Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Atypická distribuce neuropeptidu corazoninu v buňkách kruhové žlázy u larev *Drosophila melanogaster* s mutací v adipokinetickém hormonu

Diplomová práce

Bc. Kristýna Sládková

Školitel: Mgr. Hana Sehadová, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

České Budějovice 2020

Sládková, K., 2020: Atypická distribuce neuropeptidu corazoninu v buňkách kruhové žlázy u larev *Drosophila melanogaster* s mutací v adipokinetickém hormonu [Atypical distribution of the neuropeptide corazonin in cells of the ring gland of *Drosophila melanogaster* larvae with a mutation in adipokinetic hormone. Mgr. Thesis in Czech. Mgr. Thesis in Czech] – 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, The Czech Republic.

Annotation:

Adipokinetic hormone (Akh) is an insect neuropeptide produced by the neuroendocrine gland of the corpora cardiaca and is involved in mobilization of energy stores and associated biochemical and physiological changes. In the Akh^1 mutant line of the fruitfly, *Drosophila melanogaster* with a deletion of the second amino acid (Leu), an atypical localization of the neuropeptide corazonin (Crz) was observed. Crz is present in Akh-positive cells in the ring gland of the larval brain, indicating a possible representation of non-functional Akh^1 by this phylogenetically related peptide. However, the connection of Crz expression in corpora cardiaca cells with a mutation in the receptor for Akh, Crz and sulphonylurea (i.e. components that are expected to be involved at different levels in the Akh signaling pathway) has not been demonstrated. Since this atypical distribution of Crz has not been confirmed in mutants with a null Akh mutation, the detected changes in the distribution of Crz in Akh^1 mutants can be explained by the possible cross-reactivity of the anti-Crz antibody with Akh^1 peptide. The possibility of cross-reactivity tested on a nitrocellulose membrane did not confirm this hypothesis, therefore the specific role of Crz in Akh^1 mutants cannot be completely ruled out.

Prohlášení:

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

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

V Českých Budějovicích dne 22. května 2020

…….

Kristýna Sládková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především své školitelce Mgr. Haně Sehadové, Ph.D. za její odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Tímto bych chtěla také poděkovat svému konzultantovi prof. RNDr. Michalu Žurovcovi, CSc. za poskytnuté konzultace. Dále děkuji všem pracovníkům Střediska mikroskopie a histologie Entomologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích za podporu během studia a za pomoc s experimenty, hlavně v začátcích. V neposlední řadě děkuji své rodině za plnou podporu, psychickou i finanční, během mnohaletého studia.

Obsah

1. Úvod ... 1
1.1 Neuroendokrinní systém ... 2
1.1.1 Adipokinetické hormony ... 4
1.1.1.1 Struktura adipokinetických hormonů ... 4
1.1.1.2 Funkce adipokinetických hormonů ... 5
1.1.1.3 Možná regulace hladiny Akh ... 8
1.1.2 Corazonin ... 9
1.1.2.1 Struktura corazoninu ... 9
1.1.2.2 Funkce corazoninu ... 11
2. Cíle práce ... 13
3. Materiál a metody ... 14
3.1 Laboratorní zvířata ... 14
3.2 Použité protilátky ... 15
3.3 Imunohistochemie na totálních preparátech ... 15
3.4 Fotodokumentace a analýza získaného obrazu ... 16
3.5 Imunodetekce peptidů na membráně pomocí techniky dotblot ... 16
4. Výsledky ... 18
4.1 Distribuce Akh v larválním mozku *D. melanogaster* ... 18
4.2 Distrubuce Crz v larválním mozku *D. melanogaster* ... 20
4.3 Distribuce Akh a Crz u mutantní linie Akh^{1} ... 22
4.3.1 Jaká signální dráha vyvolá tvorbu Crz v kruhové žláze? ... 23
4.3.2 Může syntézu Crz v kruhové žláze vyvolat homozygotní mutace v Akh a receptoru pro Crz? ... 25
4.3.3 Vyvolá nulová mutace Akh podobný efekt jako ztráta 1 aminokyseliny v Akh^{1}? ... 25
4.3.4 Vyloučení krosreaktivity protilátky proti Crz s Akh^{1} ... 27
5. Diskuze ... 29
6. Závěr ... 32
7. Seznam použitých zkratek ... 33
8. Seznam použité literatury ... 34
9. Přílohy ... 44
Příloha 1 Imunohistochemické značení neuropeptidů ... 44
Příloha 2 Princip konfokální mikroskopie ... 46
Příloha 3 Příprava použitých roztoků ... 48

