

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Role makrofágy produkovaného cytokinu IMPL2
v regulaci systemického metabolismu během bakteriální
infekce u *Drosophila melanogaster***

Bakalářská práce

Hana Vargová

Školitel: Mgr. Adam Bajgar, Ph.D.

České Budějovice 2021

Vargová, H., 2021: Role makrofágy produkovaného cytokinu IMPL2 v regulaci systemického metabolismu během bakteriální infekce u *Drosophila melanogaster* [The role of the cytokine IMPL2 produced by activated immune cells in the regulation of systemic metabolism during bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. Bc. Thesis, in Czech]- 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

Hlavním cílem této bakalářské práce je ověřit, zda je *ImpL2*, produkovaný aktivovanými imunitními buňkami, zodpovědný za změny v systemickém metabolismu během imunitní odpovědi při akutní fázi bakteriální infekce u *Drosophila melanogaster*. Teoretická část zahrnuje dosud známé informace o imunitním systému savců a *D. melanogaster*, zvláště o polarizaci a buněčném metabolismu makrofágů, dále přináší poznatky o rolích genu *ImpL2* a jeho savčího homologu *Igfbp7*. Praktická část bakalářské práce se zabývá úlohou genu *ImpL2* v indukcii změn systemického metabolismu během imunitní odpovědi. Pomocí makrofágově-specifické RNA-interference byl testován vliv cytokinu IMPL2 na zvolené metabolické geny v tukovém tělese po infekci *Streptococcus pneumoniae*. Práce také objasňuje, zda má tento signální faktor vliv na koncentraci vybraných metabolitů (cholesterolu a cholesterol-esteru) v cirkulaci a v makrofázích během akutní fáze bakteriální infekce.

Annotation

The main goal of this bachelor thesis is to verify whether *ImpL2*, produced by activated immune cells, is responsible for changes in systemic metabolism during the immune response during the acute phase of bacterial infection in *Drosophila melanogaster*. The theoretical part includes previously known information about the immune system of mammals and *D. melanogaster*, especially about polarization and cellular metabolism of macrophages, as well as knowledge about the roles of the *ImpL2* gene and its mammalian homologue *Igfbp7*. The practical part of the bachelor thesis deals with the role of the *ImpL2* gene in the induction of changes in systemic metabolism during the immune response. The effect of the cytokine IMPL2 on selected metabolic genes in adipose tissue after *Streptococcus pneumoniae* infection was tested by means of macrophage-specific RNA interference. The work also clarifies whether this signaling factor has an effect on the concentration of selected metabolites in circulation and in macrophages during the acute phase of bacterial infection.

Prohlášení

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

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 se veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdání 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 14. 4. 2021

.....

Hana Vargová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli Mgr. Adamu Bajgarovi, Ph.D. za skvělé vedení, obětavou pomoc, za trpělivost a vstřícný přístup při psaní této práce. Velice také děkuji Mgr. Gabriele Krejčové, za ochotu a poskytnutí cenných informací. Zároveň děkuji i ostatním členům laboratoře za jejich rady. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu.

Seznam použitých zkratk

Acetyl-CoA = Acetyl koenzym A

AKT = Activated protein kinase

ApoLPP = Apolipoprotein

ApoLTP = Apolipoprotein lipid transfer particle

ATP = Adenosintrifosfát

Bmm = Brummer

cDNA = Complementary deoxyribonucleic acid

CFU = Colony forming units

CO₂ = Oxid uhličitý

Crq = Croquemort

DEPC = Diethyl pyrocarbonate

Dilp2 = Drosophila insulin-like peptid 2

Dilp5 = Drosophila insulin-like peptid 5

dNTPs = Deoxinukleotid trifosfát

ERK1/2 kinázy = Extracellular signal-regulated kinases

EtOH = Ethanol

FACS = Fluorescence-activated cell sorting

Fe²⁺ = Železnaté ionty

FOXO = Forkhead box-O

Gal4 = Kódující sekvence pro galaktózou-indukované geny

Gal80^{TS} = Teplotně senzitivní Gal80 inhibiční protein

GFP = Green fluorescent protein (zelený fluorescenční protein)

GM-CSF = Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

H₂O = voda

HDL = Lipoproteiny s vysokou hustotou

HIF1 α = Hypoxia inducibilní faktor 1 α

Hml = Hemolectin (protein produkováný hemocyty)

HRE = Hormone response element

IGF = Insulin-like growth factor

IGFBP7 = Insulin-like growth factor-binding protein 7

IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-12, IL-13, IL-23 = Interleukiny

Impl2 = Imaginal morphogenesis protein-late 2

LDL = Lipoproteiny s nízkou hustotou

LM = Jaterní makrofágy

LPS = Lipopolisacharidy

mRNA = Messenger RNA

MTP = Microsomal triglycerol transfer protein

NAD⁺ = Oxidovaná forma nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

NADH = Redukovaná forma nikotinamid adenin dinukleotid

NADPH = Redukovaná forma nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

NF- κ B = Nuclear factor aktivovaný B buňkami

OXPPOS = Oxidační fosforylace

PBS = Fosfátový pufr

PCR = Polymerázová řetězová reakce

PHD = Prolyl hydroxyláza dehydrogenáza

PPP = Pento-fosfátový cyklus

qPCR = Kvantitativní řetězová polymerázová reakce

RNA = Ribonukleová kyselina

RNAi = RNA interference

ROS = Reaktivní formy kyslíku

Rp49 = Ribozomální protein 49

TCA cyklus = Cyklus trikarboxylových kyselin

TLRs = Toll-like receptors

TNF α = Tumor necrosis factor α

TSB = Tryptic soy broth

UAS = Upstream aktivační sekvence

VLDL = Lipoproteiny s velmi nízkou hustotou

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Úvodní přehled	1
1.2. Makrofágy jako funkčně variabilní buňky	3
1.3. Makrofágy v první linii obrany organismu před patogeny	5
1.4. Metabolické změny makrofágů v odpovědi na různorodé podněty.....	6
1.5. Změny v metabolických drahách u M1 baktericidních makrofágů	7
1.6. <i>Drosophila melanogaster</i> jako model pro studium metabolismu během infekce.....	10
1.7. Systemické metabolické změny jako podmínka efektivní imunitní odpovědi.....	12
1.8. Teorie sobeckého imunitního systému.....	13
1.9. Teoretické podmínky pro selfish immune factors	15
1.10. ImpL2 jako kachektický faktor v rakovině	16
1.11. Role genu ImpL2 u <i>Drosophila melanogaster</i>	17
1.12. ImpL2 produkovaný makrofágy při infekci	17
2. Cíle práce	19
3. Materiály a metody.....	20
3.1. Chov <i>Drosophila melanogaster</i>	20
3.2. Křížení.....	21
3.3. Infekce.....	23
3.4. Fluorescence – activated cell sorting (FACS).....	24
3.5. Stanovení metabolitů	25
3.6. Izolace RNA	26
3.7. Reverzní transkripce	26
3.8. qPCR.....	27
3.9. Konfokální mikroskopie a barvení Oil Red O.....	28

3.10. Graphpad Prism	29
4. Výsledky	29
4.1. Změna exprese genu <i>Impl2</i> v makrofázích po infekci u <i>Drosophila melanogaster</i> ..	30
4.2. Role genu <i>Impl2</i> v regulaci exprese genů lipoproteinového metabolismu v tukovém tělese po bakteriální infekci.....	32
4.3. Role genu <i>Impl2</i> v mobilizaci lipoproteinů během streptokokové infekce a jejich akumulace v aktivovaných imunitních buňkách	33
4.4. Akumulace lipidů v makrofázích.....	37
5. Diskuze	38
6. Závěr	41
7. Literatura.....	44

1. Úvod

1.1. Úvodní přehled

Tato práce si klade za cíl zjistit, zda produkce cytokinu *Imaginal Morphogenesis Protein-Late 2* (IMPL2) makrofágy zodpovídá za vyvolání změn v systemickém metabolismu v průběhu imunitní odpovědi. Předpokládáme, že makrofágy produkovaný cytokin IMPL2 indukuje mobilizaci lipoproteinů z tukového tělesa a tím zvyšuje dostupnost těchto látek pro aktivovaný imunitní systém (Obr. 1). Abychom tuto hypotézu mohli v rámci této práce objasnit, rozhodli jsme se otestovat vliv cytokinu IMPL2 na expresi genů, ovlivňujících metabolismus lipoproteinů v tukovém tělese, následně po infekci *Streptococcus pneumoniae* a také charakterizovat jeho vliv na koncentraci cholesterolu a cholesterol-esteru v cirkulaci i makrofázích.

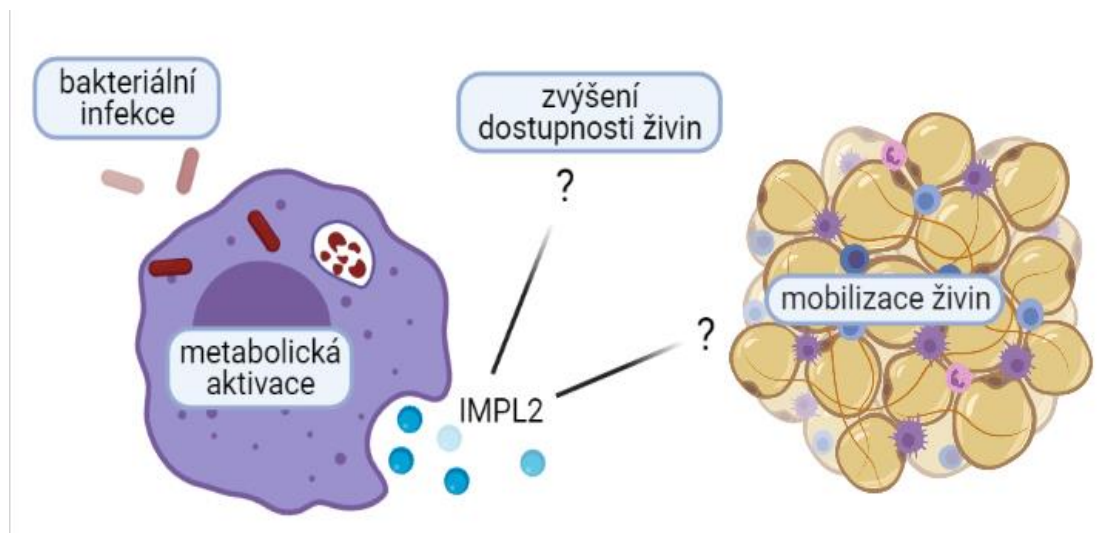
K objasnění těchto tvrzení nám posloužil vhodný modelový organismus *Drosophila melanogaster*. Imunitní systém *D. melanogaster* vykazuje řadu společných znaků se savčím imunitním systémem, jako je aktivace hlavních imunitních kaskád a s tím spojených metabolických změn. Jednou z motivací pro tento projekt je, že IMPL2 má savčí homolog Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7 (IGFBP7), který se podílí na indukci inzulinové rezistence. *D. melanogaster* se navíc osvědčila jako vhodný modelový organismus pro studium metabolismu imunitních buněk.

Během bakteriální infekce je imunitní odpověď velice energeticky náročná. To je způsobeno metabolickou aktivací imunitních buněk, které v boji s patogenem potřebují aerobní glykolýzu. Metabolická aktivace makrofágů je tak spojena se zvýšenými energetickými a nutričními požadavky na přísun lipidů. Zatímco je energie v běžných podmínkách rozdělena mezi reprodukci, růst a vývoj, při infekci je nutné její přesměrování k imunitnímu systému. Aby se zajistilo uvolňování těchto energeticky bohatých látek do cirkulace, produkují makrofágy celou řadu molekul.

Je známo, že některé signální faktory produkované imunitními buňkami způsobují systemické změny v organismu a tím zajišťují dostatečné dodávky živin. Domníváme se, že signální faktor IMPL2 by mohl být dalším, doposud neidentifikovaným faktorem s touto funkcí. Tento cytokin byl

pospsán u *D. melanogaster* jako kachektický faktor produkovaný rakovinnými buňkami. Jeho kachektického účinku je dosaženo indukci inzulínové rezistence v tukovém tělese a ve svalech. U *D. melanogaster* je známo, že se gen *ImpL2* váže na *Drosophila* insulin-like peptides (DILPs). V důsledku jejich vyvázání, *ImpL2* zapříčiní inzulínovou rezistenci, jelikož se DILPs nemůžou dále vázat na inzulínový receptor. Adipocyty, tukové buňky, reagují na nedostatečnou aktivaci inzulínové signalizační kaskády uvolňováním zásobních látek do cirkulace. Pokud změna distribuce živin přetrvává, přechází do chronické fáze, což v důsledku vede k plýtvání energií v organismu a rozvoji závažných onemocnění, od životně nebezpečných rakovin, sepsí až po chronické zánětlivé stavy, jako jsou obezita, cukrovka, kachexie a autoimunitní poruchy.

Smyslem této práce je lépe porozumět signální molekule IMPL2, která potenciálně způsobuje nejen různé patologické stavy, ale může mít i zásadní úlohu v energetice akutní fáze imunitní odpovědi. Díky jejímu významu v regulaci systemického metabolismu a indukci inzulínové rezistence, by její homolog mohl v budoucnu hrát klíčovou roli v indukci metabolicky podmíněných onemocnění u savců a člověka.



Obrázek 1. Schématické znázornění předpokládaného modelu, který je v této práci testovaný. Bakteriální infekce, která vede k metabolické aktivaci makrofágů, je činí energeticky a nutričně náročnými. Dostatečné zásobení energeticky bohatými zdroji je klíčové pro fungování imunitního systému. Makrofágy, v důsledku metabolické aktivace, produkují kachektický faktor *Imaginal morphogenesis protein-Late 2 (Impl2)*. Jeho role v mobilizaci nutričně hodnotných látek během bakteriální infekce však doposud nebyla experimentálně testována.

1.2. Makrofágy jako funkčně variabilní buňky

Makrofágy jsou buňky hematopoetického původu s vysokou schopností samoobnovy (Wynn, Chawla, and Pollard 2013). Představují buněčnou složku vrozené imunity. Patří do myeloidní řady leukocytů. Tuto řadu, kromě makrofágů, tvoří monocyty, granulocyty, žírné a dendritické buňky (Hořejší et al., 2017). Tyto fagocytující imunitní buňky reprezentují vysoce specializovanou a všestrannou populaci buněk, vyskytují se ve všech tkáních a orgánech a zastávají v organismu široké spektrum funkcí. Jejich hlavní úlohou je rozpoznávání a likvidace napadajících patogenů (Davies and Taylor, 2015). Toho dosahují odstraňováním apoptických buněk pomocí fagocytózy (Hořejší et al., 2017), remodelací extracelulární matrix a regulací lokální metabolické rovnováhy skrze parakrinní signály. Též se účastní

vývoje, regulace a udržování homeostázy, imunitní reakce a zánětlivé odpovědi (Wynn, Chawla, and Pollard, 2013). Díky kombinaci všech těchto funkcí se makrofágy stávají nepostradatelnými v celé řadě biologicky významných procesů, jako je metamorfóza, regulace růstu, embryogeneze či metabolická odpověď na stres (Stein and Keshav, 1992).

Velmi pozoruhodným fenoménem makrofágové biologie jsou populace tkáňově specifických rezidentních makrofágů (Tissue resident macrophage). Během embryonálního vývoje jsou jednotlivé vyvíjející se orgány a tkáně infiltrovány makrofágy (Hořejší et al., 2017). Tyto imunitní buňky setrvávají v organismu až do dospělosti jedince a plní zde tkáňově specifické funkce (Ginhoux and Jung, 2014). Patří sem například Kupfferovy buňky v játrech, alveolární makrofágy v plicích, mikroglie v centrální nervové soustavě a lymfoidní makrofágy ve slezině (Epelman et al., 2014; Hořejší et al., 2017). Přestože jsou jejich tkáňově specifické úlohy určeny epigenetickým nastavením, ponechávají si stále funkční pluripotenci. Je velmi zajímavé, že po jejich transplantaci do jiných orgánů mohou zaujmout jakoukoli úlohu makrofágů v těle (Chen et al., 2020).

Makrofágy také zastávají důležitou roli v odstraňování zbytků cizorodých patogenů a pomáhají při hojení ran (Ginhoux, Williams, and Naik, 2016). Deponují velké množství kolagenu a jiných složek extracelulárního materiálu, díky kterému dochází k hojení a opravě poškozených tkání (Viola et al., 2019; Xue et al., 2014). Tkáňové rezidentní makrofágy udržují homeostázu neboli stále vnitřní prostředí tkání a hrají významnou úlohu při tlumení zánětu (Haldar and Murphy, 2014). Výše popsané procesy si mohou vzájemně konkurovat. Například u obézních pacientů se musí jednotlivé makrofágy vypořádat s nadměrným přísunem lipidů, což vede k jejich zhoršené schopnosti průběhu fagocytózy patogenních bakterií a zároveň k zhoršenému hojení ran (Torres et al. 2018). Makrofágy jsou schopny přijímat velké množství lipidů z extracelulárního prostředí a metabolizovat je pomocí lysosomálního lipidového katabolismu. Ačkoli tato jejich úloha v organismu nebyla doposud zcela vysvětlena, zdá se být klíčovou v detoxifikaci tkání v počátečních stádiích obezity (Serbulea et al., 2018; Dahik, Frisdal and Goff, 2020).

Makrofágy jsou tedy zásadní buňky imunitního systému, které v organismu plní celou řadu důležitých funkcí. V této práci bude zkoumána jejich úloha v regulaci metabolismu během akutní bakteriální infekce skrze produkci parakrinních signálních faktorů ovlivňujících systemický metabolismus.

