3^{L1}* mutanta použita mimo jiné i linie exprimující modifikované molekuly IDGF3 proteinu bez glykosylačního místa (Obr. 5). Jak se ukázalo, IDGF3 protein postrádající glykosylaci však není schopen vyjma drobných náznaků sraženin vytvořit žádný „pevný koagulát“. Toto zjištění je tak v souladu s naší hypotézou, že se IDGF3 pomocí svého vazebného místa zřejmě váže sám na sebe, respektive se řetězí vazbou na další přirozeně glykosylované IDGF3 molekuly (Obr. 9). IDGF3 protein je pak schopen se aktivně podílet na koagulaci hemolymfy a spolu s ostatními koagulačními faktory a strukturálními komponenty tvořit pevnou sraženinu. Jiným vysvětlením by bylo, že cukerná složka může ale rovněž ovlivňovat správnou strukturu proteinu IDGF, a tak i jeho správnou funkci. V budoucnu by tak bylo zajímavé navrhnout experiment, v němž bychom se pokusili rozluštit, které oligosacharidové motivy je schopen IDGF3 protein rozpoznávat. Například přidáním jiných lektinů či různých oligosacharidových motivů galaktózy zkusit srážení hemolymfy vyblokovat.

IDGF proteiny mají konzervovanou
(β/α)₈-barelovou strukturu:
(Varela *et al.* 2002)

Model agregace IDGF proteinů:



Obr. 9: (β/α)₈-barelová struktura IDGF proteinů a instruktážní model jejich agregace.

Výsledky z provedených experimentů nám prozradily zajímavé informace o IDGF proteinech a jejich účasti při koagulaci hemolymfy. Tab. III tak stručně shrnuje zjištěné poznatky o vlivu jednotlivých zkoumaných proteinů na srážení hemolymfy *D. melanogaster*.

6. ZÁVĚR

Kromě IDGF3 proteinu se koagulace hemolymfy *D. melanogaster* účastní i IDGF1 a IDGF2 proteiny, jež byly detekovány v koagulátu hemolymfy.

Pomocí ektopické exprese rekombinantních IDGF2-3 proteinů byl obnoven fenotyp srážení hemolymfy u nulového mutanta *IDGF3*. Tento fenotyp však nepodařilo zachránit pomocí IDGF1 proteinu.

Myší galektin 4, jenž vykazuje k IDGF proteinům vazebnou i funkční podobnost, v experimentálním modelu *D. melanogaster* nefungoval. Tento výsledek tak může pramenit z rozdílného imunitního systému savců a hmyzu.

Užitím ektopické exprese IDGF3 proteinu bez glykosylačního místa (*IDGF3^{WGS}*) v testu fenotypové záchrany *IDGF3^{L1}* mutanta bylo prokázáno, že glykosylace IDGF3 proteinu je při srážení hemolymfy nezbytná. Vzhledem k poměrně vysoké sekvenční identitě mezi jednotlivými zástupci IDGF proteinů je možné, že glykosylace je při koagulačních procesech klíčová i v rámci ostatních IDGF proteinů.

Také byla kvantifikována účinnost jednotlivých rekombinantních proteinů při srážení hemolymfy. Nejúčinněji hemolymfu sráží IDGF3 a IDGF2 protein. Naopak IDGF1 protein se v porovnání s IDGF3 a IDGF2 srážení hemolymfy účastní minimálně. Heterozygot *IDGF3^{L1}* s jednou funkční alelou byl při srážení hemolymfy o něco méně účinný než *wt* linie. Bylo tak dodatečně potvrzeno, že míra koagulace koreluje s množstvím exprimovaného IDGF3 proteinu.

Bližší prozkoumání mechanismu působení IDGF proteinů *D. melanogaster* by však mohlo dále osvětlit i mechanismus účinku lidských homologů jako je YKL-40 a významně tak přispět k biomedicínskému výzkumu.