1. Úvod

Metabolismus živočichů podléhá přísné homeostatické regulaci. Tato regulace je základním fyziologickým procesem, který má za úkol udržovat stálost vnitřního prostředí i za předpokladu dynamických změn vnějších podmínek. Vnější prostředí bývá velice proměnlivé, proto je schopnost homeostáze základním předpokladem správné funkce každého organismu. Jedná se o soubor jak fyziologických reakcí, tak reakcí v chování, kterými organismus odpovídá na stresové faktory vyvolané variabilitou vnějšího prostředí. Tyto reakce jsou koordinovány neuroendokrinním systémem, tj. vzájemným působením neuronů a hormonů, které vyvolávají rozličné účinky v širokém spektru tkání. Ke změně regulace tak dochází prostřednictvím změny sekrece specifických hormonů (Johnson et al., 2009).

Velmi dynamickou proměnnou vnějšího prostředí je dostupnost živin. Tato podmínka je zásadní v určování způsobu, jakým bude probíhat energetický metabolismus organismu, respektive jakým způsobem bude zpracována potrava. Organismy si díky homeostázi vytvářejí energetické rezervy v období pozitivní bilance a katabolizují je, když je bilance záporná, aby si udržely stabilní hladinu cirkulujících živin. Mobilizace živin je tedy řízena dvěma, proti sobě působícími, signalizačními drahami. U savců je to jednak inzulinová signalizace, která vychytává nadměrné množství cirkulujících cukrů a podporuje tak tvorbu rezerv a jednak katabolické uvolňování energetických zásob, které je pod kontrolou glukagonu a glukokortikoidů (Saltiel a Kahn, 2001; Rui, 2014).

Funkce inzulinu a glukagonu je evolučně zachována i v jednodušších organismech, což naznačuje, že tyto procesy by mohly být evolučně konzervované mezi druhy. Například u bource morušového, *Bombyx mori,* byl nalezen peptid příbuzný inzulinu, bombyxin, který snižuje koncentraci cukru v hemolymfě (Satake et al., 1997). Dále u octomilky, *Drosophila melanogaster,* je v genomu zakódováno 8 peptidů na bázi inzulínu (DILPs) a glukagonu podobný adipokinetický hormon (Akh), (Wu a Brown, 2006; Van der Horst et al., 2001; Geminard et al., 2006). Tyto hormony vykazují podobné funkce jako jejich savčí protějšky a analogické jsou si i tkáně, ve kterých jsou savčí a hmyzí hormony produkovány. Takže buňky produkující inzulin u *D. melanogaster* jsou funkčně analogické k pankreatickým ß-buňkám u savců a podobně buňky produkující Akh jsou paralelní k α-buňkám pankreatu (Ahmad et al., 2019). Další podobnost spočívá v diferenciaci tkání, kdy pankreas je odvozený z neuroektodermu, stejně jako buňky octomilky produkující inzulin (Wang et al., 2007).

Tato diplomová práce se zabývá vztahem mezi energetickým metabolismem a neuroendokrinním systémem zodpovědným za jeho regulaci. Podává přehled možných energetických regulátorů a je zde zvažována možnost funkčního zastoupení AKH neuropeptidem corazoninem u *D. melanogaster*. Imunohistochemická detekce obou hormonů v drozofilých liniích mutantních v Akh, v receptoru pro Akh nebo/i pro corazonin tento předpoklad nepotvrdila. Práce rovněž detailně popisuje princip imunohistochemické detekce bílkovin a peptidů a jejich následné vizualizace.

1.1 Neuroendokrinní systém

Kontrola a koordinace vnitřního prostředí mnohobuněčných organismů vyžaduje komunikaci mezi buňkami. Ta je zajištěna prostřednictvím signálních mechanismů, které lze podle vzdálenosti působení rozdělit do dvou skupin: (1) přímý mezibuněčný kontakt a (2) chemická signalizace na dlouhé vzdálenosti (Hartenstein, 2006; Sha, 2013).