1.3. Makrofágy v první linii obrany organismu před patogeny

Makrofágy představují v imunitní odpovědi první linii obrany organismu před patogeny (Franken et al., 2016). Mají velké množství obranných mechanismů pro boj s infekcí. Jedním z nich je fagocytóza. Jedná se o děj, kdy si fagocyty vrozeného imunitního systému vytvoří na svém povrchu receptory, jejichž pomocí rozpoznají patogenní bakterie a následně je eliminují (Weiss and Schaible, 2015). Po internalizaci částice do membránových váčků fagolyzozomů, dochází k přeskupení aktinového cytoskeletu a prodloužení plazmatické membrány (Aderem, 2003). Fagocytované bakterie jsou degradovány okyselením fagolyzozomu pomocí enzymu NADPH-oxidázy. Tento enzym využívá NADPH ke generaci reaktivních forem kyslíku (ROS), které vedou k usmrcování fagocytovaných organismů (Jackson, Gallin, and Holland, 1995); Yi et al., 2012). Mrtvé mikroby jsou nakonec štěpeny zejména kyselými hydrolázami (jako jsou proteázy, nukleázy, lipázy). Součástí imunitní reakce je vznik lokální hypoxie, neboť je všechen kyslík vyčerpán na produkci reaktivních oxidativních forem (Semenza et al., 2000; Goswami et al., 2005)

Dalším způsobem, kterým makrofágy snižují patogenicitu cizorodých bakterií, je sekvestrace železa. Fe^{2+} železnaté ionty jsou vychytávány z extracelulárního prostředí. Fe^{2+} ionty se tak stávají limitujícím prvkem pro dělení a růst patogenních bakterií v extracelulárním prostoru (Tonelli, Chio, and Tuveson, 2018)

Společně s baktericidní funkcí, makrofágy produkují celou řadu signálních látek, cytokinů, pomocí kterých informují okolní tkáň a orgány o možném nebezpečí a přesunutí do místa poškození (Soehnlein and Lindbom, 2010). V postižené tkáni makrofágy fagocytují různé mikroorganismy a současně indukují a koordinují zánětlivou odpověď pomocí produkce pro-

zánětlivých i proti-zánětlivých cytokinů (Hořejší et al., 2017). Cytokiny mohou mít často významnější dopad na průběh onemocnění, než samotná přítomnost patogenu (Soehnlein and Lindbom, 2010).

Pro odolnost vůči bakteriální infekci je pro organismus výhodné si zachovat co největší množství imunitních buněk (Kacsóh and Schlenke, 2012). V aktivovaném stavu by však pro organismus tvořily příliš náročnou energetickou zátěž. Soustavná aktivita imunitních buněk by navíc vedla k rozvoji mnohých patologií a poruch metabolismu (Wolowczuk et al., 2008). Z tohoto důvodu si organismus udržuje makrofágy v dostatečném počtu ve stavu metabolické quiescence. V tomto stavu nevyžadují tolik energie a zároveň minimalizují riziko jejich poškození produkty oxidativního metabolismu (Mosser and Edwards, 2008). Po rozpoznání ohrožení dojde k jejich okamžité aktivaci, což je spojeno s náhle vzniklou potřebou dodání energie (Pearce and Pearce 2013).

V následující kapitole se budeme zabývat metabolickými změnami makrofágů v reakci na četné různorodé mikrobiální podněty.

1.4. Metabolické změny makrofágů v odpovědi na různorodé podněty

Makrofágy reagují na četné podněty, jako na přítomnost mikrobiálních produktů, stimulaci lymfocytů či poškozených buněk. Tyto podněty vnímají pomocí svých povrchových receptorů. Aktivovatelnost makrofágů je důležitou podmínkou pro jejich funkce a rychlé reakce (Lee, 2019; Mills et al., 2000). S jejich aktivitou rychle narůstají nejen nároky na energii, ale i na živiny, které nedokážou získat z lokálních zdrojů ani z vnitrobuněčných zásob. Makrofág je tak funkčně závislý na dodání těchto látek z vnějšího prostředí (Ganeshan and Chawla 2014).

Existuje celé spektrum makrofágů. Jedny z významných skupin jsou: naivní M ϕ (nazývané také jako klidové, nediferenciované M0), které se dále diferencují na baktericidní M1 s klasickou aktivací a hojivé M2 alternativně aktivované makrofágy, v závislosti na charakteru aktivujícího stimulu. Makrofágy mohou přecházet i z jednoho fenotypu do druhého (Wang et al., 2019).

Makrofágy jsou charakteristické svými odlišnými metabolickými drahami, které regulují jejich různé fenotypy a funkce. Říkáme tomu metabolické přeprogramování makrofágů. M1 makrofágy získávají energii (ATP) v procesu glykolýzy. Oproti M2 makrofágům, které spoléhají na cyklus trikarboxylových kyselin (TCA) a mitochondriální dýchání neboli oxidační fosforylaci (OXPHOS), má M1 fenotyp oba dva tyto mechanismy zablokované. Pokud se jim nedostává dostatečného množství zdrojů, tak se metabolismus zastaví a makrofágy nejsou schopny reagovat na cizorodé mikroorganismy (Liu et al. 2021; Saha, Shalova, and Biswas, 2017). Další z forem makrofágů se aktivuje pomocí oxidovaných lipidů. Tato skupina má překvapivě velmi podobný fenotyp jako M1.

Hlavní úlohou M1 makrofágů je působení v potlačování nádorového bujení a v boji s patogenními bakteriemi. Produkují pro-zánětlivé mediátory, jako interleukiny (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23) a *Tumor necrosis factor (TNF α)*. K M1 polarizaci dochází po aktivaci povrchových receptorů, jako jsou *toll-like receptors (TLRs)*. K jejich aktivaci dochází např. lipopolysacharidy (LPS) a kolonie-stimulujícím faktorem. (GM-CSF) (Martinez and Gordon, 2014). Oproti tomu fenotyp M2 podporuje hojení a obnovu tkání. Je indukován Th2 cytokiny (IL-4, IL-13) a dalšími faktory (Gordon, 2016).

Z předchozích odstavců je tedy zjevné, že M1 makrofágy jsou důležité k obraně organismu proti patogenům, které jej ohrožují. Jak změny nastavení svého buněčného metabolismu je popsáno v následující kapitole.

1.5. Změny v metabolických drahách u M1 baktericidních makrofágů

Aby se M1 baktericidní makrofágy dokázaly vypořádat s napadením jedince cizorodými organismy, musí výrazně změnit svůj buněčný metabolismus na metabolismus aerobní glykolýzy. Úprava metabolických drah v glykolýze, v pentózofosfátovém cyklu a v mitochondriálním metabolismu je regulována transkripčním faktorem *Hypoxia-inducibilní faktor 1- α (Hif1 α)* (Galván-Peña and O'Neill, 2014). *Hif1 α* je zodpovědný nejen za indukci fenotypu M1 (Mills, Lenz, and Ley, 2015), ale také za uvolňování prozánětlivých cytokinů (Albina et al., 2001). *Hif1 α* je ve všech buňkách neustále produkován a degradován, k aktivaci jeho transkripční funkce musí být stabilizován a

traslokován do jádra. Aby se uskutečnila stabilizace *Hif1 α* , musí být faktor zvaný Nuclearfactor–kappa B (NF-kB) aktivovaný pomocí (TLR). To vede ke zvýšení exprese *Hif1 α* a jeho stabilizaci skrze sekvestraci železnatými ionty proteinem feritinem. NF-kB není závislý na přísunu kyslíku a může tak indukovat expresi transkripčního faktoru *Hif1 α* i v normoxických podmínkách (Siegert et al., 2015; (Jung et al., 2003). V důsledku aktivity NF-kB jsou cytosolové ionty Fe²⁺ vychytávány proteinem feritinem (Siegert et al., 2015). Železnatý iont slouží jako substrát pro prolyl hydroxylázu dehydrogenázu (PHD). PHD hydroxyluje *Hif1 α* , který je následně degradován v proteazomu. Následkem nedostatku kyslíku dochází ke snížení aktivity PHD (Ivan et al., 2001). To vyvolá stabilizaci *Hif1 α* , jeho akumulaci v jádře a přetvoření buněčného metabolismu (Siegert et al., 2015). V jádře se váže na hormone response element (HRE). HRE se nachází v promotoru různých genů, kde stimuluje jejich expresi (Wenger, Stiehl, and Camenisch, 2005). Tyto geny jsou spojovány především s regulací buněčného metabolismu, proliferací a cytokinovou signalizací (Dengler, Galbraith, and Espinosa, 2014).

Hif1 α spouští aerobní glykolýzu a tím vyvolává polarizaci makrofágů na fenotyp M1 (Wang et al., 2017). Hlavním zdrojem produkce ATP je glukóza, která se v cytosolu buněk přeměňuje na pyruvát v přítomnosti glykolytických enzymů. Ve srovnání s mitochondriálním metabolismem (oxidativní fosforylací) je glykolýza málo efektivní způsob generování ATP, jelikož vznikají pouze 2 molekuly ATP na jednu molekulu glukózy. Avšak umožňuje velké zvýšení rychlosti metabolismu, protože se buňky nezdržují časově náročným transportem pyruvátu do mitochondrií (Thomas and Halestrap, 1981). Díky tomu se může glykolýza zrychlit až stokrát, což kompenzuje nižší efektivitu tvorby ATP (Obach et al., 2004; Riddle et al., 2000). Přestože tento metabolismus syntetizuje dostatečné množství ATP, makrofágy stále potřebují TCA cyklus pro syntézu řady nezbytných látek (Sancho, Enamorado, and Garaude, 2017).

Vedlejší dráhu aerobní glykolýzy představuje pento-fosfátový cyklus (PPP). Cyklus probíhá v cytosolu buňky a je zodpovědný za tvorbu nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADPH) pro anabolické reakce a ribózu-5-fosfát. Z ribózy-5-fosfát se syntetizují nukleotidy, puriny, pyrimidiny, aminokyseliny nebo mastné kyseliny. V PPP se tvoří velké

množství NADPH, který je důležitý pro generaci reaktivní formy kyslíku (ROS). Tyto reaktivní formy kyslíku jsou spojovány s usmrcováním patogenů a tvorbou antioxidantního glutathionu, ochránce před oxidačním stresem (Nagy and Haschemi, 2015). Na konci glykolýzy, při nedostatečném množství kyslíku, se pyruvát nekonvertuje na Acetyl-CoA, ale místo toho na laktát, který je vyloučen z buňky ven (EL Kasmi and Stenmark, 2015).

V M1 makrofázích je oxidativní fosforylace (OXPHOS) omezená. Proto se musí konvertovat pyruvát na laktát, aby se obnovilo NAD⁺ a zachoval se glykolytický tok (Viola et. al., 2019). I když je metabolismus pyruvátu omezený během aerobní glykolýzy v Krebsově cyklu (TCA), ukázalo se, že meziproducty tohoto cyklu jsou nepostradatelné pro další buněčné procesy (Langston, Shibata, and Horng, 2017). Hlavním vstupním metabolitem do TCA je po aktivaci makrofágu glutamát. Aby mohly být vytvořeny potřebné metabolity, musí se využít v obou směrech cyklu a tím dochází k porušení cyklu. Výsledkem je změna celé řady intermediátů (meziproductů) TCA cyklu. Proto musí být TCA cyklus mimo jiné zásobován i glutamátem, což je počáteční prekurzor pro tvorbu meziproductů důležitých pro baktericidní úlohu v extracelulárním prostoru. Když je tento cyklus doplňován jiným způsobem než obvykle, dodávkou glutaminu, způsobí to „zlomení“ TCA cyklu. To vede ke změně koncentrací některých meziproductů TCA (např. sukcinátu, fumarátu, L-2-hydroxyglutarátu), účastnících se také stabilizace *Hif1α* v cytosolu (Bailey and Nathan, 2018).

Důležitou součástí M1 metabolismu je také příjem dostatečného množství lipidů. Lipidy ve formě fosfolipidů jsou využity při masivní remodelaci buněčné membrány při fagocytóze, pinocytóze a endocytóze (Nishiyama-Naruke and Curi, 2000; (Moore, Sheedy, and Fisher, 2013; Tabas and Bornfeldt, 2016). Pro funkci makrofágů je důležitý cholesterol, avšak jako volný je pro buňky toxický (Tall and Yvan-Charvet, 2015). Tudíž musí být společně s mastnými kyselinami esetrifikován (Spann and Glass, 2013). Současně je také důležitý pro udržení lipidových raftů v buněčných membránách. Cholesterol a cholesterol-ester se využívá k syntéze catecholaminů, jakožto signálních a efektorových látek pro imunitní odpověď (Pirillo, Catapano, and Norata, 2015; Tall and Yvan-Charvet,

2015). Triglyceridy jsou využité jako energetický zdroj a jako alternativní zdroj pro TCA cyklus (Huang et al., 2014).

Se změnou buněčného metabolismu makrofágu se mění i energetické a nutriční nároky. Zvýší se tím požadavky na vstupní metabolity. M1 makrofágy jsou vzhledem k aktivaci výše zmíněných drah funkčně závislé na dostatečném množství stavebních látek, zejména glukózy, glutaminu a lipidů (Newsholme et al., 1986). Na základě těchto poznatků jsme se v naší práci rozhodli ověřit, zda makrofágy *D. melanogaster* přijímají lipidy ve formě lipoproteinů během bakteriální infekce *S. pneumoniae*.

1.6. *Drosophila melanogaster* jako model pro studium metabolismu během infekce

Drosophila melanogaster je vhodný modelový organismus pro výzkum molekulárních mechanismů, jenž řídí metabolismus imunitních buněk. U savců se některé složky přirozené imunity vysoce podobají přirozené imunitě *D. melanogaster*. Během bakteriální infekce dochází k narušení rovnováhy mezi buňkami, tkáněmi a orgány. Vrozená imunitní odpověď slouží *D. melanogaster* k obraně proti nejrůznějším parazitům či mikrobům (Govind, 2008).

Při našem výzkumu byla injikována do těla *D. melanogaster* tenkou skleněnou kapilárou přesná dávka bakterie *Streptococcus pneumoniae*. Následovalo namnožení bakterie uvnitř těla mouchy (Troha and Buchon, 2019) spojené s imunitní reakcí, která probíhá ve dvou fázích. (Lemaitre and Hoffmann, 2007). Akutní fáze probíhá prvních 24 hodin, kdy populace bakterií rychle roste. Vlivem fagocytózy se snaží organismus eliminovat množení patogenu (Pham et al., 2007; Bajgar and Dolezal 2018). Druhá fáze (resolution phase) vede k odstranění zbytků bakterií makrofágy a k obnovení homeostázy (Chambers, Lightfield, and Schneider, 2012; Bajgar and Dolezal, 2018).

Během akutní fáze bakteriální infekce podstupují baktericidní M1 makrofágy *D. melanogaster* metabolický posun směrem k aerobní glykolýze. Jsou závislé na *Hif1a*, stejně jako makrofágy savců. Zjistilo se, že v aktivovaných makrofázích je zvýšená exprese tohoto transkripčního faktoru. To souvisí se zvýšeným příjmem glukózy, expresí a aktivitou glykolytických

genů, zrychlením glykolýzy, vyšší tvorbou NADH a laktátdehydrogenázy, která zprostředkovává redukci pyruvátu na laktát. Tyto všechny procesy jsou důležité pro baktericidní funkci a vypořádání se s patogeny. V reakci na infekci *Streptococcus pneumoniae* vykazují makrofágy intenzivnější schopnost fagocytózy a vyšší spotřebu glukózy (Mills et al., 2000; Langston, Shibata, and Horng, 2017; Krejčová et al., 2019).

Rezistence k bakteriální infekci se stanovuje analýzou přežívání infikovaných jedinců. Prostřednictvím metody Colony forming units (CFU) je možné stanovit rychlost růstu *Streptococcus pneumoniae* v jedincích *D. melanogaster*. Spočítání CFU na jednoho experimentálního jedince infekci, slouží jako kvantitativní metoda pro měření živých bakterií v organismu. (Troha and Buchon, 2019; Lemaitre and Hoffmann, 2007; Govind, 2008). Můžeme si tak vytvořit představu, jak jedinci infekci přežívají a jak v nich roste patogen.

Kromě charakteristiky imunologické můžeme měřit také charakteristiky metabolické. Lze stanovovat množství metabolitů v cirkulaci, v tukovém tělese, případně v celém těle živočicha *D. melanogaster*. V této práci jsou měřeny tři metabolity: cholesterol, cholesterol-ester a proteiny.

Ke zjišťování účinku genu a jeho rolí v konkrétní tkáni organismu se dají použít různé specifické nástroje. Prvním charakterizovaným systémem je Gal4-UAS. Tento nástroj umožňuje tkáňově specifickou kontrolu genové exprese. Díky tomuto systému můžeme zkoumat jednotlivé role genů v konkrétním místě (Halpern et al., 2008). Pokud chceme exprimovat gen nejen v určité tkáni, ale i v daný čas, použijeme teplotně senzitivní inhibiční protein Gal 80 (Zeidler et al., 2004). Další technikou, která je využívána společně s GAL4-UAS systémem, je RNA interference (RNAi). Tato metoda slouží k umlčování genů. Je to buněčný mechanismus založený na degradaci messenger RNA (mRNA). Díky tomu tedy můžeme posoudit tkáňově specifické role daného genu (Heigwer, Port, and Boutros, 2018). Kromě RNAi je v této práci použito také nástroje k overexpresi, kdy je v daných buňkách produkováno nadměrné množství mRNA kódující zkoumaný protein (Prelich, 2012).