7. SEZNAM LITERATURY

Badariotti, F., Kyriotou, M., Lelong, C., Dubos, M., 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', *Journal of Biological Chemistry*, 281(40), pp. 29583–29596. doi: 10.1074/jbc.M605687200.

Bidla, G., Lindgren, M., Theopold, U., Dushay, M. S. (2005) 'Hemolymph coagulation and phenoloxidase in larvae', *Developmental & Comparative Immunology*, 29(8), pp. 669–679. doi: 10.1016/j.dci.2004.11.007.

Boscher, C., Dennis, J. W., Nabi, I. R. (2011) 'Glycosylation, galectins and cellular signaling', *Current Opinion in Cell Biology*. Elsevier Ltd, 23(4), pp. 383–392. doi: 10.1016/j.ceb.2011.05.001.

Brož, V., Kučerová, L., Rouhová, L., Fleischmannová, J., Strnad, H., Bryant, P. J., Žurovec, M. (2017) 'Drosophila imaginal disc growth factor 2 is a trophic factor involved in energy balance, detoxification, and innate immunity', *Scientific Reports*. Scientific Reports, 7(1), p. 43273. doi: 10.1038/srep43273.

Bussink, A. P., Speijer, D., Aerts, J. M. F. G., Boot, R. G. (2007) 'Evolution of Mammalian Chitinase(-Like) Members of Family 18 Glycosyl Hydrolases', *Genetics*, 177(2), pp. 959–970. doi: 10.1534/genetics.107.075846.

Chyb, S. a Gompel, N. (2013) 'Wild-type morphology', v *Atlas of Drosophila Morphology*. 1st edn. Londýn: Elsevier, pp. 22–23. doi: 10.1016/C2009-0-61936-X.

Dziedziech, A., Shivankar, S., Theopold, U. (2020) 'Drosophila melanogaster Responses against Entomopathogenic Nematodes: Focus on Hemolymph Clots', *Insects*, 11(1), p. 62. doi: 10.3390/insects11010062.

Elrod-Erickson, M., Mishra, S., Schneider, D. (2000) 'Interactions between the cellular and humoral immune responses in Drosophila', *Current Biology*, 10(13), pp. 781–784. doi: 10.1016/S0960-9822(00)00569-8.

Funkhouser, J. D. a Aronson Jr., N. N. (2007) 'Chitinase family GH18: evolutionary insights

from the genomic history of a diverse protein family’, *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), p. 96. doi: 10.1186/1471-2148-7-96.

Ideo, H., Seko, A., Yamashita, K. (2005) ‘Galectin-4 Binds to Sulfated Glycosphingolipids and Carcinoembryonic Antigen in Patches on the Cell Surface of Human Colon Adenocarcinoma Cells’, *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), pp. 4730–4737. doi: 10.1074/jbc.M410362200.

Kanost, M. R., Zepp, M. K., Ladendorff, N. E., Andersson, L. A. (1994) ‘Isolation and characterization of a hemocyte aggregation inhibitor from hemolymph of *Manduca sexta* larvae’, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 27(2), pp. 123–136. doi: 10.1002/arch.940270205.

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 (Cambridge, England)*, 126(2), pp. 211–219.

Krejčíříková, V., Páchl, P., Fábry, M., Malý, P., Řezáčová, P., Brynda, J. (2011) ‘Structure of the mouse galectin-4 N-terminal carbohydrate-recognition domain reveals the mechanism of oligosaccharide recognition’, *Acta Crystallographica Section D. Biological Crystallography*, 67(3), pp. 204–211. doi: 10.1107/S0907444911004082.

Kučerová, L., Brož, V., Arefin, B., Maaroufi, H. O., Hurychová, J., Strnad, H., Žurovec, M., Theopold, U. (2016) ‘The *Drosophila* Chitinase-Like Protein IDGF3 Is Involved in Protection against Nematodes and in Wound Healing’, *Journal of Innate Immunity*, 8(2), pp. 199–210. doi: 10.1159/000442351.