V prvním případě se jedná o mechanismus, který se vyvinul do stavu vysoké komplexity nervového systému (Hartenstein, 2006). Spočívá v uvolňování neurotransmiterů do synaptické štěrbiny, která se utváří mezi sousedními neurony při synapsi. Neurotransmitery jsou uvolňovány z vesikulů v axonových zakončeních neuronu. Následně difundují přes synaptickou štěrbinu a naváží se na příslušné receptory nacházející se na membráně sousedního neuronu (Sha, 2013).

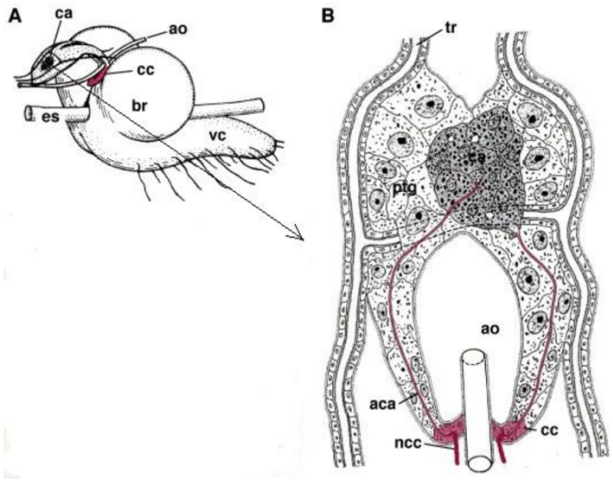
Druhý způsob komunikace buněk je založen na difuzi chemických molekul v extracelulárním prostoru, kdy velkou výhodou je přenos signálu na delší vzdálenosti a ovlivnění cílové buňky daleko od místa vzniku signálních molekul. Tento mechanismus je zároveň základem endokrinního systému (Hartenstein, 2006). Zahrnuje uvolňování hormonů do krevního řečiště a tím nepřímé působení na cílové buňky. Přesné zacílení na konkrétní buňky je zajištěno expresí specifických a vysoce afinitních receptorů pro daný hormon na povrchu cílových buněk (Sha, 2013).

Oba způsoby komunikace jsou zahrnuty v neuroendokrinním systému, kdy neuropeptidy působí buď lokálně v místě svého uvolnění (neurotransmiter/neuromodulátor) nebo mohou také putovat cirkulačním systémem. Neuropeptidy jsou uvolňovány neurosekretorickými buňkami (NSCs), což jsou specializované neurony primárně určené k produkci hormonů, místo klasického vedení nervových vzruchů. Těla neurosekretorických buněk se obvykle nachází v centrální nervové soustavě (CNS), přesněji v místě styku obou mozkových hemisfér, kde zachytávají informace z presynaptických neuronů. Jejich axony pak

vedou do periferních neurohemálních orgánů a uvolňují hormony do cirkulačního systému. Neurohemální orgány uskladňují své hormony až do doby, kdy jsou stimulovány nervovým systémem (Sha, 2013).

U hmyzu se neurosekreční systém skládá z několika neurosekretorických buněk v CNS. Většina těchto buněk je lokalizována v dorso-mediálním protocerebru v oblasti zvané *pars intercerebralis,* která se nachází v místě styku mozkových hemisfér. Axony neurosekretorických buněk vedou k systému malých většinou párových neuroendokrinních žláz: corpora cardiaca (CC) a corpora allata (CA). Ty jednak vylučují své vlastní hormony, ale uplatňují se zejména jako neurohemální orgány pro hormony syntetizované v mozku. Další součástí endokrinního systému hmyzu je prothorakální žláza, párový orgán řídící zejména svlékání larev. U většiny hmyzu se proto nachází pouze u larev, a to v prvním hrudním článku, prothoraxu. U larev vyšších dipter endokrinní žlázy (CC, CA a prothorakální žláza) splývají v jednotný celek nazývaný kruhová žláza (Obr. 1), která obklopuje přední konec aorty. Neuroendokrinní systém hmyzu je svou organizací i funkcí přirovnáván k hypotalamo-hypofyzární soustavě obratlovců (Velasko et al., 2007).

Hormonální soustava hmyzu vylučuje velké množství hormonů, které lze rozdělit do 3 skupin – ekdysteroidy, juvenilní hormony a již zmíněné peptidické neurohormony (neuropeptidy). Vysoce specifické hormony v kombinaci s nervovým systém řídí téměř všechny biologické pochody hmyzu (Kodrík, 2014).