Podobně jako u savců, dochází u *D. melanogaster* ke změně buněčného metabolismu a následně i ke změně nutričních nároků. Můžeme tak sledovat, jaký dopad má tato adaptace na celkový metabolismus jedince během infekce.

1.7. Systemické metabolické změny jako podmínka efektivní imunitní odpovědi

Během bakteriální infekce dochází k celé řadě metabolických adaptací na úrovni systemického metabolismu a tukového tělesa. Imunitní odpověď je velice energeticky náročný proces, při němž se musí zneškodnit napadené patogeny. Pro účinnou rezistenci na *Streptococcus pneumoniae* je potřeba přetvoření systemického metabolismu souvisejícího s uvolňováním glukózy z glykogenu (Bajgar and Dolezal, 2018). Při vyšších energetických nárocích je mobilizován do hemolymfy a rozložen díky enzymu glykogen-fosforyláze zpět na glukózu. Z toho vyplývá, že glykogen funguje jako zdroj energie (Reyes-DelaTorre, Teresa, and Rafael, 2012; Steele, 1982). Během imunitní odpovědi musí být systemický metabolismus přísně regulován, jinak si patogen uzurpuje veškerou energii pro vlastní potřebu (Bajgar and Dolezal, 2018). Výzkum prokázal, že metabolické změny, které jsou vyvolány transkripčním faktorem *Hif1a* vedou k přeprogramování systemického metabolismu karbohydrátů. Ukázalo se, že *Hif1a* vykazuje změnu buněčného metabolismu makrofágů směrem k aerobní glykolýze, spojenou se systemickými metabolickými změnami v aktivovaných makrofázích (Krejčová et al., 2019).

Klidové a baktericidní makrofágy jsou charakteristické rozdílným použitím lipidů. Klidové makrofágy potřebují menší množství lipidů, které jsou zdrojem energie z oxidace mastných kyselin. Baktericidní makrofágy tak aktivují transkripční faktor *Hif1a*, což směřuje k akumulaci mastných kyselin a cholesterolu (Mylonis, Simos, and Paraskeva, 2019; Shen & Li, 2017). To je spojeno se zvýšeným příjmem lipidů ve formě lipoproteinů (Mylonis et al. 2012; Shen and Li, 2017).

Lze tedy předpokládat funkční vztah mezi buněčným metabolismem makrofágů a systemickým metabolismem, ačkoli tento vztah nebyl doposud dostatečně prozkoumán.

1.8. Teorie sobeckého imunitního systému

V okamžiku napadení organismu patogenem, je naprosto zásadní aktivovat imunitní buňky a doručit metabolity do imunitního systému. Zatímco v běžných podmínkách je energie rozdělována mezi reprodukci, vývoj a růst organismu, v momentě napadení infekcí je veškerá energie přeměrována k imunitní odpovědi. Za tímto účelem produkují aktivované imunitní buňky celou řadu signálních faktorů. Tyto signální molekuly ovlivňují systemický metabolismus a tím si imunitní buňky zajišťují dostatek energie. Tento koncept byl pojmenován jako sobecký imunitní systém (Bajgar et al., 2015; Straub, 2014).

Imunitní systém vykazuje „sobecké“ chování, protože si bere většinu dostupné energie pro sebe. K tomu využívá inzulinovou rezistenci, což je stav, kdy zbytek orgánů vykazuje sníženou reakci na endokrinní peptidový hormon inzulin (Almajwal et al., 2019). Inzulin se váže na receptory cílových buněk a zajišťuje transport živin do tkání (Chan and Steiner, 2000). Inzulinová rezistence je považována sice za patologický stav, ale evolučně má jistý fyziologický význam (Soeters and Soeters, 2012; Odegaard and Chawla, 2013).

Zhoršenou inzulinovou signalizaci vyvolávají různé signální látky zejména cytokiny. Ty způsobují zvýšení koncentrace cirkulujících látek, jako je glukóza, lipoproteiny nebo aminokyseliny. Inzulinová signalizace je důležitá pro růst, vývoj a zrání ovarií. Podílí se nejen na omezování spotřeby cirkulujících energetických látek, ale navíc v centrálních metabolických orgánech indukuje jejich uvolňování (Alejandra Figueroa-Clarevega and David Bilder, 2016). V tukové tkáni vede inzulinová rezistence k lipolýze a mobilizaci mastných kyselin, zatímco v hepatocytech stimuluje syntézu lipoproteinů (Puigserver et al., 2003).

Bakteriální infekce má vliv na systemický metabolismus. To je zprostředkováno především inzulinovou resistencí. Pokud tento stav trvá dlouhou dobu, vzniká chronická inzulinová rezistence vedoucí k hyperglykémii a hyperlipidémii a následné kachexii. Změněná distribuce energeticky bohatých sloučenin se tak stane škodlivou a vede k rozvoji patologických stavů. Stejně tak adaptivní metabolismus nutný pro efektivní boj s patogeny souvisí s přítomností signálních faktorů vyvolávajících

inzulinovou rezistenci a pre-kachektický stav (Shi et al., 2019; Khovidhunkit et al., 2004).

Jelikož nejsou lipidy rozpustné ve vodě, musí být transportovány v cirkulaci ve formě lipoproteinů. Podle podílu triglyceridů na celkové složení lipoproteinu se dělí na lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL) (Gaudet, Drouin-Chartier, and Couture, 2017; Bhatt and Rohatgi, 2016) s nízkou hustotou (LDL) a velmi nízkou hustotou (VLDL). Především LDL jsou důležité pro transport většiny cholesterolu do tkání, ovšem jejich nadbytek způsobuje vznik aterosklerotických plaků (Nordestgaard et al., 2010). Lipoproteiny obsahují kromě povrchových lipoproteinových komplexů apolipoproteinů, také triglyceridy, cholesterol, cholesterol-ester a fosfolipidy. Jsou transportovány na velkou vzdálenost, avšak mohou být přijímány jen určitými tkáněmi (Nishiyama-Naruke & Curi, 2000).

Předtím, než lipoproteiny vstoupí do buňky, jsou pozastaveny lipoproteinovými receptory. Po jejich proniknutí jsou degradovány v lysozomu působením lipázy na volný cholesterol a mastné kyseliny. Tento proces byl pojmenován jako kyselá lipolýza (Nordestgaard et al., 2010; Huang et al. 2014). Makrofágy přijímají tyto nutričně bohaté látky pomocí svých povrchových scavenger receptorů procesem zvaným endocytóza (Huang et al., 2014). Bylo dokázáno, že se lipoproteiny akumulují v makrofázích, které jsou tak privilegované v dostupnosti této formy živin (Moore et al., 2013).

Pro zajištění správné funkce makrofágů během akutní fáze infekce je potřeba dostatečné množství lipidů. Avšak na základě nerovnováhy metabolismu lipidů se mohou makrofágy přeměnit na fenotyp pěnových buněk se zvýšeným obsahem LDL cholesterolu, které se akumulují ve stěnách tepny. Pokud odpověď zánětlivých makrofágů přetrvává delší dobu, z akutní infekce může vzejít zánět chronický, ateroskleróza. Výsledná dysregulace metabolismu lipidů mění fenotyp makrofágů na M1. Pro-zánětlivý fenotyp M1 vylučuje aterosklerotické cytokiny (IL-6 a IL-12) (Chistiakov et al., 2017; Moore et al., 2013). Z tohoto důvodu musí být tyto imunitní buňky kontrolovány a regulovány, aby nedošlo k destrukci tkáně (Wynn, Chawla, and Pollard, 2013).

Jak již bylo zmíněno, pokud jsou zvýšeným množstvím energetických látek zásobovány imunitní buňky pouze dočasně, mohou tyto buňky úspěšně eliminovat patogeny. Dlouhodobé nadměrné dodávání těchto látek však může vést k chronickému stavu a způsobovat různé patologické jevy, jako jsou ateroskleróza, cukrovka a další nemoci. Faktory, které ovlivňují vztahy mezi imunitními buňkami a centrálními metabolickými orgány se nazývají selfish imune factors (sobecké imunitní faktory).

1.9. Teoretické podmínky pro selfish imune factors

Selfish imune factors musí splňovat několik teoretických předpokladů. Jejich produkce je vázána na aktivaci makrofágů, jsou produkovány imunitními buňkami, mají potenciál se šířit a ovlivňovat metabolismus v cílových tkáních a podílí se na indukci inzulinové resistance (Bajgar, Krejčová, and Doležal, 2021).

Jedním z prvních kandidátů na signální molekulu sobeckého imunitního systému je extracelulární adenosin (Natali et al., 1994). Adenosin je nukleosid odvozený z purinu (Yegutkin, 2008) a funguje jako přepínač energie, kterou přesměrovává od vývojových procesů k imunitním buňkám. Je spojován se systémovou mobilizací sacharidů pro nutnou imunitní obranu. Pokud se zvedne účinek této molekuly během akutní fáze infekce, zvýší se imunitní odpověď hostitele a to může být prospěšné pro jeho odolnost. Tato molekula musí být regulována imunitními buňkami, aby se zabránilo negativním následkům při nadměrném uvolňování energie (Bajgar and Doležal, 2018).

Kromě adenosinu lze však předpokládat další signální molekuly s podobnými funkcemi, z nichž některé mohou způsobovat třeba rakovinnou kachexii. Rakovinné buňky sdílí s baktericidními M1 makrofágy metabolismus a tvorbu několika pro-zánětlivých cytokinů s dopadem na systemický metabolismus. Růst nádorů závisí na indukci systemických metabolických změn, zahrnujících inzulinovou rezistenci a kachexii. Tyto mechanismy slouží k uzurpování si dostatečného množství živin z anabolických procesů hostitele. Pro-kachektický účinek nádorů je taktéž

spojen s přijetím aerobní glykolýzy závislé na transkripčním faktoru *Hif1 α* (Koltai, 2020; Schwartsburd, 2017).

1.10. Impl2 jako kachektický faktor v rakovině

Možným kandidátem na „sobecký“ signální faktor je IMPL2, produkovaný mimo jiné rakovinnými buňkami. Výzkumy s druhem *Drosophila melanogaster* přispěly k odhalení genetických faktorů podílejících se na vzniku rakoviny. V rámci podobnosti ve fyziologických regulacích u *D. melanogaster* a lidí (Leopold and Perrimon, 2007), je využívána *D. melanogaster* jako jednoduchý organismus ke studiu mechanismů, kterými může rakovina narušit homeostázu. Tento modelový organismus posloužil k identifikaci systemického faktoru IMPL2, který je produkován nádorovými buňkami a způsobuje systemickou inzulinovou resistenci a kachexii.

IMPL2 byl identifikován jako kachektický faktor. Tkáně vzdálené od nádoru jsou často postiženy rakovinnou kachexií. Ta je typická tím, že tkáně vykazují příznaky nutričního deficitu, i když je hladina živin v cirkulaci dostačující. Tento proces se vyznačuje nedobrovolnou ztrátou tělesné hmotnosti, projevující se především úbytkem kosterních svalů a tukových tkání (Alejandra Figueroa-Clarevega and David Bilder, 2016).

Signální faktor IMPL2 se váže na systemické ligandy podobné inzulinu a tím brání jeho signalizaci v periférních tkáních *D. melanogaster*. IMPL2, jako hlavní mediátor, je sekretovaný inzulinovým antagonistou, produkovaným maligními nádory, což vede ke tkáňové kachexii. Tumor je zodpovědný za indukci inzulinové rezistence. V periférních tkáních se sníží inzulinová signalizace inzulinu a zvýší se hladiny cirkulujícího cukru. Prostřednictvím inzulinové rezistence *Impl2* ovlivňuje metabolismus tukové tkáně a indukuje mobilizaci živin, které posléze používá nádor pro svůj růst (Kwon et al. 2015; Alejandra Figueroa-Clarevega and David Bilder, 2016). Rozhodli jsme se ověřit, zda je *Impl2* odpovědný za regulaci exprese lipoproteinů v tukovém tělese a jejich následnou mobilizaci do hemolymfy.

1.11. Role genu *ImpL2* u *Drosophila melanogaster*

Gen *ImpL2* je členem superrodiny imunoglobulinů a reprezentují ho geny kódující 20-hydroxyekdyson-indukované proteiny, které se vážou na membránu (Garbe, Yang and Fristrom, 1993). Je charakteristický svou vazbou na peptid *Drosophila Insulin-Like Peptid 2* (*Dilp2*) a inhibuje růst. Předpokládáme, že tento protein společně s homologem IGFBP7 dokáže inhibovat inzulinovou signalizaci (Honegger et al., 2008). Důsledkem tohoto narůstá koncentrace cirkulující glukózy, zatímco jsou vyčerpány zásoby glykogenu (Alejandra Figueroa-Clarevega and David Bilder, 2016).

Velkou pozornost si zaslouží jaterní makrofágy (LM), které produkují Insulin-like Growth Factor Binding Protein 7 (IGFBP7), savčí homolog IMPL2. Tento protein se váže na růstový faktor podobný inzulinu Insulin-like Growth Factor (IGF) regulující metabolismus jater, mimo to má velmi vysokou afinitu k samotnému inzulinu. Bylo dokázáno, že během obezity a inzulinové rezistence, jaterní makrofágy z počátku nepodstupují změnu na pro-zánětlivý fenotyp M1. Regulují však funkci hepatocytů (jaterních buněk). Jedním z nich je již zmíněný protein IGFBP7, kódovaný genem regulujícím inzulinovou signalizaci v buňkách savců (včetně člověka). Tento faktor je základem remodelace metabolismu podléhajícímu LM. U zdravých hepatocytů, citlivých na inzulin, byl pozorován protein IGFBP7, který se váže na inzulinový receptor a tím zvyšuje aktivaci proteinkinázy (AKT). To vede ke snížení glukoneogeneze neboli syntézy glukózy. Zatímco u jaterních buněk rezistentních na inzulin, je vazba IGFBP7 na inzulinový receptor omezena, přesto je dostatečně schopna aktivace ERK1/2 kinázy (Extracellular Signal-Regulated Kinases) a indukce genů zodpovědných za syntézu glukózy a lipidů (Morgantini et al., 2019).

1.12. *ImpL2* produkováný makrofágy při infekci

Naše laboratoř zjistila, že u dospělých jedinců octomilek (*D. melanogaster*), infikovaných bakteriální infekcí *S. pneumoniae*, jsou makrofágy převládajícími producenty proteinu IMPL2. Experimentálně byl ukázán nárůst tvorby genu *ImpL2* v aktivovaných makrofázích metodou qPCR a také pomocí genetického konstruktů *ImpL2GAL4>UASmCherry* (mCherry- fluorescenční

marker). Bylo dokázáno, že zvýšení exprese genu *ImpL2* souvisí s metabolickou změnou, která je indukována transkripčním faktorem *Hif1α* po infekci. *Hif1α* reguluje nejen změnu buněčného metabolismu směrem k aerobní glykolýze, ale také expresi genu *ImpL2* (Krejčová et al., 2020). Ačkoli se tedy zdá, že by *Hif1α* mohl spustit expresi signální molekuly *ImpL2*, nebyla zatím jeho role v tomto procesu experimentálně ověřena.

Cílem této bakalářské práce je zjistit, zda gen *ImpL2* indukuje změny v systemickém metabolismu během akutní fáze bakteriální infekce u *Drosophila melanogaster*. Konkrétně jsme se rozhodli charakterizovat vliv genu *ImpL2* na expresi genů ovlivňujících lipoproteinový metabolismus v tukovém tělese, v reakci na bakteriální infekci a následně ověřit jeho působení na koncentraci lipoproteinů v hemolymfě a jejich akumulaci v makrofázích.

2. Cíle práce

Dosavadní výzkum prokázal signifikantní nárůst exprese genu *Impl2* v aktivovaných makrofázích během infekce. Nicméně vliv tohoto cytokinu na mobilizaci energeticky bohatých látek nebyl doposud prokázán v kontextu imunitní odpovědi.

Pro zodpovězení této komplexní otázky jsem si vytyčila následující dílčí cíle:

1. Analyzovat vliv makrofágy produkované signální molekuly IMPL2 na expresi genů ovlivňujících lipoproteinový metabolismus v tukovém tělese po infekci *Streptococcus pneumoniae*
2. Identifikovat vliv makrofágy produkovaného signálního cytosinu IMPL2 na koncentraci cholesterolu a cholesterol-esteru v hemolymfě po infekci *S. pneumoniae*
3. Charakterizovat vliv makrofágy produkovaného signálního cytosinu IMPL2 na koncentraci cholesterolu a cholesterol-esteru v makrofázích po infekci *S. pneumoniae*

Záměrem této práce bylo objasnit, zda cytokin IMPL2 odpovídá za indukci změn v systemickém metabolismu a zvýší tak dostupnost živin pro imunitní systém v průběhu akutní fáze bakteriální infekce u *Drosophila melanogaster*.