Kzhyshkowska, J., Gratchev, A., Goerdts, S. (2007) ‘Human Chitinases and Chitinase-Like Proteins as Indicators for Inflammation and Cancer’, *Biomarker Insights*, 2, pp. 128–146. doi: 10.1177/117727190700200023.

Lee, C. G., Da Silva, C. A., Dela Cruz, C. S., Ahangari, F., Ma, B., Kang, M., He, C., Takyar, S., Elias, J. A. (2011) ‘Role of Chitin and Chitinase/Chitinase-Like Proteins in Inflammation, Tissue Remodeling, and Injury’, *Annual Review of Physiology*, 73(1), pp. 479–501. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142250.

Lesch, C., Goto, A., Lindgren, M., Bidla, G., Dushay, M. S., Theopold, U. (2007) ‘A role for

Hemolectin in coagulation and immunity in *Drosophila melanogaster*’, *Developmental & Comparative Immunology*, 31(12), pp. 1255–1263. doi: 10.1016/j.dci.2007.03.012.

McCarter, J. D. a Stephen Withers, G. (1994) ‘Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis’, *Current Opinion in Structural Biology*, 4(6), pp. 885–892. doi: 10.1016/0959-440X(94)90271-2.

Paclik, D., Lohse, K., Wiedenmann, B., Dignass, A. U., Sturm, A. (2008) ‘Galectin-2 and -4, but not Galectin-1, promote intestinal epithelial wound healing in vitro through a TGF-beta-independent mechanism’, *Inflammatory Bowel Diseases*, 14(10), pp. 1366–1372. doi: 10.1002/ibd.20499.

Pan, Y., Chen, K., Xia, H., Yao, Q., Gao, L., Lü, P., Huojuan, He, Y., Wang, L. (2010) ‘Molecular Cloning, Expression and Characterization of BmIDGF Gene from *Bombyx mori*’, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(3–4), pp. 277–283. doi: 10.1515/znc-2010-3-417.

Pesch, Y., Riedel, D., Patil, K. R., Loch, G., Behr, M. (2016) ‘Chitinases and Imaginal disc growth factors organize the extracellular matrix formation at barrier tissues in insects’, *Scientific Reports*. *Scientific Reports*, 6(1), p. 18340. doi: 10.1038/srep18340.

Ranok, A., Wongsantichon, J., Robinson, R. C., Suginta, W. (2015) ‘Structural and Thermodynamic Insights into Chitooligosaccharide Binding to Human Cartilage Chitinase 3-like Protein 2 (CHI3L2 or YKL-39)’, *Journal of Biological Chemistry*, 290(5), pp. 2617–2629. doi: 10.1074/jbc.M114.588905.

Renkema, G. H., Boot, R. G., Au, F. L., Donker-Koopman, W. E., Strijland, A., Muijsers, A. O., Hrebicek, M., Aerts, J. M. F. G. (1998) ‘Chitotriosidase, a chitinase, and the 39-kDa human cartilage glycoprotein, a chitin-binding lectin, are homologues of family 18 glycosyl hydrolases secreted by human macrophages’, *European Journal of Biochemistry*, 251(1–2), pp. 504–509. doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2510504.x.

Scherfer, C., Karlsson, C., 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(7), pp. 625–629. doi: 10.1016/j.cub.2004.03.030.

Schmid, M. R., Dziedziech, A., Arefin, B., Kienzle, T., Wang, Z., Akhter, M., Berka, J.,