Obr. 1: Schématické znázornění neuroendokrinních tkání u larvy *D. melanogaster*. (A) Postranní pohled, **(B)** Příčný řez kruhovou žlázou. Zkratky: aca – axony ke corpora allata, ao – aorta, ncc – nervy corpora cardiaca, tr – trachea lemující kruhovou žlázu, ca – corpora allata, cc – corpora cardiaca, ptg – prothoracic gland (prothorakální žláza), vc – ventral nerve cord (ventrální nervové ganglium), es – oesophagus, br – brain (mozek) (Velasco et al., 2007).

1.1.1 Adipokinetické hormony

K peptidickým neurohormonům hmyzu patří adipokinetické hormony (Akh). Jedná se o skupinu malých, strukturně příbuzných peptidů podílejících se zejména na mobilizaci energetických zásob. Byly objeveny u řady různých zástupců hmyzu, přičemž v současné době je známo více než 60 forem těchto neurohormonů (Gäde a Marco, 2013). Jejich rychlý evoluční vývoj umožňuje u některých druhů hmyzu přítomnost i více Akh kódovaných samostatnými geny, jejichž počet se může pohybovat od 2 forem u *Pyrrhocoris apterus* (Kodrík et al., 2002) a *Periplaneta americana* (Scarborough et al., 1984), přes 3 formy u *Locusta migratoria* (Stone et al., 1976; Siegert et al., 1985; Oudejans et al., 1991) a *B. mori* (Ishibashi et al., 1992). U *Spodoptera frugiperda* byly dokonce identifikovány 4 odlišné Akh (Gäde et al., 2008). Naproti tomu jediná forma Akh byla zaznamenána u lišaje *Manduca sexta* (Ziegler et al., 1985) a u *D. melanogaster* (Drome-Akh), (Schaffer et al., 1990). Také jsou hojně syntetizovány u korýšů, u kterých byly zařazené pod anglický pojem red-pigment concentrating hormone z důvodu jejich uplatnění při adaptační změně tělesného zbarvení (Kodrík, 2014).

1.1.1.1 Struktura adipokinetických hormonů

Adipokinetické hormony jsou krátké peptidy o délce 8 – 10 aminokyselin (octa-, nona- nebo decapeptidy) s aromatickými aminokyselinami v pozicích 4 (Fenylalanin) a 8 (Tryptofan), hydroxidovým residuem v poloze 5, glycinovým residuem v pozici 9, pyroglutamovou kyselinou na N-konci a amidem (NH_2) blokující C-konec. Tato residua jsou vysoce konzervovaná a jsou nezbytn8 pro biologickou aktivitu adipokinetických hormonů (Gäde et al., 1997).

Primární struktura adipokinetického hormonu u *D. melanogaster* je pGln-Leu-Thr- Phe-Ser-Pro-Asp-Trp-NH_2 neboli pQLTFSPDWa (Schaffer et al., 1990). Hormon je kódován jediným Akh-genem tvořícím prekurzor (Obr. 2) o délce 79 aminokyselin. Ten kromě samotného oktapeptidu, který je aktivní dále zahrnuje 22 aminokyselin dlouhý signální peptid na N-konci a 49 aminokyselin dlouhý peptid asociovaný s Akh o neznámé funkci (Schaffer et al., 1990; Noyes et al., 1995).

Obr 2: Prekurzor adipokinetického hormonu u *D. melanogaster*. Obsahuje signální peptid (S) a adipokinetický hormon (Akh), který je následovaný peptidem asociovaným s adipokinetickým hormonem (Akh-AP). Mezi Akh a Akh-AP je místo posttranslačního zpracování (GKR).