3. Materiály a metody

3.1. Chov *Drosophila melanogaster*

Mouchy byly chovány ve dvou typech vialek, a to ve skleněných a v plastových s potravou umístěnou na dně. Jejich konce se uzavřely vatovou zátkou. Ve skleněných vialkách byl druh *Drosophila melanogaster* živen standartní kukuřičnou dietou s 5% sacharózou (Tab. 1) a udržován v prostředí s řízenou vlhkostí, kde se přirozeně střídalo světlo (12 hodin) a tma (12 hodin) při teplotě 25°C. Dospělí samci *D. melanogaster* byli na dobu 7 dnů přesunuti do plastových vialek na experimentální dietu s kukuřičnou stravou bez sacharózy (Tab. 2), následně byli infikováni bakterií *Streptococcus pneumoniae*. Analýza exprese a stanovení hladiny metabolitů byla provedena 24 hodin po infikování jedinců. Kvůli indukci teplotně citlivého genetického konstruktů a optimální teplotě pro růst bakterie *Streptococcus pneumoniae* musely být tyto infikované mouchy uchovávány v inkubátorech při teplotě 29°C. Každý druhý den byly octomilky bez použití CO₂ přenášeny do čerstvých vialek pro zajištění dobré kvality potravy. Vlhkost v inkubátorech se pohybovala v rozmezí 52-57%. S homozygotním samcem nesoucím RNAi konstrukt pod UAS sekvencí se křížila vždy panna *D. melanogaster* homozygotní pro genetický konstrukt Hml Gal4 Gal80^{TS} nebo konstrukt Crq Gal4 Gal80^{TS}, což bylo velmi důležité pro vznik 100% potomků s kombinací Gal4 Gal80 a RNAi v nové generaci.

Tabulka 1: Standartní dieta s 5% sacharózy

Voda	1500 ml
Kukuřičná mouka	80 g
Agar (Armesco, J637)	10 g
Instantní kvasnice	40 g
Sacharóza	50 g
Vaření 12 minut na 100°C, poté 50 minut na 90°C, chlazení při 60°C	
10% Methylparaben	16,7 ml

Tabulka 2: Experimentální dieta s 0% sacharózy

Voda	1500 ml
Kukuřičná mouka	53,3 g
Agar Drosophila Type II. (Apex - 66 - 103)	6,2 g
Instantní kvasnice	28,2 g
Sacharóza	0 g
Vaření 12 minut na 100°C, poté 50 minut na 90°C, chlazení při 60°C	
10% Methylparaben	16,7 ml

3.2. Křížení

Níže popsané křížení bylo provedeno za účelem získání mušek s požadovanou kombinací určitých charakteristik.

Křížení č. 1: Experimentální linie Hml Gal4 Gal80 x ImpL2 RNAi

$$P: \frac{w}{w}; \frac{Hml\ Gal4}{Hml\ Gal4}; \frac{P\{TubGal80TS\}}{P\{TubGal80TS\}} \quad X \quad \frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{UAS\ ImpL2\ RNAi}{UAS\ ImpL2\ RNAi}$$

$$F1: \frac{w}{/}; \frac{Hml\ Gal4}{+}; \frac{P\{TubGal80TS\}}{UAS\ ImpL2\ RNAi}$$

Křížení č. 2: Experimentální linie Crq Gal4; UAS2xGFP x ImpL2 RNAi

$$P: \frac{w}{w}; \frac{CrqGal4}{CrqGal4}; \frac{UAS\ 2xGFP}{UAS\ 2xGFP} \quad X \quad \frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{UAS\ ImpL2\ RNAi}{UAS\ ImpL2\ RNAi}$$

$$F1: \frac{w}{/}; \frac{CrqGal4}{+}; \frac{UAS\ 2xGFP}{UAS\ ImpL2\ RNAi}$$

Křížení č. 3: Experimentální linie Hml Gal4 Gal80 x UAS ImpL2 CDS

$$P: \frac{w}{w}; \frac{Hml\ Gal4}{Hml\ Gal4}; \frac{P\{TubGal80TS\}}{P\{TubGal80TS\}} \quad X \quad \frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{UAS\ ImpL2\ CDS}{UAS\ ImpL2\ CDS}$$

$$F1: \frac{w}{/}; \frac{Hml\ Gal4}{+}; \frac{P\{TubGal80TS\}}{UAS\ ImpL2\ CDS}$$

Křížení č. 4: Experimentální linie Crq Gal4; UAS 2xGFP x UAS Impl2 CDS

$$P: \frac{w}{w}; \frac{CrqGal4}{CrqGal4}; \frac{UAS\ 2xGFP}{UAS\ 2xGFP} \quad X \quad \frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{UAS\ Impl2\ CDS}{UAS\ Impl2\ CDS}$$

$$F1: \frac{w}{/}; \frac{CrqGal4}{+}; \frac{UAS\ 2xGFP}{UAS\ Impl2\ CDS}$$

Křížení č. 5: Experimentální linie Hml Gal4 Gal80 x TRiPcontrol

$$P: \frac{w}{w}; \frac{Hml\ Gal4}{Hml\ Gal4}; \frac{P\{TubGal80TS\}}{P\{TubGal80TS\}} \quad X \quad \frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

$$F1: \frac{w}{/}; \frac{Hml\ Gal4}{+}; \frac{P\{TubGal80TS\}}{+}$$

Křížení č. 6: Experimentální linie Crq Gal4; UAS 2xGFP x TRiP control

$$P: \frac{w}{w}; \frac{CrqGal4}{CrqGal4}; \frac{UAS\ 2xGFP}{UAS\ 2xGFP} \quad X \quad \frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

$$F1: \frac{w}{/}; \frac{CrqGal4}{+}; \frac{UAS\ 2xGFP}{+}$$

Křížení č. 7: Experimentální linie Hml Gal4 Gal80 x w [1118]

$$P: \frac{w}{w}; \frac{Hml\ Gal4}{Hml\ Gal4}; \frac{P\{TubGal80TS\}}{P\{TubGal80TS\}} \quad X \quad \frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

$$F1: \frac{w}{/}; \frac{Hml\ Gal4}{+}; \frac{P\{TubGal80TS\}}{+}$$

Křížení č. 8: Experimentální linie Crq Gal4; UAS 2xGFP x w [1118]

$$P: \frac{w}{w}; \frac{CrqGal4}{CrqGal4}; \frac{UAS\ 2xGFP}{UAS\ 2xGFP} \quad X \quad \frac{w}{/}; \frac{+}{+}; \frac{+}{+}$$

$$F1: \frac{w}{/}; \frac{CrqGal4}{+}; \frac{UAS\ 2xGFP}{+}$$

3.3. Infekce

Pro infekci much *D. melanogaster* byla pěstována kultura *Streptococcus pneumoniae* (kmen EJ1). Tato kultura byla skladována při teplotě -80°C v médiu Tryptic Soy Broth (TSB) (Sigma) s obsahem 10% glycerolu. Horní vrstva bakterií byla seškrábnuta pomocí jednorázové inokulační smyčky (Biologix) a nanesena na agarové misky s TSB, které se připravily následujícím způsobem (Tab. 3). Agarová miska se přes noc inkubovala při teplotě 37°C (5% CO_2). Zároveň bylo namícháno tekuté TSB medium podle následujícího receptu (Tab. 4): Připravily se tři skleněné zkumavky s tekutým médiem TSB. První z nich se použila pro inokulaci *S. pneumoniae* z agarové misky. Další den byl její obsah přelit do druhé zkumavky s čerstvým médiem. Poslední zkumavka byla použita jako kontrola s blankem (kultivační medium). Následně se do každé skleněné zkumavky přidalo 3 ml kapalného media TSB, které bylo smícháno se 100 mg/ml streptomycinu a 100 000 jednotkami katalázy. Následující den byla do první zkumavky přendána jedna kolonie z agarové misky a umístěna přes noc do inkubátoru s teplotou 37°C s 5% CO_2 . Poté bylo z této zkumavky odebráno 100 μl materiálu a napipetováno do zkumavky druhé. Tento krok umožnil dosažení exponenciální fáze růstové křivky *S. pneumoniae* v době infekce. Vypěstované kultury byly 2x promyty pomocí TSB s čerstvou katalázou. Další 4 hodiny se nechaly růst. Absorbance hustoty bakterií po ukončení daného časového úseku činila 0,4 OD600. Hustota bakterií byla měřena pomocí jednorázové kyvety (BRAND®) při OD600 spektrofotometrem Optizen 1412V. Finální bakteriální kultury byly centrifugovány a rozpuštěny ve fosfátovém pufru PBS tak, aby výsledná absorbance dosahovala hodnoty 2,4 OD600. Kultura *S. pneumoniae* byla do procesu infekce i během ní udržována na ledu.

Sedmidenní samci *D. melanogaster* byli uspáni pomocí CO_2 Flowbuddy Flow Regulator (Genesee Scientific, 7l/min) a následně infikovány 20 000 bakteriemi *S. pneumoniae*. Pomocí přístroje Eppendorf Femtojet byly mouchy injikovány čistým pufrem o objemu 50 nl nebo bakteriální kulturou. Injikace byla provedena do ventrolaterální strany abdomenu jedince. Tato procedura probíhala pod binokulárním mikroskopem (Olympus SZ51).

Tabulka 3: Recept TSB agaru

dH ₂ O	400 ml
TrypticSoyBroth 3%	12 g
Agar (Ambresco, J637) 1,5%	6 g
Vaření 1 minutu v mikrovlnné troubě. Autoklávování 20 minut při 121°C a poté nechat zchladit na 50°C	
Streptomycin sulfátová sůl 0,0075%	0,03 mg/ml

Tabulka 4: Recept tekutého media TSB

dH ₂ O	100 ml
TrypticSoyBroth 3%	3 ml
Vaření 1 minutu v mikrovlnné troubě. Autoklávování 20 minut při 121°C a poté nechat zchladit na 50°C Nakonec použít bakteriální filtr (ø 0,2 µm)	

3.4. Fluorescence – activated cell sorting (FACS)

Ze samců *D. melanogaster* s genotypem Crq-Gal4; UAS2xGFP byly izolovány makrofágy metodou FACS za pomoci přístroje S3TMCell sorter. Pro jejich rozpoznání byly tyto makrofágy označeny zelenou fluorescenční barvou (GFP). Na vzorek bylo požito kolem 200-300 much, které byly postupně rozdrčeny v mikrozkuřavkách společně s 200µl PBS. Mouchy byly předem uspány CO₂. Všechny vzorky byly drženy na ledu. Poté byly octomilky mechanicky homogenizovány. Získaný homogenát (buněčná suspence) se čistil filtrací přes sítko z nylonových vláken. Následně bylo sítko promyto 200 µl PBS roztokem a ten byl opět přilít k homogenátu. Všechny vzorky se centrifugovaly 3 minuty při teplotě 4°C a 3500 otáčkách za minutu. Po každé centrifugaci byl supernatant promyt v 1 ml PBS o teplotě 4°C. Tento krok byl opakován dohromady třikrát.

Vzorky byly přeneseny do polystyrenových FACS zkumavek za použití jednorázového bakteriálního filtru (-50 µm, Sysmex). Makrofágy s endogenně produkovaným GFP pod HemolectinGal4 driverem byly odkloněny do 100 µl PBS pomocí TM 573 Cell Sorter (Bio Rad). Zkumavky s buňkami se uchovávaly v mrazáku při -80°C. Vyizolované buňky byly zkontrolovány pod fluorescenčním mikroskopem a fázovým kontrastem, pro ověření, zda byly skutečně získány GFP pozitivní makrofágy. Takto vyizolované makrofágy byly použity pro qPCR a stanovení metabolitů.

3.5. Stanovení metabolitů

Koncentrace cholesterolu, cholesterol-esteru a proteinů byla zjišťována v hemolymfě a v izolovaných makrofázích. Proteiny se využily pro standardizaci případných odchylek, které mohly být způsobeny rozdílnými velikostmi *D. melanogaster*. Sběr samců se uskutečnil 24 hodin po infekci.

Na izolaci jednoho vzorku hemolymfy bylo použito 25 dospělých samců. Do eppendorf zkumavky s 50 µl PBS byly octomilky umístěny na silikagelový filtra následně centrifugovány. Po 10 minutách stáčení při 4°C a 14000 otáčkách za minutu byly vzorky na proteiny denaturovány při teplotě 75°C po dobu 10 minut. Posléze byly vzorky zmrazeny při teplotě -80°C jako způsob uchování před samotným měřením. K izolaci makrofágů byl použit přístroj Cell sorter, buněčný třídič (kapitola 3.4.). Bylo izolováno 50 000 makrofágů z 250 dospělých samců much, jak je popsáno v předchozí kapitole. Pomocí soupravy Bicinchonic Acid Assay BCA kit (Sigma) byl smíchán jeden díl vzorku s 20 díly roztoku, obsahujícího 50 dílů kyseliny bicinchoninové a 1 dílem B reagentu. Množství proteinů bylo odvozeno z absorbance roztoku při vlnové délce 595 nm.

Cholesterol i ester cholesterolu byly měřeny v izolované lipidové frakci pomocí soupravy Cholesterol/Cholesterol-Ester QuantitationKit (Sigma) podle protokolu dodavatele. Vzorek s 45 µl se smíchal s 50 µl reagentu (Cholesterol Reaction Buffer, Cholesterol Probe, Enzyme Mix, Cholesterol Esterase) a nechal se inkubovat 1 hodinu při 37°C. Absorbance se měřila spektrofotometricky při 570 nm. Protože z cholesterol-esteru po deestetifikací (hydrolyze) vzniká cholesterol, má absorbanci společnou s cholesterolem.

Tímto testem se nejdříve změřil samotný cholesterol a po přidání cholesterol-esterázy se detekoval jak cholesterol, tak cholesterol-ester. K získání cholesterol-esteru se odečetla hodnota cholesterolu od celkové hodnoty cholesterolu společně s cholesterol-esterem.

3.6. Izolace RNA

RNA se izolovala ze sortovaných makrofágů. Bylo izolováno 50 000 makrofágů z 250 dospělých samců much. Vzorky byly umístěny do mikrozkušavek a smíchány s TRIzol Reagentem. Následně byly homogenizovány pomocí drátka ošetřeného DEPC H₂O. Bylo přidáno 900 µl TRIzol Reagentu a 200 µl chloroformu. Poté se všechny vzorky za pomoci vortexu promíchaly (nejméně 20-30 sekund) a udržovaly se 10 minut při pokojové teplotě. Centrifugací (15 minut, 4°C, 14 000 otáček za minutu) byly vzorky odstředěny. Vzniklá vodní fáze byla přepipetována do čisté mikrozkušavky a s přidáním 2 µl glykogenu umístěna na led. Díky tomuto kroku se zlepšila viditelnost peletu. Posléze bylo přidáno 500 µl 100% isopropanolu a vzorky inkubovány na ledu přibližně 10 minut. Po této době byly umístěny do centrifugy (10 minut, 4°C, 14 000 otáček za minutu). Následně došlo k odstranění supernatantu a k peletu bylo přidáno 500 µl 75% EtOH (96% EtOH v DEPC H₂O). Vzorek se nechal opět centrifugovat (5 minut, 4°C, 14 000 otáček za minutu), supernatant byl odstraněn, pelet stočen v centrifuze (1 minuta, 4°C, 14 000 otáček za minutu). Zbývající etanol (EtOH) byl odebrán. Pro jeho úplné odstranění musely být otevřené mikrozkušavky ponechány zhruba 3 minuty při pokojové teplotě. Získaná vyizolovaná RNA se rozpustila v 15 µl DEPC H₂O. Její koncentrace a čistota byla vyhodnocena na spektrofotometru NanoDrop (UVS-99 ACTGene).

3.7. Reverzní transkripce

Ke každému vzorku s vyizolovanou RNA bylo přidáno 1 µl 50 µM oligo(dT) 20 primeru (5´ - d(TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT)-3´,KRD), 4 µl 20 µM dNTPs a 2 µl DEPC H₂O. Pro správné promíchání všech komponent směsi bylo potřeba vzorky krátce centrifugovat. Poté byly všechny mikrozkušavky

dány na 5 minut do termobloku při teplotě 65°C a hned na to umístěny na 1 minutu na led. Po následné krátké centrifugaci bylo do každého vzorku napipetováno 1 µl 0,1M DDT, 4 µl 5x FS III pufru a 1 µl SS III reverzní transkriptázy (od Invitrogenu). Po dobu 50 minut při teplotě 50°C byly vzorky inkubovány a finální inkubace byla provedena při teplotě 75°C po dobu 15 minut.

3.8. qPCR

Reverzní transkripcí byly získány vzorky s cDNA, do nichž bylo přidáno 230µl dH₂O. Následně se do každého vzorku přimíchalo 3 µl směsi, která obsahovala 6 µl TP 2x SYBR Master Mix (Top-Bio), 25 µl 20 µM forward primeru (KRD), 25 µl 20 µM reverzního primeru (KRD) a 250 µl PCR ultra H₂O (Top Bio). Všechny vzorky byly měřeny v tripletech na 96 jamkové destičce (Bio-Rad) pokryté folií Microseal® „C“ (Bio-Rad) a polytetrafluoroethylenovou krycí podložkou (Bio-Rad) na přístroji CFX 1000 Touch Real-Time Cycler (Bio-Rad). Následně byl použit qPCR protokol:

95°C	3 minuty	}	40x
94°C	15 sekund denaturace		
56°C	20 sekund annealing		
72°C	25 sekund elongace		

fluorescenční detekce

analýza křivky tání byla provedena při 65-85°C a každým krokem se teplota zvyšovala o 0,5°C

Výsledná data z qPCR byla analyzována pomocí double delta Ct analysis. Genová exprese byla normalizována dle kontrolní genové exprese housekeeping genu (Ribozomálního proteinu 49) Rp L32 (Rp49). Pro qPCR se použily tyto sekvence primerů:

Impl2 Forward: TTCGCGGTTTCTGGGCACCC

Impl2 Reverse: GCGCGTCCGATCGTCGCATA

MTP Forward: GAATCGAAATGCCCAGACG

MTP Reverse: AACGTTGGTTTGTGTTGAGAAGC

apoLPP Forward: TTGGAATCCTAGCTTCTGTGCT

apoLPP Reverse: AGTCATAGTAGTTGCCGGGTAT

apoLTP Forward: TGGGTGGATTGAAGCCACAG

apoLTP Reverse: TGAGTGGATTTTCTCTCACTGC

Bmm Forward: CACCGCGCCGCAATGAATGTATA

Bmm Reverse: TTCAATCACTGTTTGTCTGGTCGGC

Rp49 Forward: AAGCTGTTCGCACAAATGGCG

Rp49 Reverse: GCACGTTGTGCACCAGGAAC

3.9. Konfokální mikroskopie a barvení Oil Red O

Pro ověření a zdokumentování akumulace lipidů v makrofázích s genotypem CrqGFP, byly tkáně obarveny za použití barviva Oil Red O.