- Theopold, U. (2019) 'Insect hemolymph coagulation: Kinetics of classically and non-classically secreted clotting factors', *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 109(November 2018), pp. 63–71. doi: 10.1016/j.ibmb.2019.04.007.
- Schultz, N. A. a Johansen, J. S. (2010) 'YKL-40—A Protein in the Field of Translational Medicine: A Role as a Biomarker in Cancer Patients?', *Cancers*, 2(3), pp. 1453–1491. doi: 10.3390/cancers2031453.
- Shi, L. a Paskewitz, S. M. (2004) 'Identification and molecular characterization of two immune-responsive chitinase-like proteins from *Anopheles gambiae*', *Insect Molecular Biology*, 13(4), pp. 387–398. doi: 10.1111/j.0962-1075.2004.00496.x.
- Theopold, U., Schmidt, O., Söderhäll, K., Dushay, M. S. (2004) 'Coagulation in arthropods: defence, wound closure and healing', *Trends in Immunology*, 25(6), pp. 289–294. doi: 10.1016/j.it.2004.03.004.
- Theopold, U., Krautz, R., Dushay, M. S. (2014) 'The *Drosophila* clotting system and its messages for mammals', *Developmental & Comparative Immunology*. Elsevier Ltd, 42(1), pp. 42–46. doi: 10.1016/j.dci.2013.03.014.
- Varela, P. F., Llera, A. S., Mariuzza, R. A., Tormo, J. (2002) 'Crystal Structure of Imaginal Disc Growth Factor-2', *Journal of Biological Chemistry*, 277(15), pp. 13229–13236. doi: 10.1074/jbc.M110502200.
- Zhu, Q., Arakane, Y., Banerjee, D., Beeman, R. W., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S. (2008) 'Domain organization and phylogenetic analysis of the chitinase-like family of proteins in three species of insects', *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 38(4), pp. 452–466. doi: 10.1016/10.1016/j.ibmb.2007.06.010.
- Zimmerman, S. G., Merrihew, G. E., MacCoss, M. J., Berg, C. A. (2017) 'Proteomics Analysis Identifies Orthologs of Human Chitinase-Like Proteins as Inducers of Tube Morphogenesis Defects in *Drosophila melanogaster*', *Genetics*, 206(2), pp. 973–984. doi: 10.1534/genetics.116.199323.
- Žurovcová, M., Benes, V., Žurovec, M., Kučerová, L. (2019) 'Expansion of Imaginal Disc Growth Factor Gene Family in Diptera Reflects the Evolution of Novel Functions', *Insects*, 10(10), p. 365. doi: 10.3390/insects10100365.

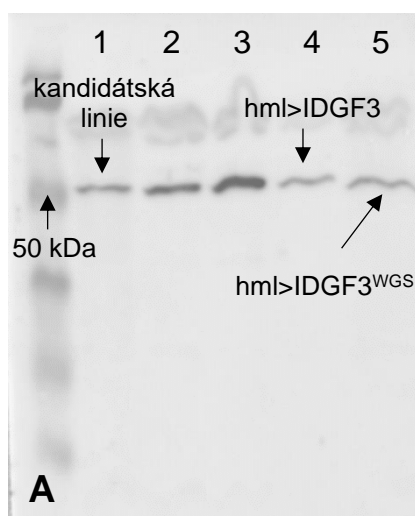
Žurovcová, M. a Ayala, F. J. (2002) 'Polymorphism patterns in two tightly linked developmental genes, Idgf1 and Idgf3, of *Drosophila melanogaster*.' *Genetics*, 162(1), pp. 177–188.

8. APPENDIX

8.1. Detekce a porovnání produkce IDGF proteinů v hemolymfě vybraných linií

V hemolymfě našich záchranných linií byly po separaci proteinů pomocí SDS-PAGE a následným Western blotem detekovány IDGF proteiny jednak pro potvrzení exprese proteinů IDGF v použitých liniích i pro ověření jejich hladiny exprese.