1.1.1.2 Funkce adipokinetických hormonů

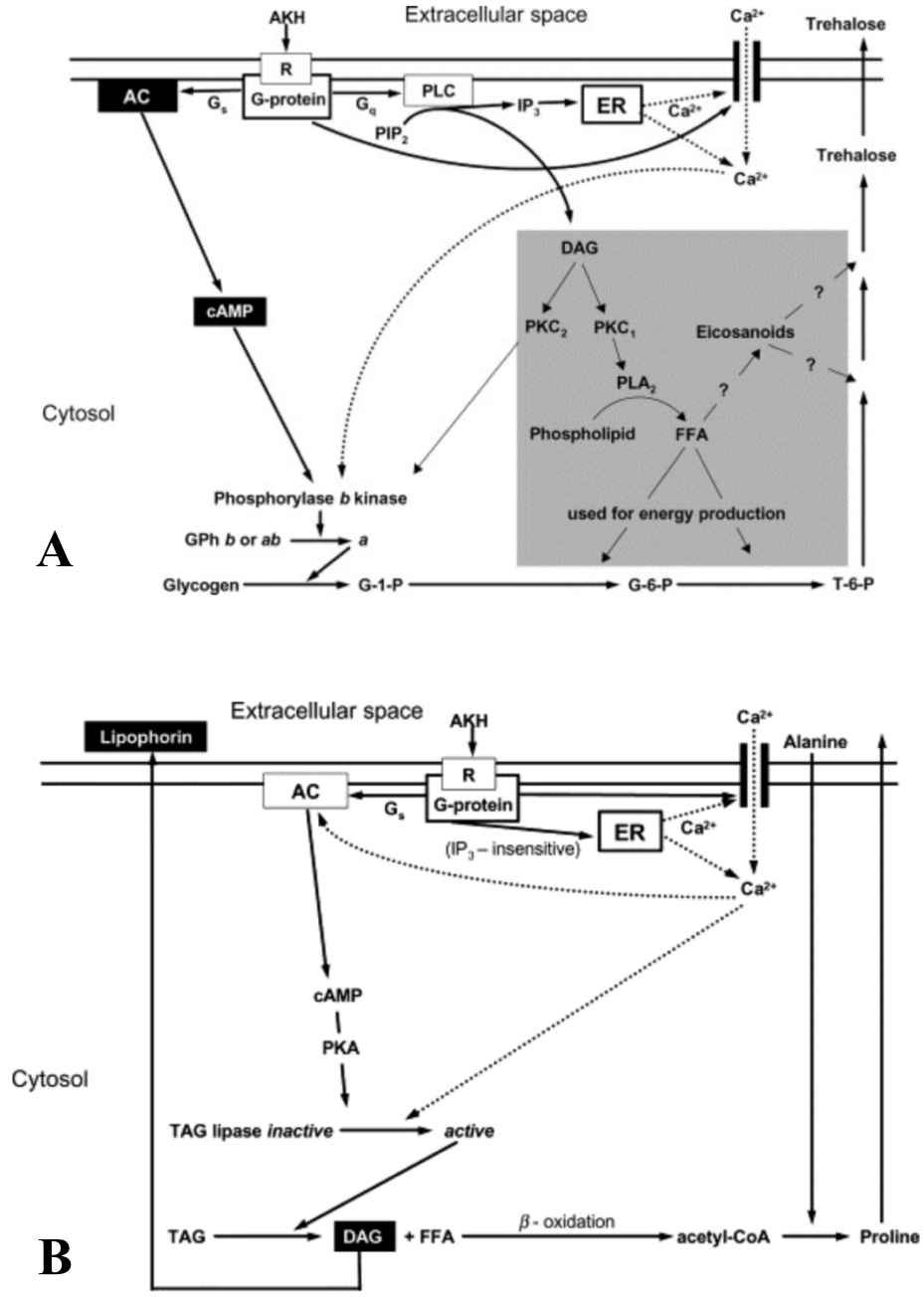
Adipokinetické hormony jsou metabolické neurohormony. Jejich hlavní úlohou je řídit mobilizaci energetických substrátů (cukrů, tuků) během procesů vyžadující zvýšenou energii a zároveň inhibovat syntetické reakce, aby potřebné látky nebyly využívány na méně důležité aktivity a nedocházelo tak k neefektivnímu odčerpávání energie (Van der Horst, 2003; Lee a Park, 2004; Kim a Rulifson, 2004). Hlavním orgánem pro ukládání zásobních látek u hmyzu je tukové těleso, které lze přirovnat k savčím játrům a bílé tukové tkáni (Azeez et al., 2014).