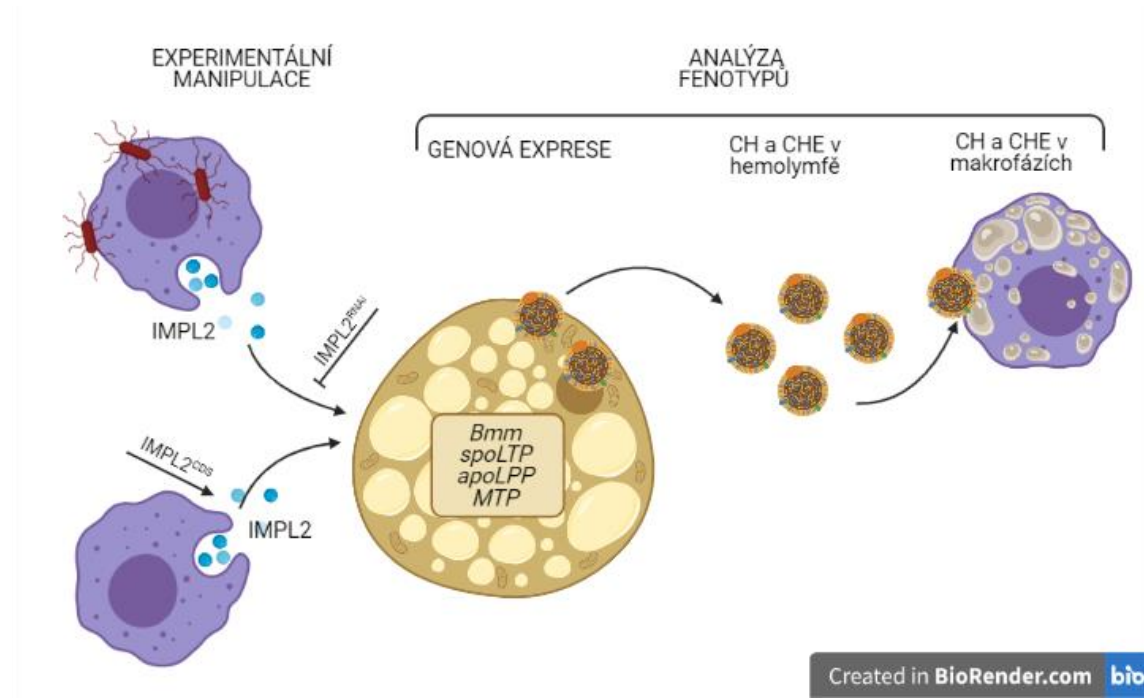
Nejprve byly vzorky *D. melanogaster* vypitvány v Grace's Insect Medium (Sigma). Abdomeny much byly pinzetami otevřeny na hladině kapky PBS na sklíčku, čímž se z nich vyplavily makrofágy. Vzorek se nechal 30 minut ustálit. Vzorek se následně oté fixoval 4% paraformaldehydem (Polysciences). Po 20 minutách byly tkáně promyty v 60% isopropanolu a v PBS. Buňky z abdomenu byly poté barveny pomocí OilRedO rozpuštěného v 60% isopropanolu po dobu 10 minut. Buňky byly promyty 60% isopropanolem a zality médiem Aqua Polymount (Polysciences). Závěrem byly v konfokálním mikroskopu (OlympusFluoView 3000) pozorovány makrofágy a výsledné fotky byly zrekonstruovány za použití softwaru Fiji.

3.10. Graphpad Prism

Pomocí počítačového programu Graphpad Prism 7.03 byla zpracována statistická data této bakalářské práce. Signifikance pro kvantifikaci genové exprese a metabolitů, jak v hemolymfě, tak v hemocytech byla zjištěna prostřednictvím Two-way ANOVY a Tukey's multiple comparison testu. Kvůli vícenásobnému porovnávání datové sady byl proveden Sidak's multiple comparison correction test. Hladina významnosti je uvedena v grafech tímto způsobem: p-hodnota $\leq 0,05$ znamená jedna hvězdička (*), p-hodnota $\leq 0,01$ dvě hvězdičky (**), p-hodnota $\leq 0,001$ tři hvězdičky (***)

4. Výsledky

Cílem této práce je objasnit vliv makrofágy produkovaného cytokinu IMPL2 na mobilizaci energeticky bohatých látek během imunitní odpovědi. Aktivované imunitní buňky vykazují zvýšenou míru produkce signalizačního faktoru IMPL2. K charakteristice jeho role během imunitní odpovědi jsme využili kombinaci streptokokové, infekce společně s genetickými nástroji, k makrofágově specifické regulaci exprese tohoto genu. Díky tomu jsme mohli porovnat vliv genu *ImpL2* v následujících situacích: A) přirozený nárůst exprese genu *ImpL2* po infekci, B) zabránění tohoto nárůstu pomocí makrofágově specifické RNAi, C) experimentální zvýšení exprese genu *ImpL2* i v neinfikovaných jedincích. Tyto experimentální linie byly doplněny adekvátními kontrolami. Díky volenému experimentálnímu přístupu můžeme posoudit důležitost signalizačního faktoru IMPL2 během infekce a zároveň detekovat jeho autonomní, na infekci nezávislý, efekt na sledované charakteristiky. U takto experimentálně manipulovaných jedinců byla měřena exprese genů lipoproteinového metabolismu v tukovém tělese (Obr. 4), koncentrace cholesterolu a cholesterol-esteru, jakožto nedílné součásti lipoproteinů, v cirkulaci a jejich následná akumulace v makrofázích (Obr. 5).



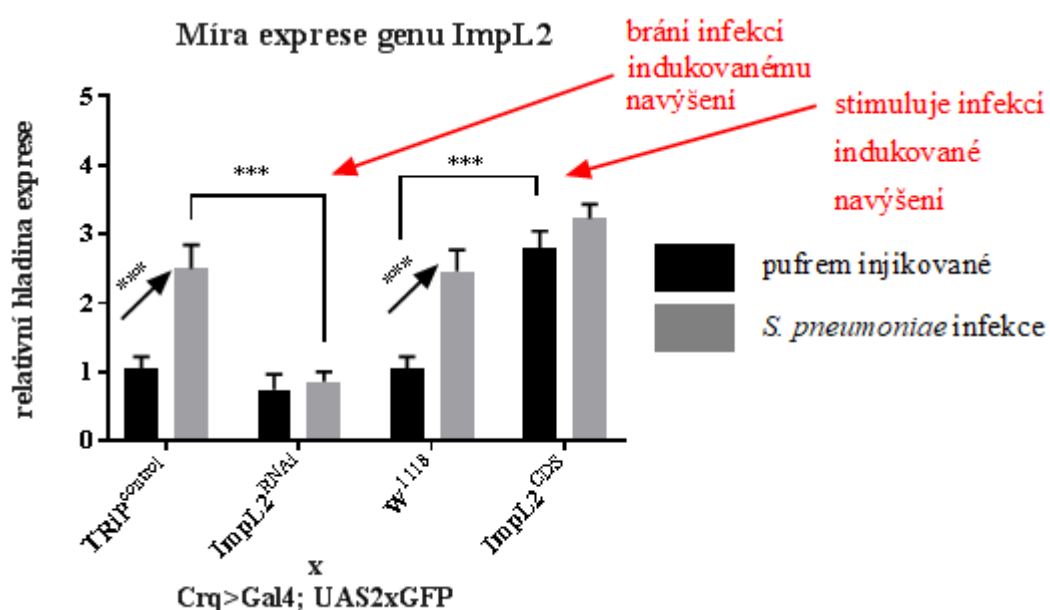
Obrázek 2: Schématické znázornění experimentálních přístupů práce. Manipulace exprese genu *ImpL2* u infikovaných a kontrolních jedinců nám umožnila zjistit vliv tohoto faktoru na expresi genů lipoproteinového metabolismu v tukovém tělese, stejně tak jako skutečnou míru uvolnění lipoproteinů do cirkulace a jejich akumulaci makrofágy (*Bmm-Brummer*; *MTP-Microsomal triglycerol transfer protein*, *apoLTP- apolipoproteinlipid transfer particle*; *apoLPP- apolipophorin*).

4.1. Změna exprese genu *ImpL2* v makrofázích po infekci u *Drosophila melanogaster*

Experimentální manipulace exprese genu *ImpL2* byla provedena pouze v makrofázích za pomoci genetického nástroje UAS-Gal4 pod kontrolou makrofágového promotoru genu *Croquemort (Crq)*. Efektivita regulace exprese pomocí transgenních nástrojů byla posouzena mými kolegy v rámci paralelně běžícího projektu. Z porovnání jednotlivých skupin můžeme vidět, že zatímco infekce vede k výraznému zvýšení exprese genu *ImpL2* makrofágy, aktivace konstruktu k jeho umlčení tento efekt zcela potlačuje. Naopak markantní zvýšení exprese genu *ImpL2* může být dosaženo u rodu *D. melanogaster* indukovanou overexpresí tohoto genu i v kontrolní skupině, která nebyla infekci vystavena (Obr. 3; přejato od Bajgar a Krejčová,

nepublikovaná data). Tento graf nám také může posloužit jako předloha charakteristické odpovědi, kterou je možné očekávat od expresních a metabolických charakteristik závislých na míře produkce faktoru *ImpL2* aktivovanými či experimentálně manipulovanými makrofágy.

Z toho vyplývá, že genetické nástroje, využitě v tomto projektu dávají uspokojivou odpověď z hlediska regulace genové exprese zkoumaného signálního faktoru.



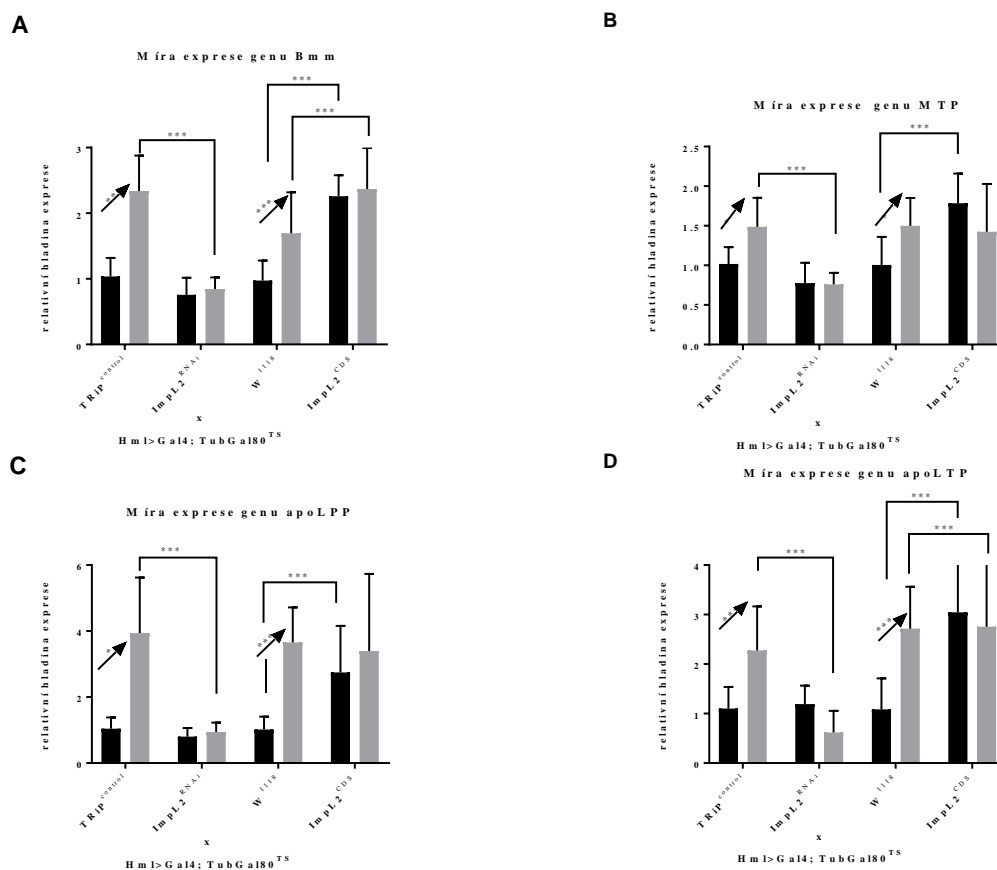
Obrázek 3: Relativní hladina exprese genu *ImpL2* po streptokokové infekci v srovnání s neinfikovanými jedinci a s experimentálně regulovanou expresí tohoto genu s jeho specifickou kontrolou. V grafech jsou zaznamenány údaje ze tří nezávislých experimentů. Sloupce znázorňují směrodatnou odchylku. Šipky indikují statisticky významný rozdíl. Míra exprese byla vztažena k expresi ribozomálního proteinu Rp49, jako housekeeping genu. K určení hladiny významnosti byl použit Two-way ANOVA test, Tukey's multiple comparisons test a následně Sidak's multiple comparison correction test. Hladina statistické významnosti je zobrazena dle následujícího klíče: *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$.

4.2. Role genu *Impl2* v regulaci exprese genů lipoproteinového metabolismu v tukovém tělese po bakteriální infekci

Předpokládanou rolí genu *Impl2* po infekci je mobilizace energeticky bohatých sloučenin z centrálního metabolického orgánu, tukového tělesa. Zatímco působením *Impl2* na mobilizaci karbohydrátů se zabývají moji kolegové ve výzkumném týmu, mým cílem je ověřit vliv *Impl2* na mobilizaci lipoproteinů. Z tohoto důvodu jsem kvantifikovala expresní úroveň genů, které se podílejí na syntéze a produkci lipoproteinů u *D. melanogaster*. Mezi tyto geny patří lipáza *Bmm* (*Brummer*) a lipoproteiny *MTP* (*Microsomal triglycerol transfer protein*), *apoLTP* (*apolipoprotein lipid transfer particle*) a *apoLPP* (*apolipophorin*).

Z výsledků qPCR, provedených na vzorcích získaných pitvou tukových těles experimentálních jedinců jsme zjistili, že přirozenou odpovědí těchto genů na bakteriální infekci je nárůst jejich exprese (Obr. 4). Z toho lze soudit, že syntéza lipoproteinů v tukovém tělese je jedním z mechanismů mobilizace energeticky hodnotných látek během imunitní odpovědi. Z hlediska této práce je obzvlášť zajímavé, že exprese všech měřených genů vykazuje charakteristickou odpověď, která přesně reflektuje předpokládanou aktivitu signálního faktoru IMPL2 (Obr. 4). Vzhledem k tomu, že gen *Impl2* je známý svou schopností systemicky inhibovat inzulinovou signalizaci, lze předpokládat, že k aktivaci genů lipoproteinové produkce dochází skrze indukci inzulinové resistance adipocytů. Nicméně odhalení tohoto mechanismu nebylo v rámci této práce zkoumáno.

Na základě zjištěných výsledků můžeme tvrdit, že makrofágy regulují skrze faktor *Impl2* během bakteriální infekce expresi genů zodpovědných za syntézu lipoproteinů v tukovém tělese (Obr. 4). Proto nás nadále zajímalo, do jaké míry se mění skutečná koncentrace lipoproteinů v cirkulaci. To je možné nejjednodušeji stanovit pomocí měření cholesterolu a cholesterol-esteru, které jsou jejich nedílnou součástí a nevyskytují se v cirkulaci v jiné formě.



Obrázek 4: Relativní hladiny exprese genů *Bmm*(A), *MTP* (B), *apoLPP* (C), *apoLTP*(D) v tukovém tělese po bakteriální infekci (šedý sloupec) ve srovnání s neinfikovanými jedinci (černý sloupec) a s experimentálně regulovanou expresí tohoto genu a s jeho příslušnou kontrolou. Bylo použito 50 000 izolovaných makrofágů z 250 dospělých samců much. Sloupce znázorňují směrodatnou odchylku. Šipky popisují statisticky signifikantní rozdíl. Míra exprese byla vztažena k expresi ribozomálního proteinu Rp49, jako housekeeping genu. K určení hladiny významnosti byl použit Two-way ANOVA test, Tukey's multiple comparisons test a následně Sidak's multiple comparison correction test. Hladina statistické významnosti je zobrazena dle následujícího klíče: *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$.

4.3. Role genu *Impl2* v mobilizaci lipoproteinů během streptokokové infekce a jejich akumulace v aktivovaných imunitních buňkách

Předchozí výsledky ukazují, že *Impl2* ovlivňuje expresi genů zodpovědných za syntézu lipoproteinů v tukovém tělese. Nicméně pouhá změna exprese ještě

nemusí znamenat skutečné metabolické změny. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli měřit také hladinu cholesterolu a cholesterol-esteru v cirkulaci, neboť tyto metabolity přímo odráží i hladinu lipoproteinů, jichž jsou nedílnou součástí.