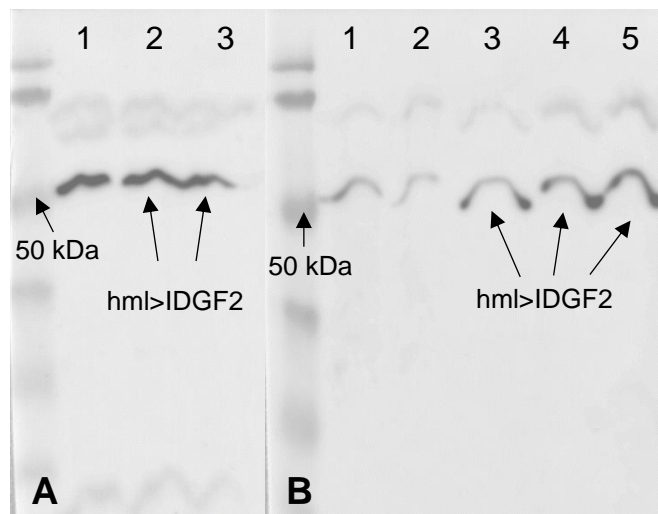
Pomocí primární IDGF3 protilátky byla zaznamenána exprese IDGF3 proteinu v hemolymfě několika linií (Obr. 10). Mezi těmito liniemi byla použita i jedna kandidátská linie, která se tímto blotem v konečném výsledku ukázala jako *wt*. Z obrázku je patrné, že exprese *IDGF3^{L1}* heterozygota je v porovnání s *wt* linií nižší. IDGF3 protein byl detekován i u záchranných linií *hml>IDGF3* a *hml>IDGF3^{WGS}*. Jejich exprese s tímto „driverem“ je však zřejmě o něco slabší než při normální expresi v mouše *wt*. To by mohlo být nejspíš způsobeno slabším „driverem“.



Obr. 10: Western blot detekující IDGF3 protein pomocí králičí IDGF3 primární protilátky a kozí sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (překryv snímků viditelného světla a bioluminiscence). 1 kandidátská linie (*wt*); 2 *IDGF3^{L1}* heterozygot; 3 *wt*; 4 *hml>IDGF3*; 5 *hml>IDGF3^{WGS}*.

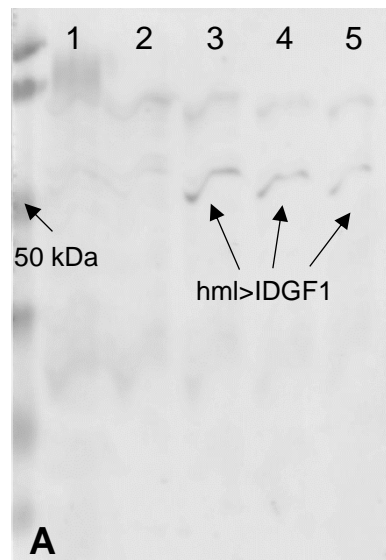
Užitím primární IDGF2 protilátky byla zachycena i exprese proteinu IDGF2 (Obr. 11 A-B). Z obrázku A i B je patrné, že IDGF2 protein byl exprimován jak *wt* linií, tak linií *hml>IDGF2*. Zatímco na obrázku A se zdá být produkce IDGF2 proteinu podobná u všech linií, obrázek B v porovnání s *wt* mírně naznačuje „overexpresi“ IDGF2 proteinu u naší

záchranné *hml>IDGF2* linie. Tento náznak nadprodukce by tak souhlasil s předpokladem, že se jedná o IDGF2 „overexpresi“.



Obr. 11: Western blot detekující IDGF2 protein pomocí králičí IDGF2 primární protilátky a kozí sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (překryv snímků viditelného světla a bioluminiscence). A: 1 *wt*; 2-3 *hml>IDGF2*. B: 1-2 *wt*; 3-5 *hml>IDGF2*.

Western blot byl proveden i s IDGF1 protilátkou, která měla vizualizovat expresi IDGF1 proteinů (Obr. 12). Na obrázku můžeme u *hml>IDGF1* linie vidět náznak exprese IDGF1 proteinu, který v porovnání s kontrolní *wt* linií je o něco silnější.



Obr. 12: Western blot detekující IDGF1 protein pomocí králičí IDGF1 primární protilátky a kozí sekundární protilátky konjugované s křenovou peroxidázou (překryv snímků viditelného světla a bioluminiscence). A: 1-2 *wt*; 3-5 *hml>IDGF1*.