Funkce adipokinetického hormonů je nejlépe prostudována u *D. melanogaster*, kde je Akh exprimován výhradně od pozdního embryonálního vývoje do dospělosti, a to v neurosekretorických buňkách endokrinní žlázy CC (Noyes et al., 1995; Lee a Park, 2004). Akh signalizace se liší v závislosti na tom, jakým podmínkám je octomilka vystavena. V případě, kdy je jedinec vystaven energeticky náročným aktivitám, jako je létání nebo nadměrný pohyb, dojde k uvolnění Akh z buněk v corpora cardiaca do hemolymfy a jeho cílovým orgánem je právě tukové těleso. Protože Akh nejsou schopni, kvůli své chemické povaze, volně proniknout buněčnou membránou tukového tělesa, komunikace probíhá pomocí specifických receptorů (Gäde a Auerswald, 2003). Jedná se o sedmi-transmembránové receptory spřažené s G-proteinem (GPCR), (Staubli et al., 2002). Po navázání Akh na příslušný receptor dojde ke konformační změně receptoru, která způsobí aktivaci G-proteinu. Je to dáno alosterickou změnou v receptoru, kdy dochází k výměně guanosindifosfátu (GDP) za guanositrifosfát (GTP) na jedné ze tří podjednotek G-proteinu. Tímto způsobem Akh signál aktivuje enzymy adenylát cyklázu nebo fosfolipázu C, které v cytoplasmě cílové buňky produkují druhé posly, které dále aktivují příslušné enzymy zajišťující odpovídající hormonální odezvu, tj. fosforylaci cukrů a lipidů (Obr. 3). Zatímco aktivace adenylát cyklázy vede k produkci cyklického adenosinmonofosfátu, který aktivuje proteinkinázu A, aktivace

fosfolipázy C způsobuje rozklad inositolfosfolipidů na inositoltrifosfát a diacylglycerol. Diacylglycerol spolu s Ca^{2+} ionty uvolněnými působením inositoltrifosfátu na endoplasmatické retikulum aktivuje fosfokinázu C, která fosforyluje cílové molekuly (Gäde a Auerswald, 2003).

Působením Akh se z tukového tělesa uvolňují buď cukry (trehalóza, hypertrehalosemický efekt), (Steele, 1961) nebo tuky (triacylglyceroly, hyperlipemický efekt), (Beenakkers, 1969; Mayer a Candy, 1969). Může uvolňovat také aminokyselinu prolin, jako například u brouka *Pachnoda sinuata* (Gäde a Auerswald, 1999). V souladu s tím byl Akh označen jako hyperprolinemický hormon. I přes existenci rozdílů ve využívání různých typů energetických substrátů je role Akh u hmyzu evolučně zachována (Gäde a Auerswald, 2003).

Tato katabolická role Akh je jeho primární funkcí, ale Akh je u hmyzu zapojen i do dalších fyziologických procesů ovlivňujících chování (Kaun et al., 2008), pohyb (Kodrík et al., 2000), reprodukci (Lorenz, 2003), trávení (Vinokurov et al., 2014), spánek (Metataxis et al., 2014), imunitu (Adamo et al., 2008), odolnost vůči oxidativnímu stresu (Bednářová et al., 2013) a svalovou kontrakci (Stoffolano et al., 2014). Pleiotropní účinek adipokinetických hormonů ukazuje na možnost aktivace rozdílných signálních drah (Gáliková et al., 2015).