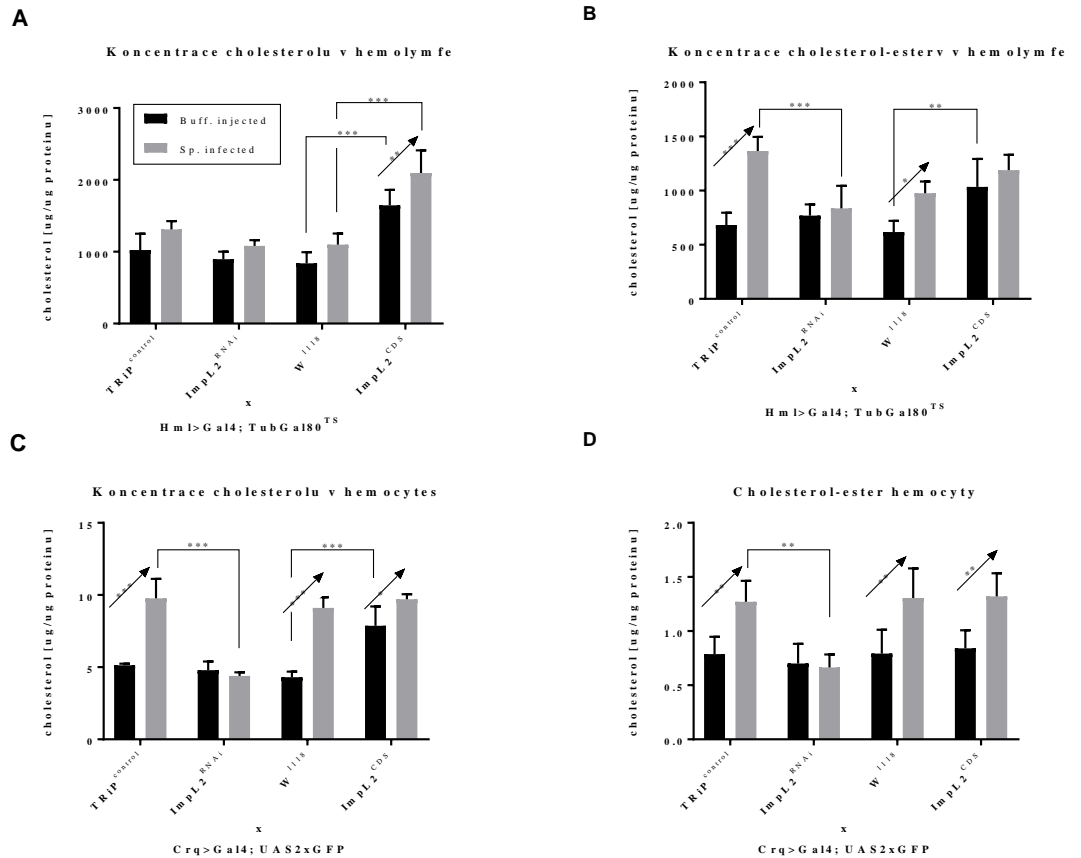
Jako reakci na bakteriální infekci můžeme pozorovat signifikantní nárůst cholesterol-esteru, doprovázený mírným, avšak statisticky nesignifikantním zvýšením hladiny cholesterolu v cirkulaci (Obr. 5A,B). Nárůstu hladiny cholesterol-esteru, indukovaného infekcí, lze efektivně zabránit makrofágově specifickým umlčením genu *Impl2*. Z toho vyplývá, že signální faktor IMPL2 se přímo podílí na infekcí indukovaném nárůstu tohoto metabolitu. Pozoruhodná je odpověď cholesterolu a cholesterol-esteru na overexpresi signalizačního faktoru IMPL2. V reakci na tento zásah můžeme sledovat signifikantní nárůst cholesterolu a cholesterol-esteru v hemolymfě (Obr. 5A,B). To ukazuje na schopnost této signální molekuly indukovat mobilizaci lipoproteinů nezávisle na probíhající infekci. Na základě tohoto zkoumání se domníváme, že IMPL2 je jeden z klíčových faktorů v mobilizaci lipoproteinů u *D. melanogaster*. Tato pozorování jsou navíc v souladu s předchozími expresními daty (Obr. 4). Jisté rozdíly mezi cholesterolem a cholesterol-esterem lze připsat různému poměru těchto látek v různých transportních třídách lipoproteinů a jejich vzájemnou přeměnou.

Abychom lépe porozuměli, do jaké míry může mít pozorované navýšení cirkulujících lipoproteinů vliv na příjem a akumulaci těchto energeticky hodnotných látek v makrofázích, rozhodli jsme se ke kvantifikaci těchto metabolitů ve frakci vysortovaných imunitních buněk. Cholesterol i cholesterol-ester vykazuje značnou míru akumulace v aktivovaných imunitních buňkách v odpovědi na bakteriální infekci (Obr. 5C,D). Samotná bakteriální infekce vede k mobilizaci lipoproteinů z tukového tělesa a jejich absorpci a hromadění aktivovanými buňkami. Tento efekt je navíc potlačen v případě makrofágově specifického umlčení genu *Impl2*. Lze tedy tvrdit, že produkce faktoru IMPL2 při odpovědi na tuto infekci, vede k zajištění dodávek lipoproteinů imunitním systémem. Autonomní role faktoru IMPL2 v tomto procesu je dále dokumentována nárůstem hromadění cholesterolu v těchto buňkách u jedinců nesoucích aktivovaný konstrukt pro overexpresi genu *Impl2* (Obr. 5C). Významným zjištěním je rozdíl v akumulaci

cholesterolu a cholesterol-esteru u těchto jedinců (Obr. 5C,D). Z našich dat lze usoudit, že samotná overexprese bez bakteriální infekce vede k akumulaci cholesterolu v makrofázích, zatímco overexprese během infekce vykazuje akumulaci obou metabolitů doprovázejících lipoproteiny (Obr. 5C,D). Ty nejsou samozřejmě jediným zdrojem cholesterolu a cholesterol-esteru pro imunitní buňky. V tomto případě naše data slouží pouze jako podpůrná pozorování.

Z paralelně prováděných experimentů v naší laboratoři, jež nejsou součástí této bakalářské práce, vyplývá, že makrofágy ochotně přijímají lipoproteiny v určitém množství, které je jim nabídnuté. Dokážou tak přijmout i řádově větší množství, než naměřené fyziologické hladiny (přejato od Bajgar a Krejčová, nepublikovaná data). Absorpce lipoproteinů v imunitních buňkách navíc signifikantně převyšuje jejich akumulaci v jakékoli jiné tkáni v těle dospělých infikovaných jedinců (nepublikovaná data jsou zde ilustrována konfokálním snímkem, který zobrazuje makrofága obsahujícího velké množství lipidů: Crq>GFP, Oil Red O pro barvení neutrálních lipidů (Obr. 6).

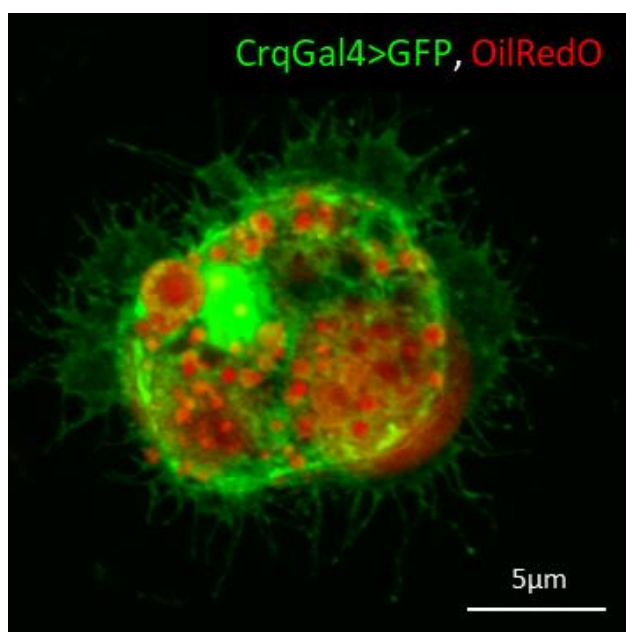
Tato data naznačují, že *ImpL2* je zodpovědný za nárůst lipoproteinů v cirkulaci během bakteriální infekce, a tak i za jejich dostupnost pro aktivovaný imunitní systém.



Obrázek 5: Koncentrace cholesterolu a cholesterol-esteru v hemolymfě (A, B) a hemocytech (C, D). V grafech jsou uvedeny kontrolní linie injikované puřem (černý sloupec) ve srovnání s infikovanými jedinci streptokokovou infekcí (šedý sloupec). Pro každý metabolit byla stanovena jeho koncentrace v jednotce μg v experimentálních podmínkách pro genotypy s umlčenou expresí signálního faktoru *ImpL2* (*ImpL2*^{RNAi}), jeho overxpresí (*ImpL2*^{CDS}) a odpovídající kontrolní genotypy (TRIP^{control} a w¹¹⁸). Bylo průměrně použito 25 jedinců pro hemolymfu a 50 000 makrofágů. Sloupce znázorňují směrodatnou odchylku. Šipky popisují statisticky signifikantní rozdíl. Míra exprese byla vztažena k expresi ribozomálního proteinu Rp49, jako housekeeping genu. Sloupce znázorňují průměr se směrodatnou odchylkou. K posouzení signifikance byl aplikován použit Two-way ANOVA test, Tukey's multiple comparisons test a následně Sidak's multiple comparison correction test. Hladina statistické významnosti je zobrazena dle následujícího klíče: *= p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001.

4.4. Akumulace lipidů v makrofázích

Abychom zjistili, zda makrofágy přijímají lipidy z hemolymfy během bakteriální infekce, byly tyto buňky podrobeny analýze na konfokálním mikroskopu. K vizualizaci lipidů v makrofázích s genetickým konstruktem CrqGal4>GFP bylo použito barvivo Oil Red O, zviditelňující neutrální lipidy. Tato analýza odhalila, že aktivované makrofágy vykazují velmi výraznou schopnost akumulace lipidů (Obr. 6).



Obrázek 6: Konfokální mikroskopický snímek ukazující akumulaci lipidů aktivovaným makrofágem. Neutrální lipidy jsou značené červeně pomocí Oil Red O v makrofágu s genetickým konstruktem CrqGal4>GFP (zobrazen zelenou barvou) u *Drosophila melanogaster*.

Na základě předložených dat lze tvrdit, že *ImpL2* produkovaný makrofágy, indukuje na dálku expresi genů zodpovědných za syntézu lipoproteinů v tukovém tělese. To vede ke zvýšené hladině cirkulujícího cholesterolu a cholesterol-esteru v hemolymfě a jejich následné akumulaci v makrofázích během streptokokové infekce (Obr. 5). Nicméně jsme si vědomi, že tato data jsou především indiciemi, které naznačují roli genu *ImpL2* v této úloze. Přesto představují velmi důležitou součást většího projektu, který se zabývá úlohou tohoto signálního faktoru.

5. Diskuze

V této práci bylo prokázáno, že makrofágy produkovaný signální faktor IMPL2 je zodpovědný za nárůst transkripce genů zapojených do produkce lipoproteinů (Obr. 4). S tím je spojeno i následné zvýšení hladiny cholesterolu a cholesterol-esteru v hemolymfě a jejich akumulace v aktivovaných imunitních buňkách (Obr. 5). Práce je součástí rozsáhlejší studie zabývající se rolí genu *ImpL2*, jakožto potenciálního faktoru zajišťujícího dostatek živin pro aktivovaný imunitní systém.

K účinné imunitní odpovědi je potřeba velké množství energie (Almajwal et al., 2019). Aktivace makrofágů je spojena se změnou jejich buněčného metabolismu směrem k aerobní glykolýze. Důsledkem této změny aktivovaných imunitních buněk dochází k jejich zvýšeným energetickým a nutričním nárokům (Kedia-Mehta and Finlay, 2019). Zejména dostatečný přísun lipidů, jako jsou triglyceridy, cholesterol a fosfolipidy, je klíčový pro adekvátní imunitní odpověď (Nordestgaard et al., 2010). Aby makrofágy získaly dostatečné množství těchto živin, produkují signální molekuly schopné ovlivňovat systemický metabolismus (Straub, 2014). Jedna z těchto signálních molekul odčerpávající energii ze zbytku organismu je extracelulární adenosin (Bajgar et al., 2015; Bajgar and Doležal, 2018). Adenosin je uvolňován z poškozených tkání nebo z tkání které trpí nedostatkem adenosintrifosfát (ATP) (Buck, 2004; Newby, 1984). Jeho signalizační rolí v průběhu imunitní odpovědi se zabývali Bajgar & Doležal (2018), kteří ve své studii ukazují, že u dospělých infikovaných jedinců rodu *Drosophila melanogaster* mění extracelulární adenosin systemický metabolismus sacharidů. Následně po infekci, adenosin vyvolává hyperglykémii vedoucí k vyčerpání zásob glykogenu v tukové tkáni (Bajgar & Doležal, 2018). Lze předpokládat, že kromě adenosinu, existuje celá řada obdobných signálních molekul. Měly by mít potenciál šířit se cirkulací a ovlivňovat nejen systemický metabolismus, ale i metabolismus centrálních metabolických orgánů. Tyto molekuly by také měly být produkovány aktivovanými imunitními buňkami (Bajgar, Krejčová, and Doležal, 2021)

Dalším potenciálním signálním faktorem, objeveným původně v rakovinných buňkách, je *Imaginal morphogenesis protein-Late 2 (ImpL2)*.

Je známo, že rakovinné i aktivované imunitní buňky sdílí společné znaky buněčného metabolismu, jelikož oba typy buněk využívají aerobní glykolýzu, aktivovanou transkripčním faktorem *Hypoxia inducible factor 1 α* (*Hif1 α*) (Biswas and Mantovani, 2012; Nagao et al., 2019). Podobnost můžeme nalézt v jejich vlivu na systemický metabolismus, protože neoplastické nádory způsobující kachexii, mohou konzumovat více energeticky bohatých látek. Existence kachektických faktorů, jako molekul působících čistě patologické efekty, je nicméně evolučně těžko odůvodnitelná (Alejandra Figueroa-Claivega and David Bilder, 2016). Proto se domníváme, že aktivované imunitní buňky mohou produkovat během bakteriální infekce stejné faktory jako rakovinné buňky, ale s adaptivním účinkem v průběhu akutní fáze bakteriální infekce. Z tohoto důvodu byly další výzkumy naší experimentální skupiny zaměřeny na úlohu této molekuly v imunitních buňkách během infekce. *IMPL2* je známý svou vazbou na inzulínové peptidy u *D. melanogaster* (*Dilp2* a *Dilp5*). Touto vazbou zajistí inzulínovou rezistenci v tkáních, do kterých se následně nemohou dostávat živiny jako zdroj energie (Honegger et al., 2008). Kromě rakoviny, je *ImpL2* též produkován tkáněmi vystavenými hypoxickým podmínkám a také buňkami s experimentálně indukovanou mitochondriální dysfunkcí (Li et al., 2013; Kwon et al., 2015). Lze předpokládat, že produkce tohoto faktoru je spojena s metabolismem aerobní glykolýzy, jako s programem produkce NADPH a ATP nezávisle na mitochondriální oxidativní fosforylaci. Tento proces byl experimentálně dokázán u makrofágů *Drosophila melanogaster*. Makrofágy podstupují změnu svého buněčného metabolismu, čímž získávají baktericidní funkci. Zvýšená exprese genu *ImpL2* v aktivovaných makrofázích byla potvrzena kolegy z naší laboratoře (Krejčová et al., 2019). Předpokládáme, že se exprese *ImpL2* při infekci zvyšuje díky účinku *Hif1 α* (Gabriela et al., 2020).

Během imunitní odpovědi dochází k systemickým metabolickým změnám. Ty jsou potřebné k rezistenci vůči bakteriální infekci. Podstatou většiny metabolických změn je přechod od anabolických procesů k procesům katabolickým. Následně dojde k uvolnění energeticky bohatých látek a k jejich spotřebě imunitními buňkami a orgány nutnými pro přežití (Straub 2014). *IMPL2* by tedy mohl fungovat jako faktor propojující změny buněčného metabolismu imunitních buněk se změnami v systemickém

metabolismu. Mohl by tak být schopen indukce změny nutričních nároků na centrální metabolický orgán, který uvolní potřebné živiny do cirkulace (Obr. 5 A, B).

Lipoproteiny jsou ideální makromolekulární sloučeniny pro transport lipidů. Jelikož lipidy nelze transportovat ve vodném prostředí, musí být přemístovány nejen v hemolymfě, ale i k periferiím tkáně v podobě lipoproteinů, obsahujících cholesterol, cholesterol-ester, triglyceridy a fosfolipidy. Jedná se o energeticky bohaté látky potřebné pro každý organismus. Všechny složky lipoproteinů jsou součástí aktivní fagocytózy a destrukce patogenních bakterií (Nordestgaard et al., 2010). Naše výsledná data vykazují produkci lipoproteinů, které jsou skutečně pod kontrolou původně kachektického faktoru *Impl2* (Obr 4). Následující výzkumy by mohly v budoucnu objasnit mechanismus, kterým by mohl IMPL2 ovlivňovat expresi genů zapojených v produkci lipoproteinů.

IMPL2 se ukázal také jako faktor s potenciálem vyvolávat inzulinovou rezistenci organismu (Alejandra Figueroa-Clarevega and David Bilder, 2016). To souvisí s pozorováními, že geny produkující lipoproteiny jsou u *D. melanogaster* pod kontrolou transkripčního faktoru FOXO (Puigserver et al., 2003; Woodcock et al., 2015). Jaderná translokace FOXO, spojená s následnou produkcí lipoproteinů, je podmíněna sníženou aktivitou inzulinové signalizace v tukových buňkách a s tím spojenou sníženou aktivitou efektorové kinázy (AKT). FOXO se tak podílí na lipogenezi, produkci lipoproteinů a jejich následného uvolňování do cirkulace (Puigserver et al., 2003; S. Lee and Dong, 2017; Woodcock et al., 2015). Nicméně zapojení signální molekuly *Impl2* v této metabolické adaptaci, která indukuje mobilizaci lipoproteinů během infekce, nebylo dosud dostatečně potvrzeno.