9. PŘÍLOHY

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

Název primeru	Sekvence primeru (od 5' konce k 3' konci)
rp49 Fw	CTTCATCCGCCACCAGTC
rp49 Rev	GGCGACGCACTCTGTTGT
IDGF3 ^{L1} Fw	ACTGCGTTTGCTATTGTTC
IDGF3 ^{L1} Rev	ACTTGATGTGGGGATAGC
Gal4 Fw	CCGCTGACTAGGGCACATCT
Gal4 Rev	GAGCATCCCTGGGCATAAAAT

IDGFs and their role in hemolymph clotting

Nikola Kahlezník^{1,2}, Lucie Kuberová², Lenka Roušková^{1,2}, Václav Brůž², Michal Žuroušek^{1,2}

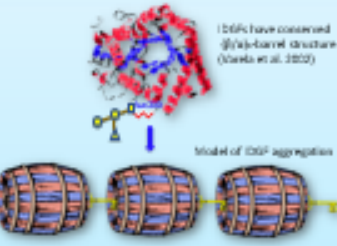
¹University of South Bohemia, Faculty of Science, Branišovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic

²Biology Centre of Czech Academy of Sciences, Institute of Entomology, Branišovská 31, 370 05, České Budějovice, Czech Republic

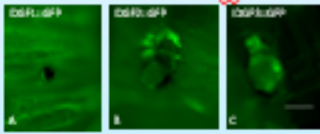
Introduction:

Drosophila imaginal disc growth factors (IDGFs) are secreted glycoproteins structurally belonging to 18 glycosyl hydrolase (chitinase) family but lacking enzymatic activity. Similar proteins can be found in most animal species and their functions are not clear. Generally, chitinase-like proteins in insects play role in development, tissue remodeling and regeneration, inflammatory processes, fertilization and early embryonic development. There are several important representatives of chitinase-like proteins in humans, including chitinase-like protein 1 (CHL1) and 2, chitinase or chitinase-1. It is known that chitin-like proteins in cancer metastasis which is upregulated during several types of infectious and immune disorders.

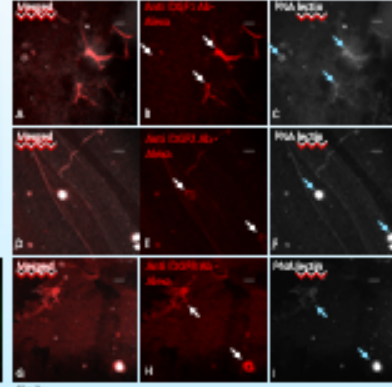
Drosophila IDGFs are also involved in a variety of functions connected with tissue remodeling and immune immunity. IDGFs are mostly produced by fat body and leucocytes. The IDGF proteins are localized on post-embryonic and larval cells and they can also be detected at wound sites and in hemolymph clot after injury (Fig. 1,2). It has been suggested that despite of the lack of enzymatic activity, they are still able to bind carbohydrate moieties of glycoproteins residing on cell surface and act in a similar way as lectins. Interestingly, the hemolymph of IDGF3 mutant flies does not coagulate. Since the IDGF3 also contains carbohydrate moieties we hypothesize that they can aggregate and form a clot in the hemolymph.



1) IDGF3-3 proteins accumulate at wound sites



2) IDGF3-3 are present in the hemolymph clot



To find out which IDGFs are involved in hemolymph coagulation, we used IDGF3 mutant flies which were unable to form clots and tried to rescue this phenotype using various overexpression constructs. We have visualized the clot by Hanging Drop Assay using inverted optics. The constructs included *hemoIDGF2*, *hemoIDGF3*, *hemoIDGF4*, *hemoIDGF3^{WT}*, *hemoIDGF3^{ΔGlcNAc}* as depicted at the figure below, the rescue worked well for the three IDGFs constructs (Fig. 3). Surprisingly, we did not observe any clot formation in IDGF3 mutant flies overexpressing *hemoIDGF3^{WT}* (with no glycosylation sites) suggesting that the glycosylation is important for clot formation. We tested the rescue of IDGFs by various lectins, including ConA (Fig. 4).