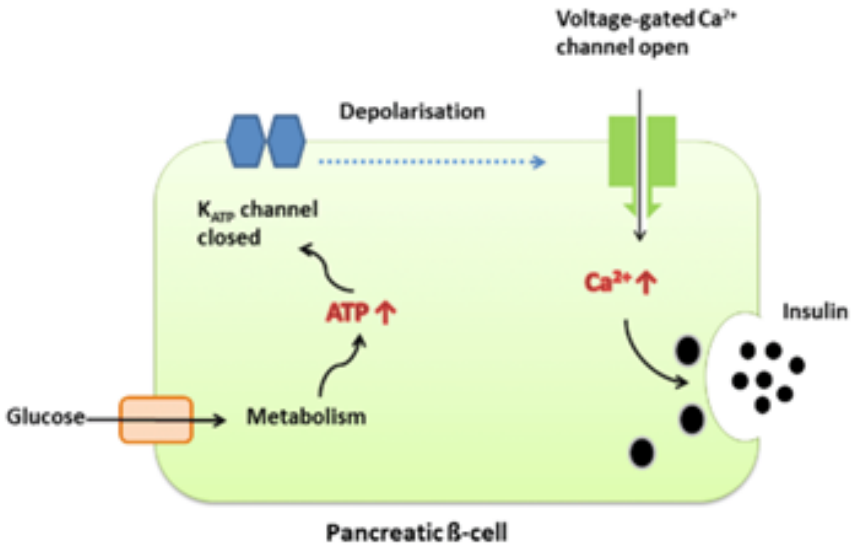


Obr. 3: Mechanismus působení Akh v tukovém tělese hmyzu vedoucí k uvolňování cukrů, lipidů a prolinu do hemolymfy (Gäde a Auerswald, 2003). (A) Dráha vedoucí k mobilizaci trehalózy. Aktivace fosfolipázy C (PLC) způsobuje rozklad fosfatidylinositolu bisfosfátu (PIP_2) na inositoltrifosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG). DAG spolu s Ca^{2+} ionty uvolněnými působením IP_3 na endoplasmatické retikulum (ER) aktivuje glykogen fosforylázu (GPh). Ze zásobního glykogenu vzniká glukóza-1-fosfát (G-1-P), který se mění na trehalózu. Sarančata využívají k aktivaci GPh adenylátcyklázovou cestu přes adenylát cyklázu (AC), která zahrnuje vznik cAMP. **(B)** Dráha vedoucí k mobilizaci tuků u sarančat a lišajů nebo prolinu u brouků. Adenylátcyklázová dráha s následným nárustem cAMP aktivuje protein kinázu A (PKA), která spolu s Ca^{2+} ionty aktivuje triacylglycerol (TAG) lipázu. TAG lipáza katalyzuje štěpení triacylglycerolů na DAG a volné mastné kyseliny (FFA). Prolin je syntetizován z acetyl-CoA a alaninu. Další vysvětlivky k obrázku: G-6-P, glucose-6-phosphate; PKC, protein kinase C; R, receptor; T-6-P, trehalose-6-phosphate. Bílá písmena na černém pozadí znázorňují dráhy nacházející se jen u sarančat. Dráha v šedé oblasti se týká švábů.

1.1.1.3 Možná regulace hladiny Akh

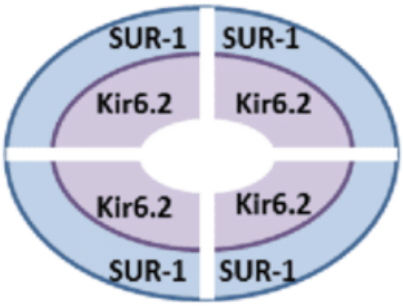
Zatím není zcela objasněno, jakým způsobem buňky produkující Akh monitorují změnu hladiny cirkulujících živin (Géminard et al., 2009). Vzhledem k tomu, že exprimují proteiny potřebné pro tvorbu a funkci ATP-sensitivního draselného kanálu (K_{ATP}), mohly by přímo reagovat na množství trehalózy v hemolymfě (Kim a Rulifson, 2004). Tento mechanismus slouží ke snímání hladiny glukózy v krvi obratlovců, která se odráží v množství ATP (Miki et al., 2001). Aktivace K_{ATP} kontroluje sekreci insulinu z ß-buněk pankreatických ostrůvků (Ashcroft et al., 1984). Přítomnost obdobného mechanismu u hmyzu je nutné ověřit výzkumy spojenými s měřením uvolňování Akh za odlišných koncentrací trehalózy (Ahmad et al., 2019).

U savců se v důsledku zvýšeného metabolismu glukózy v ß-buňkách pankreatických ostrůvků zvýší koncentrace ATP. Vysoká koncentrace ATP stimuluje sulfonylureu k navázání na sulfonylureový receptor (Sur), který je součástí K_{ATP}. V důsledku toho dojde k uzavření K_{ATP} a depolarizaci plasmatické membrány, což vyvolá otevření vápenatých kanálů a příliv vápenatých kationtů do cytoplasmy ß-buněk. Zvýšení intracelulární koncentrace vápníku způsobuje fúzi granulí obsahujících insulin s plasmatickou membránou a uvolnění insulinu do krve a inhibuje uvolňování glukagonu (Obr. 4), (Schmeltz a Metzger, 2007).