Inzulinová rezistence indukovaná cytokiny je základem řady lidských onemocnění spojených s obezitou. Makrofágy jsou v průběhu obezity vystaveny nadměrnému množství lipidů, což vede k jejich metabolické polarizaci a přijetí pro-zánětlivého fenotypu M1 (Makki, Froguel, and Wolowczuk, 2013) Jedním z těchto cytokinů je savčí homolog IMPL2 (IGFBP7), který má podobné vlastnosti jako signální molekula IMPL2. IGFBP7 je produkován tkáňovými makrofágy zvanými Kupfferovy buňky, které se nacházejí v játrech. Tento metabolický orgán koordinuje systemické

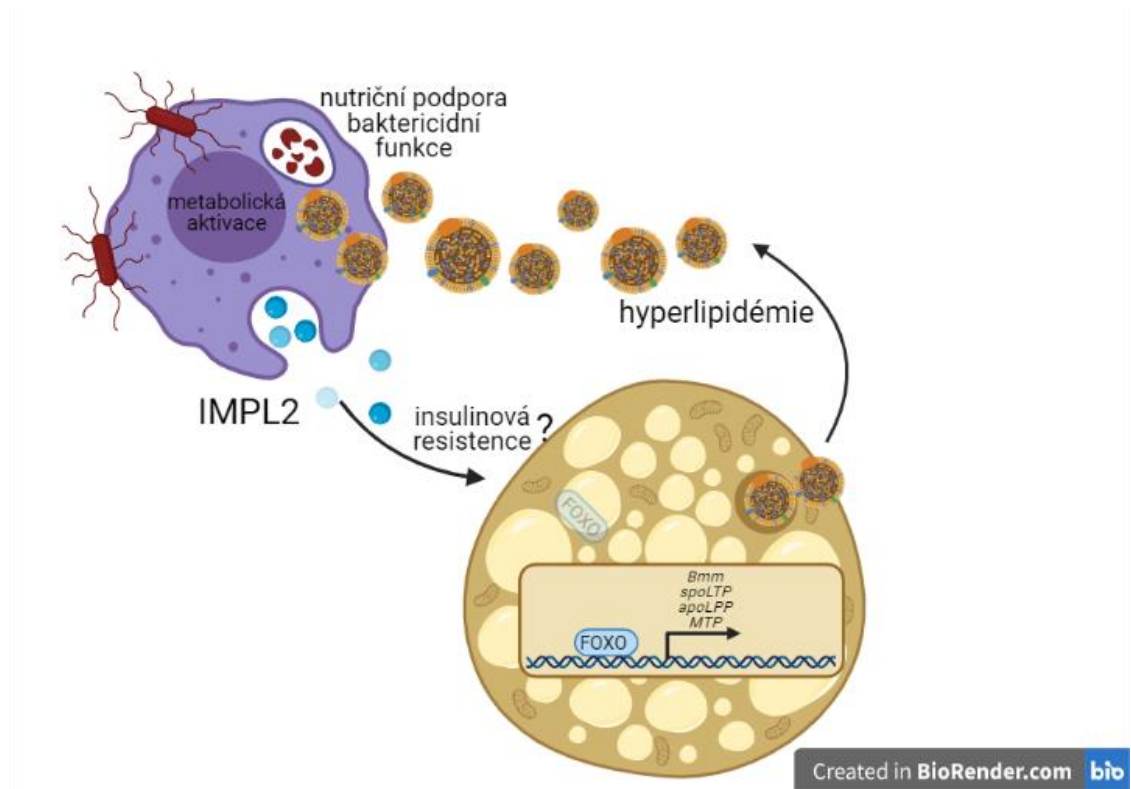
metabolické změny po infekci (Morgantiny et al. 2019). Následkem akumulace lipidů v jaterních makrofázích dochází k jejich polarizaci a produkci cytokinů, které vyvolávají inzulinovou rezistenci. Inzulinová rezistence v centrálních metabolických orgánech (tukové těleso a játra) vede k indukci systemické hyperlipidemie, ateroskleróze, rozvoji metabolického syndromu a diabetu druhého typu (Remmerie and Scott, 2018; Morgantini et al. 2019). Budoucí výzkumy zabývající se adaptivní rolí cytokinů, které hrají úlohu v indukci inzulinové rezistence a regulaci lipidového metabolismu, mohou přispět k porozumění těmto velmi hojně se vyskytujícím onemocněním.

6. Závěr

Z předchozích výsledků vyplývá, že uvolňovaný cytokin IMPL2 z aktivovaných makrofágů během bakteriální infekce, má schopnost na dálku regulovat expresi metabolických genů v tukovém tělese. V této práci jsme se zaměřili na geny, které jsou zodpovědné za mobilizaci lipoproteinů do hemolymfy. Aktivované makrofágy tak nepřímou skrze tento signální faktor indikují hyperlipidémii. Nárůst lipoproteinů v cirkulaci následně vede k jejich příjmu aktivovanými imunitními buňkami, kde slouží pravděpodobně k efektivnímu boji s patogenem.

Protože je IMPL2 znám svou schopností blokovat inzulinovou signalizaci, inzulinová rezistence se zdá být možným mechanismem pro zvýšení mobilizace těchto látek. Nicméně tento funkční vztah je potřeba ještě experimentálně ověřit. Tato práce je součástí většího projektu charakterizujícího komplexnější roli genu *ImpL2* v bakteriální infekci. Navazující experimenty ukazují, že produkce genu *ImpL2* je vázána na aktivitu transkripčního faktoru *Hif1 α* , který je zodpovědný za metabolickou aktivaci a za využívání aerobní glykolýzy makrofágy. Propojení makrofágy produkovaného genu *ImpL2* a mobilizace lipidů je obzvlášť zajímavé, pokud zvážíme paralelu se savčími modely. U myši je savčí homolog genu *ImpL2* (IGFBP7) produkován metabolicky aktivovanými jaterními makrofágy. IGFBP7 má potenciál indukovat inzulinovou rezistenci v hepatocytech a tím zvyšovat mobilizaci lipoproteinů. Nicméně tento vztah byl doposud ukázán

pouze v patologickém kontextu obezity. Náš výzkum může pomoci k pochopení funkce signálního faktoru IMPL2 při mobilizaci lipoproteinů z centrálního metabolického orgánu, aby byly k dispozici pro aktivovaný imunitní systém (Obr. 7). Pro potvrzení těchto hypotéz je ovšem nutné provést ještě experimentální ověření těchto vztahů.



Obrázek 7: Schematický model působení faktoru IMPL2 na mobilizaci energeticky bohatých látek během bakteriální infekce. Streptokoková infekce vede ke stabilizaci transkripčního faktoru *Hif1 α* . Tento transkripční faktor je zodpovědný nejen za metabolickou aktivaci makrofágů, která je činí energeticky a nutričně náročnými, ale i za indukci exprese signálního faktoru IMPL2. IMPL2 pravděpodobně aktivuje skrze indukci systemické inzulinové rezistence expresi genů, jež jsou pod kontrolou transkripčního faktoru FOXO v tukovém tělese. Následkem tohoto mechanismu dojde ke zvýšení hladiny lipoproteinů v hemolymfě a uspokojení nutričních požadavků aktivovaného imunitního systému.

7. Literatura

- Aderem, Alan. 2003. "Phagocytosis and the Inflammatory Response." In *Journal of Infectious Diseases*. Vol. 187. <https://doi.org/10.1086/374747>.
- Albina, Jorge E., Balduino Mastrofrancesco, Joseph A. Vessella, Claudine A. Louis, William L. Henry, and Jonathan S. Reichner. 2001. "HIF-1 Expression in Healing Wounds: HIF-1 α Induction in Primary Inflammatory Cells by TNF- α ." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 281 (6 50-6): 1971–77. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.6.c1971>.
- Alejandra Figueroa-Clarevega and David Bilder. 2016. "Malignant Drosophila Tumors Interrupt Insulin Signaling to Induce Cachexia-like Wasting." *Physiology & Behavior* 176 (1): 139–48. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.03.001.Malignant>.
- Almajwal, Ali, Ifikhar Alam, Falak Zeb, and Sadia Fatima. 2019. "Energy Metabolism and Allocation in Selfish Immune System and Brain: A Beneficial Role of Insulin Resistance in Aging." *Food and Nutrition Sciences* 10 (01). <https://doi.org/10.4236/fns.2019.101006>.
- Bailey, Peter S.J., and James A. Nathan. 2018. "Metabolic Regulation of Hypoxia-Inducible Transcription Factors: The Role of Small Molecule Metabolites and Iron." *Biomedicines*. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6020060>.
- Bajgar, Adam, and Tomas Dolezal. 2018. "Extracellular Adenosine Modulates Host-Pathogen Interactions through Regulation of Systemic Metabolism during Immune Response in Drosophila." *PLoS Pathogens* 14 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007022>.
- Bajgar, Adam, Gabriela Krejčová, and Tomáš Doležal. 2021. "Polarization of Macrophages in Insects: Opening Gates for Immuno-Metabolic Research." *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.629238>.
- Bajgar, Adam, Katerina Kucerova, Lucie Jonatova, Ales Tomcala, Ivana Schneedorferova, Jan Okrouhlik, and Tomas Dolezal. 2015. "Extracellular Adenosine Mediates a Systemic Metabolic Switch during Immune Response." *PLoS Biology* 13 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002135>.
- Bhatt, Anish, and Anand Rohatgi. 2016. "HDL Cholesterol Efflux Capacity: Cardiovascular Risk Factor and Potential Therapeutic Target." *Current Atherosclerosis Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11883-015-0554-1>.
- Biswas, Subhra K., and Alberto Mantovani. 2012. "Orchestration of Metabolism by Macrophages." *Cell Metabolism*. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.11.013>.
- Buck, Leslie Thomas. 2004. "Adenosine as a Signal for Ion Channel Arrest in

- Anoxia-Tolerant Organisms.” *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.04.002>.
- Chambers, Moria C., Karla L. Lightfield, and David S. Schneider. 2012. “How the Fly Balances Its Ability to Combat Different Pathogens.” *PLoS Pathogens* 8 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002970>.
- Chen, Siyuan, Jing Yang, Yuquan Wei, and Xiawei Wei. 2020. “Epigenetic Regulation of Macrophages: From Homeostasis Maintenance to Host Defense.” *Cellular and Molecular Immunology*.
<https://doi.org/10.1038/s41423-019-0315-0>.
- Chistiakov, Dimitry A., Alexandra A. Melnichenko, Veronika A. Myasoedova, Andrey V. Grechko, and Alexander N. Orekhov. 2017. “Mechanisms of Foam Cell Formation in Atherosclerosis.” *Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00109-017-1575-8>.
- Dahik, Veronica D., Eric Frisdal, and Wilfried Le Goff. 2020. “Rewiring of Lipid Metabolism in Adipose Tissue Macrophages in Obesity: Impact on Insulin Resistance and Type 2 Diabetes.” *International Journal of Molecular Sciences* 21 (15). <https://doi.org/10.3390/ijms21155505>.
- Davies, Luke C., and Philip R. Taylor. 2015. “Tissue-Resident Macrophages: Then and Now.” *Immunology* 144 (4).
<https://doi.org/10.1111/imm.12451>.
- Dengler, Veronica L., Matthew D. Galbraith, and Joaquín M. Espinosa. 2014. “Transcriptional Regulation by Hypoxia Inducible Factors.” *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*.
<https://doi.org/10.3109/10409238.2013.838205>.
- Epelman, Slava, Kory J. Lavine, and Gwendalyn J. Randolph. 2014. “Origin and Functions of Tissue Macrophages.” *Immunity*.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.06.013>.
- Franken, Lars, Marzena Schiwon, and Christian Kurts. 2016. “Macrophages: Sentinels and Regulators of the Immune System.” *Cellular Microbiology* 18 (4). <https://doi.org/10.1111/cmi.12580>.
- Gabriela, Krejčová, Bajgar Adam, Nedbalová Pavla, Kovářová Julie, Kamps Hughes Nick, Zemanová Helena, Strych Lukáš, and Doležal Tomáš. 2020. “Macrophage-Derived Insulin/IGF Antagonist ImpL2 Regulates Systemic Metabolism for Mounting an Effective Acute Immune Response in *Drosophila*.” *BioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2020.09.24.311670>.
- Galván-Peña, Silvia, and Luke A.J. O’Neill. 2014. “Metabolic Reprogramming in Macrophage Polarization.” *Frontiers in Immunology* 5 (AUG): 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00420>.
- Ganeshan, Kirthana, and Ajay Chawla. 2014. “Metabolic Regulation of Immune Responses.” *Annual Review of Immunology*.

- <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120236>.
- Garbe, J. C., E. Yang, and J. W. Fristrom. 1993. "IMP-L2: An Essential Secreted Immunoglobulin Family Member Implicated in Neural and Ectodermal Development in *Drosophila*." *Development* 119 (4).
- Gaudet, Daniel, Jean Philippe Drouin-Chartier, and Patrick Couture. 2017. "Lipid Metabolism and Emerging Targets for Lipid-Lowering Therapy." *Canadian Journal of Cardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.cjca.2016.12.019>.
- Ginhoux, Florent, Martin Williams, and Shalin H. Naik. 2016. "Dendritic Cell and Macrophage Nomenclature and Classification." *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00168>.
- Ginhoux, Florent, and Steffen Jung. 2014. "Monocytes and Macrophages: Developmental Pathways and Tissue Homeostasis." *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri3671>.
- Gordon, Siamon. 2016. "Phagocytosis: An Immunobiologic Process." *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.02.026>.
- Goswami, Sumanta, Erik Sahai, Jeffrey B. Wyckoff, Michael Cammer, Dianne Cox, Fiona J. Pixley, E. Richard Stanley, Jeffrey E. Segall, and John S. Condeelis. 2005. "Macrophages Promote the Invasion of Breast Carcinoma Cells via a Colony-Stimulating Factor-1/Epidermal Growth Factor Paracrine Loop." *Cancer Research* 65 (12). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1853>.
- Govind, Shubha. 2008. "Innate Immunity in *Drosophila*: Pathogens and Pathways." *Insect Science*. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00185.x>.
- Haldar, Malay, and Kenneth M. Murphy. 2014. "Origin, Development, and Homeostasis of Tissue-Resident Macrophages." *Immunological Reviews* 262 (1). <https://doi.org/10.1111/imr.12215>.
- Halpern, Marnie E., Jerry Rhee, Mary G. Goll, Courtney M. Akitake, Michael Parsons, and Steven D. Leach. 2008. "Gal4/UAS Transgenic Tools and Their Application to Zebrafish." *Zebrafish*. <https://doi.org/10.1089/zeb.2008.0530>.
- Heigwer, Florian, Phillip Port, and Michael Boutros. 2018. "Rna Interference (RNAi) Screening in *Drosophila*." *Genetics* 208 (3). <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300077>.
- Honegger, Basil, Milos Galic, Katja Köhler, Franz Wittwer, Walter Brogiolo, Ernst Hafen, and Hugo Stocker. 2008. "Imp-L2, a Putative Homolog of Vertebrate IGF-Binding Protein 7, Counteracts Insulin Signaling in *Drosophila* and Is Essential for Starvation Resistance." *Journal of Biology* 7 (3). <https://doi.org/10.1186/jbiol72>.
- Huang, Stanley Ching Cheng, Bart Everts, Yulia Ivanova, David O'Sullivan, Marcia Nascimento, Amber M. Smith, Wandy Beatty, et al. 2014. "Cell-

- Intrinsic Lysosomal Lipolysis Is Essential for Alternative Activation of Macrophages.” *Nature Immunology* 15 (9). <https://doi.org/10.1038/ni.2956>.
- Ivan, M, W G Kaelin, K Kondo, H F Yang, W Kim, J Valiando, M Ohh, A Salic, J M Asara, and W S Lane. 2001. “HIF Alpha Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O-2 Sensing.” *Science* 292 (5516).
- Jackson, Sharon H., John I. Gallin, and Steven M. Holland. 1995. “The P47phox Mouse Knock-out Model of Chronic Granulomatous Disease.” *Journal of Experimental Medicine* 182 (3). <https://doi.org/10.1084/jem.182.3.751>.
- Jin Chan, Shu, and Donald F. Steiner. 2000. “Insulin Through the Ages: Phylogeny of a Growth Promoting and Metabolic Regulatory Hormone.” *American Zoologist* 40 (2). <https://doi.org/10.1093/icb/40.2.213>.
- Jung, Yun Jin, Jennifer S. Isaacs, Sunmin Lee, Jane Trepel, Zheng Gang Liu, and Len Neckers. 2003. “Hypoxia-Inducible Factor Induction by Tumour Necrosis Factor in Normoxic Cells Requires Receptor-Interacting Protein-Dependent Nuclear Factor KB Activation.” *Biochemical Journal* 370 (3). <https://doi.org/10.1042/BJ20021279>.
- Kacsóh, Balint Z., and Todd A. Schlenke. 2012. “High Hemocyte Load Is Associated with Increased Resistance against Parasitoids in *Drosophila Suzukii*, a Relative of *D. Melanogaster*.” *PLoS ONE* 7 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034721>.
- Kasmi, Karim C. EL, and Kurt R. Stenmark. 2015. “Contribution of Metabolic Reprogramming to Macrophage Plasticity and Function.” *Seminars in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2015.09.001>.
- Kedia-Mehta, Nidhi, and David K. Finlay. 2019. “Competition for Nutrients and Its Role in Controlling Immune Responses.” *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10015-4>.
- Khovidhunkit, Weerapan, Min-Sun Kim, Riaz A. Memon, Judy K. Shigenaga, Arthur H. Moser, Kenneth R. Feingold, and Carl Grunfeld. 2004. “Thematic Review Series: The Pathogenesis of Atherosclerosis. Effects of Infection and Inflammation on Lipid and Lipoprotein Metabolism Mechanisms and Consequences to the Host.” *Journal of Lipid Research* 45 (7). <https://doi.org/10.1194/jlr.r300019-jlr200>.
- Koltai, Tomas. 2020. “Cancer Cachexia Has Many Symptoms but Only One Cause: Anoxia.” *F1000Research* 9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.22624.1>.
- Krejčová, Gabriela, Adéla Danielová, Pavla Nedbalová, Michalina Kazek, Lukáš Strych, Geetanjali Chawla, Jason M. Tennessen, et al. 2019. “*Drosophila* Macrophages Switch to Aerobic Glycolysis to Mount Effective Antibacterial Defense.” *ELife* 8.