4) Importance of IDGF glycosylation and binding domain in specificity



3) Overexpression of IDGFs and phenotypic rescue of mutant IDGF3

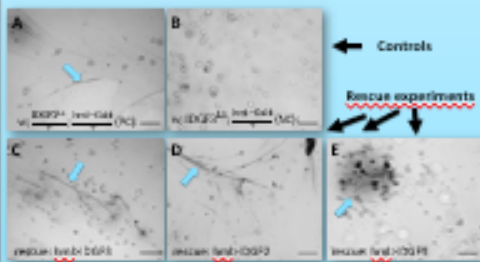


Fig 4: We also used the Hanging Drop Assay for the glycosylation as well as binding domain specificity tests. We used Galβ-GalNAc system for the overexpression of IDGF3^{WT} and rescue *hemoIDGF3^{ΔGlcNAc}* (F-G). H) Conservation of the glycosylation site among Drosophila IDGFs. Scale bars: 40 µm (F-G).

5) Immune phenotypes of IDGFs – Bead Aggregation Assay

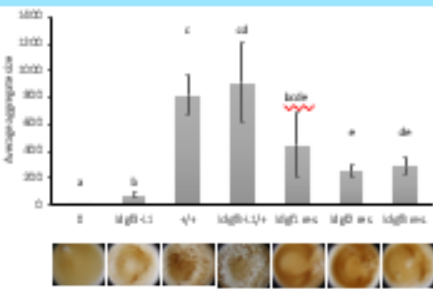


Fig 5: Clot quantification by the Bead Aggregation Assay – was performed according to Lech et al. (2017), Dev Comp Immunol, 81:1258–1269) with slight modifications. 2.5 µl of hemolymph was collected from the late third instar larvae and mixed for 30 s with 10 µl of finger culture and 5 µl of beads suspended in Drosophila M-DMEM (Drosophila Medium). The pictures were analyzed and quantified with the image graphics software Fiji (Fiji module "Analyze Particles".

Summary:

Since there is no clot formation in IDGF3 mutant flies we concluded that IDGFs play important roles in Drosophila hemolymph coagulation. This phenotype can be rescued by IDGF3-3 overexpression, however, it was not clear, whether the quality of each clot was the same. We therefore quantified the clot formed in IDGF3 mutants by Bead Aggregation Assay (Fig. 5).

To determine the importance of N-linked glycosylation, we also tried to rescue the clotting phenotype of IDGF3 mutant by the overexpression of modified IDGF3, carrying the substitution of Asn30 for Gly. As expected, such fly was still clotting deficient. As a control, we also tested an ectopic expression of mouse ConA lectin II, which might lead a similar carbohydrate moiety as the IDGF3 and it also did not form any detectable clot. Further experiments are needed to support our hypothesis on the involvement of IDGF glycosylation and IDGF self-binding in the coagulation of fly hemolymph.

Acknowledgment:

This research was funded by Grant Agency of the Czech Republic, grant number 28-1536/21.

References:

1. Kováčik L., Brůž V., Avella B., Maasová H., Havelková J., Brůž V., Žuroušek M., Štěpánek J. (2018) The Drosophila chitinase-like protein IDGF3 is involved in post-embryonic tissue remodeling and immune immunity. *PLoS ONE* 13:1-12.
2. Brůž V., Kováčik L., Roušková L., Havelková J., Brůž V., Žuroušek M. (2017) Drosophila imaginal disc growth factor IDGF3 is a secreted glycoprotein with lectin-like activity. *Scientific Reports* 7: article number 41171.

Obr. 13: Příloha č. 1.: Plakát z „26th European Drosophila Research Conference 2019“ v Lausanne (5.-8. 9. 2019).