- <https://doi.org/10.7554/eLife.50414>.
- Kwon, Young, Wei Song, Iliia A. Droujinine, Yanhui Hu, John M. Asara, and Norbert Perrimon. 2015. "Systemic Organ Wasting Induced by Localized Expression of the Secreted Insulin/IGF Antagonist ImpL2." *Developmental Cell* 33 (1): 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.02.012>.
- Langston, P. Kent, Munehiko Shibata, and Tiffany Horng. 2017. "Metabolism Supports Macrophage Activation." *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00061>.
- Lee, Kun Yeong. 2019. "M1 and M2 Polarization of Macrophages: A Mini-Review." *Medical Biological Science and Engineering* 2 (1). <https://doi.org/10.30579/mbse.2019.2.1.1>.
- Lee, Sojin, and H. Henry Dong. 2017. "FoxO Integration of Insulin Signaling with Glucose and Lipid Metabolism." *Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0002>.
- Lemaitre, Bruno, and Jules Hoffmann. 2007. "The Host Defense of *Drosophila Melanogaster*." *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>.
- Leopold, Pierre, and Norbert Perrimon. 2007. "Drosophila and the Genetics of the Internal Milieu." *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature06286>.
- Li, Yan, Divya Padmanabha, Luciana B. Gentile, Catherine I. Dumur, Robert B. Beckstead, and Keith D. Baker. 2013. "HIF- and Non-HIF-Regulated Hypoxic Responses Require the Estrogen-Related Receptor in *Drosophila Melanogaster*." *PLoS Genetics* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003230>.
- Liu, Yang, Ruyi Xu, Huiyao Gu, Enfan Zhang, Jianwei Qu, Wen Cao, Xi Huang, Haimeng Yan, Jingsong He, and Zhen Cai. 2021. "Metabolic Reprogramming in Macrophage Responses." *Biomarker Research*. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00251-y>.
- Makki, Kassem, Philippe Froguel, and Isabelle Wolowczuk. 2013. "Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines." *ISRN Inflammation* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/139239>.
- Martinez, Fernando O., and Siamon Gordon. 2014. "The M1 and M2 Paradigm of Macrophage Activation: Time for Reassessment." *F1000Prime Reports* 6. <https://doi.org/10.12703/P6-13>.
- Mills, Charles D., Kristi Kincaid, Jennifer M. Alt, Michelle J. Heilman, and Annette M. Hill. 2000. "M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm." *The Journal of Immunology* 164 (12). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.12.6166>.
- Mills, Charles D., Laurel L. Lenz, and Klaus Ley. 2015. "Macrophages at the Fork in the Road to Health or Disease." *Frontiers in Immunology*.

- <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00059>.
- Moore, Kathryn J., Frederick J. Sheedy, and Edward A. Fisher. 2013. "Macrophages in Atherosclerosis: A Dynamic Balance." *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri3520>.
- Morgantini, Cecilia, Jennifer Jager, Xidan Li, Laura Levi, Valerio Azzimato, André Sulen, Emelie Barreby, et al. 2019. "Liver Macrophages Regulate Systemic Metabolism through Non-Inflammatory Factors." *Nature Metabolism* 1 (4): 445–59. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0044-9>.
- Mosser, David M., and Justin P. Edwards. 2008. "Exploring the Full Spectrum of Macrophage Activation." *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2448>.
- Mylonis, Ilias, Hiroshi Sembongi, Christina Befani, Panagiotis Liakos, Symeon Siniouoglou, and George Simos. 2012. "Hypoxia Causes Triglyceride Accumulation by HIF-1-Mediated Stimulation of Lipin 1 Expression." *Journal of Cell Science* 125 (14). <https://doi.org/10.1242/jcs.106682>.
- Mylonis, Ilias, George Simos, and Efrosyni Paraskeva. 2019. "Hypoxia-Inducible Factors and the Regulation of Lipid Metabolism." *Cells* 8 (3). <https://doi.org/10.3390/cells8030214>.
- Nagao, Ayako, Minoru Kobayashi, Sho Koyasu, Christalle C.T. Chow, and Hiroshi Harada. 2019. "HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance." *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20020238>.
- Nagy, Csörsz, and Arvand Haschemi. 2015. "Time and Demand Are Two Critical Dimensions of Immunometabolism: The Process of Macrophage Activation and the Pentose Phosphate Pathway." *Frontiers in Immunology* 6 (APR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00164>.
- Natali, Andrea, Riccardo Bonadonna, Donatella Santoro, Alfredo Quiñones Galvan, Simona Baldi, Silvia Frascerra, Carlo Palombo, Sergio Ghione, and Eleuterio Ferrannini. 1994. "Insulin Resistance and Vasodilation in Essential Hypertension: Studies with Adenosine." *Journal of Clinical Investigation* 94 (4): 1570–76. <https://doi.org/10.1172/JCI117498>.
- Newby, Andrew C. 1984. "Adenosine and the Concept of 'Retaliatory Metabolites.'" *Trends in Biochemical Sciences*. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(84\)90176-2](https://doi.org/10.1016/0968-0004(84)90176-2).
- Newsholme, P., R. Curi, S. Gordon, and E. A. Newsholme. 1986. "Metabolism of Glucose, Glutamine, Long-Chain Fatty Acids and Ketone Bodies by Murine Macrophages." *Biochemical Journal* 239 (1). <https://doi.org/10.1042/bj2390121>.
- Nishiyama-Naruke, Anita, and Rui Curi. 2000. "Phosphatidylcholine Participates in the Interaction between Macrophages and Lymphocytes."

- American Journal of Physiology - Cell Physiology* 278 (3 47-3).
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.3.c554>.
- Nordestgaard, Børge G., M. John Chapman, Kausik Ray, Jan Borén, Felicita Andreotti, Gerald F. Watts, Henry Ginsberg, et al. 2010. “Lipoprotein(a) as a Cardiovascular Risk Factor: Current Status.” *European Heart Journal*. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehq386>.
- Obach, Mercè, Àurea Navarro-Sabaté, Jaime Caro, Xianguo Kong, Joan Duran, Marta Gómez, Jose Carlos Perales, Francesc Ventura, Jose Luis Rosa, and Ramon Bartrons. 2004. “6-Phosphofructo-2-Kinase (Pfkfb3) Gene Promoter Contains Hypoxia-Inducible Factor-1 Binding Sites Necessary for Transactivation in Response to Hypoxia.” *Journal of Biological Chemistry* 279 (51). <https://doi.org/10.1074/jbc.M406096200>.
- Odegaard, Justin I., and Ajay Chawla. 2013. “Pleiotropic Actions of Insulin Resistance and Inflammation in Metabolic Homeostasis.” *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.1230721>.
- Pearce, Erika L., and Edward J. Pearce. 2013. “Metabolic Pathways in Immune Cell Activation and Quiescence.” *Immunity*. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.005>.
- Pham, Linh N., Marc S. Dionne, Mimi Shirasu-Hiza, and David S. Schneider. 2007. “A Specific Primed Immune Response in *Drosophila* Is Dependent on Phagocytes.” *PLoS Pathogens* 3 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030026>.
- Pirillo, Angela, Alberico Luigi Catapano, and Giuseppe Danilo Norata. 2015. “HDL in Infectious Diseases and Sepsis.” In *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 224. https://doi.org/10.1007/978-3-319-09665-0_15.
- Prelich, Gregory. 2012. “Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation.” *Genetics*. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.136911>.
- Puigserver, Pere, James Rhee, Jerry Donovan, Christopher J. Walkey, J. Cliff Yoon, Francesco Oriente, Yukari Kitamura, et al. 2003. “Insulin-Regulated Hepatic Gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α Interaction.” *Nature* 423 (6939). <https://doi.org/10.1038/nature01667>.
- Remmerie, Anneleen, and Charlotte L. Scott. 2018. “Macrophages and Lipid Metabolism.” *Cellular Immunology* 330 (October 2017): 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2018.01.020>.
- Reyes-DelaTorre, Alejandro, Maria Teresa, and Juan Rafael. 2012. “Carbohydrate Metabolism in *Drosophila*: Reliance on the Disaccharide Trehalose.” In *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. <https://doi.org/10.5772/50633>.
- Riddle, Suzette R., Aftab Ahmad, Shama Ahmad, Samir S. Deeb, Mari Malkki, B. Kelly Schneider, Corrie B. Allen, and Carl W. White. 2000. “Hypoxia Induces Hexokinase II Gene Expression in Human Lung Cell Line A549.” *American Journal of Physiology - Lung Cellular and*

- Saha, Shilpi, Irina N. Shalova, and Subhra K. Biswas. 2017. "Metabolic Regulation of Macrophage Phenotype and Function." *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/imr.12603>.
- Sancho, David, Michel Enamorado, and Johan Garaude. 2017. "Innate Immune Function of Mitochondrial Metabolism." *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00527>.
- Schwartzburd, Polina M. 2017. "Catabolic and Anabolic Faces of Insulin Resistance and Their Disorders: A New Insight into Circadian Control of Metabolic Disorders Leading to Diabetes." *Future Science OA* 3 (3). <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0015>.
- Semenza, G. L., F. Agani, D. Feldser, N. Iyer, L. Kotch, E. Laughner, and A. Yu. 2000. "Hypoxia, HIF-1, and the Pathophysiology of Common Human Diseases." In *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Vol. 475. https://doi.org/10.1007/0-306-46825-5_12.
- Serbulea, Vlad, Clint M. Upchurch, Michael S. Schappe, Paxton Voigt, Dory E. DeWeese, Bimal N. Desai, Akshaya K. Meher, and Norbert Leitinger. 2018. "Macrophage Phenotype and Bioenergetics Are Controlled by Oxidized Phospholipids Identified in Lean and Obese Adipose Tissue." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (27). <https://doi.org/10.1073/pnas.1800544115>.
- Shen, Guomin, and Xiaobo Li. 2017. "The Multifaceted Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF1) in Lipid Metabolism." In *Hypoxia and Human Diseases*. <https://doi.org/10.5772/65340>.
- Shi, Jie, Jiangao Fan, Qing Su, and Zhen Yang. 2019. "Cytokines and Abnormal Glucose and Lipid Metabolism." *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00703>.
- Siegert, Isabel, Johannes Schödel, Manfred Nairz, Valentin Schatz, Katja Dettmer, Christopher Dick, Joanna Kalucka, et al. 2015. "Ferritin-Mediated Iron Sequestration Stabilizes Hypoxia-Inducible Factor-1 α upon LPS Activation in the Presence of Ample Oxygen." *Cell Reports* 13 (10). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.11.005>.
- Soehnlein, Oliver, and Lennart Lindbom. 2010. "Phagocyte Partnership during the Onset and Resolution of Inflammation." *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2779>.
- Soeters, Maarten R., and Peter B. Soeters. 2012. "The Evolutionary Benefit of Insulin Resistance." *Clinical Nutrition* 31 (6). <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2012.05.011>.
- Spann, Nathanael J., and Christopher K. Glass. 2013. "Sterols and Oxysterols in Immune Cell Function." *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/ni.2681>.

- Steele, J. E. 1982. "Glycogen Phosphorylase in Insects." *Insect Biochemistry*.
[https://doi.org/10.1016/0020-1790\(82\)90001-4](https://doi.org/10.1016/0020-1790(82)90001-4).
- Stein, M., and S. Keshav. 1992. "The Versatility of Macrophages." *Clinical and Experimental Allergy*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.1992.tb00110.x>.
- Straub, Rainer H. 2014. "Insulin Resistance, Selfish Brain, and Selfish Immune System: An Evolutionarily Positively Selected Program Used in Chronic Inflammatory Diseases." *Arthritis Research and Therapy*.
<https://doi.org/10.1186/ar4688>.
- Tabas, Ira, and Karin E. Bornfeldt. 2016. "Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis." *Circulation Research* 118 (4). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306256>.
- Tall, Alan R., and Laurent Yvan-Charvet. 2015. "Cholesterol, Inflammation and Innate Immunity." *Nature Reviews Immunology*.
<https://doi.org/10.1038/nri3793>.
- Thomas, A. P., and A. P. Halestrap. 1981. "The Role of Mitochondrial Pyruvate Transport in the Stimulation by Glucagon and Phenylephrine of Gluconeogenesis from L-Lactate in Isolated Rat Hepatocytes." *Biochemical Journal* 198 (3). <https://doi.org/10.1042/bj1980551>.
- Tonelli, Claudia, Iok In Christine Chio, and David A. Tuveson. 2018. "Transcriptional Regulation by Nrf2." *Antioxidants and Redox Signaling*.
<https://doi.org/10.1089/ars.2017.7342>.
- Torres, Licia, Vinicius Martins, Ana Faria, and Tatiani Maioli. 2018. "The Intriguing Relationship Between Obesity and Infection." *Journal of Infectiology* 1 (1). <https://doi.org/10.29245/2689-9981/2018/1.1104>.
- Troha, Katia, and Nicolas Buchon. 2019. "Methods for the Study of Innate Immunity in Drosophila Melanogaster." *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1002/wdev.344>.
- Viola, Antonella, Fabio Munari, Ricardo Sánchez-Rodríguez, Tommaso Sclaro, and Alessandra Castegna. 2019. "The Metabolic Signature of Macrophage Responses." *Frontiers in Immunology*.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462>.
- Wang, Ting, Huiying Liu, Guan Lian, Song Yang Zhang, Xian Wang, and Changtao Jiang. 2017. "HIF1 α -Induced Glycolysis Metabolism Is Essential to the Activation of Inflammatory Macrophages." *Mediators of Inflammation* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/9029327>.
- Wang, Youhan, Wanli Smith, Dingjun Hao, Baorong He, and Lingbo Kong. 2019. "M1 and M2 Macrophage Polarization and Potentially Therapeutic Naturally Occurring Compounds." *International Immunopharmacology*.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.02.050>.
- Weiss, Günter, and Ulrich E. Schaible. 2015. "Macrophage Defense Mechanisms against Intracellular Bacteria." *Immunological Reviews* 264

- (1). <https://doi.org/10.1111/imr.12266>.
- Wenger, Roland H., Daniel P. Stiehl, and Gieri Camenisch. 2005. "Integration of Oxygen Signaling at the Consensus HRE." *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*. <https://doi.org/10.1126/stke.3062005re12>.
- Wolowczuk, Isabelle, Claudie Verwaerde, Odile Viltart, Anne Delanoye, Myriam Delacre, Bruno Pot, and Corinne Grangette. 2008. "Feeding Our Immune System: Impact on Metabolism." *Clinical and Developmental Immunology*. <https://doi.org/10.1155/2008/639803>.
- Woodcock, Katie J., Katrin Kierdorf, Clara A. Pouchelon, Valérie Vivancos, Marc S. Dionne, and Frédéric Geissmann. 2015. "Macrophage-Derived Upd3 Cytokine Causes Impaired Glucose Homeostasis and Reduced Lifespan in Drosophila Fed a Lipid-Rich Diet." *Immunity* 42 (1). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.12.023>.
- Wynn, Thomas a., Ajay Chawla, and Jeffrey W. Pollard. 2013. "Origins and Hallmarks of Macrophages: Development, Homeostasis, and Disease." *Nature* 496 (7446).
- Xue, Jia, Susanne V. Schmidt, Jil Sander, Astrid Draffehn, Wolfgang Krebs, Inga Quester, Dominic DeNardo, et al. 2014. "Transcriptome-Based Network Analysis Reveals a Spectrum Model of Human Macrophage Activation." *Immunity* 40 (2). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.006>.
- Yegutkin, Gennady G. 2008. "Nucleotide- and Nucleoside-Converting Ectoenzymes: Important Modulators of Purinergic Signalling Cascade." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.01.024>.
- Yi, Liang, Qi Liu, Marlene S. Orandle, Sara Sadiq-Ali, Sherry M. Koontz, Uimook Choi, Fernando J. Torres-Velez, and Sharon H. Jackson. 2012. "P47 Phox Directs Murine Macrophage Cell Fate Decisions." *American Journal of Pathology* 180 (3). <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.11.019>.
- "Zaklady-Imunologie---Horejsi,-Bartunkova.Pdf." n.d.
- Zeidler, Martin P., Change Tan, Yohanns Bellaiche, Sara Cherry, Sabine Häder, Urte Gayko, and Norbert Perrimon. 2004. "Temperature-Sensitive Control of Protein Activity by Conditionally Splicing Inteins." *Nature Biotechnology* 22 (7). <https://doi.org/10.1038/nbt979>.