Obr. 4: Mechanismus ATP-dependentního draselného kanálu regulující sekreci insulinu z pankreatických ß-buněk u savců (Molnár et al., 2017).

Z molekulárního hlediska je K_{ATP} kanál komplex 2 podjednotek: (1) cytoplasmatického vazebného místa pro sulfonylureu (sulfonylureový receptor) a (2) samotného draselného kanálu vytvářející pór (Kir6.2). Každá z těchto podjednotek je pak v kanálu přítomná čtyřikrát (Obr. 5), (Nasonkin et al., 1999). Co se týče samotného sulfonylureového receptoru, u obratlovců byly identifikovány 3 formy, přičemž každá má odlišnou tkáňovou lokalizaci – sulfonylureový receptor typu 1 (SUR 1) nacházející se v pankreatu (Inagaki et al., 1995) a 2 sestřihové varianty SUR2A v srdečním svalu a mozku a SUR2B v hladké svalovině a mozku (Inagaki et al., 1996; Isomoto et al., 1996).



Obr. 5: Model ATP-dependentního draselného kanálu a jeho podjednotek. Je to oktamer ve stechiometrii 4:4 – čtyřikrát sulfonylureový receptor typu 1 (SUR 1) a čtyřikrát protein Kir6,2 tvořicí draselný kanál (Molnár et al., 2017).

1.1.2 Corazonin

Dalším hmyzím metabolickým neuropeptidem je corazonin (Crz). Poprvé byl identifikován u švába *P. americana*, kde byl prokázán jeho vliv na zvýšenou srdeční činnost (Veenstra, 1989). Později byl nalezen u dalších druhů hmyzu z řádů Orthoptera, Lepidoptera, Hymenoptera a Diptera (Veenstra, 1991; Hua et al., 2000; Hansen et al., 2001; Roller et al., 2006; Choi et al., 2005). Výjimkou je řád brouků, u kterých nebyla nalezena žádná forma Crz (Roller et al., 2003).

1.1.2.1 Struktura corazoninu

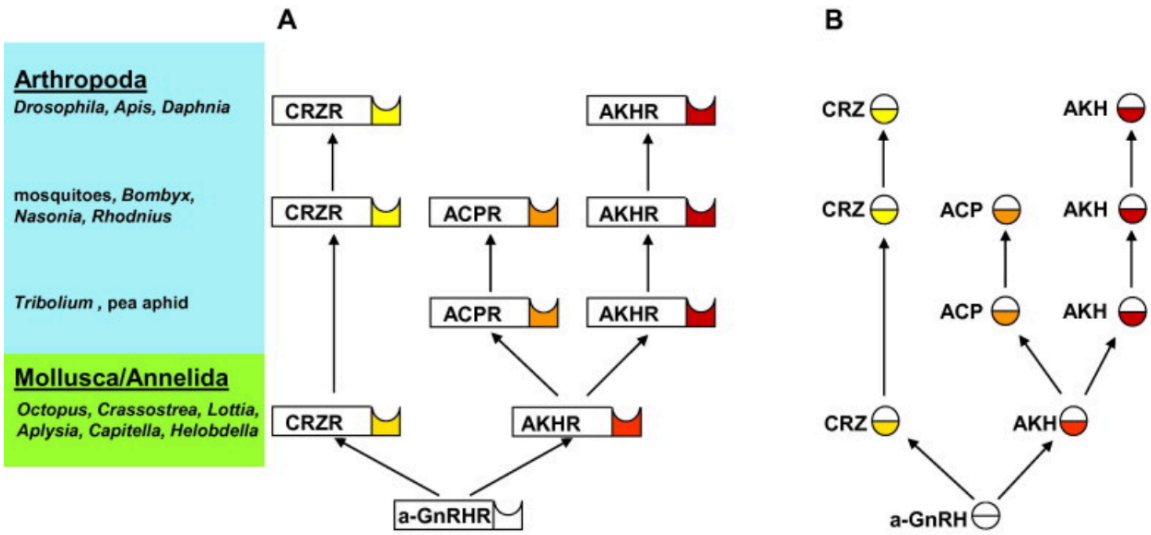
Crz je neuropeptid o délce 11 aminokyselin (undekapeptid) s kyselinou pyroglutamovou na N-konci a amidem (NH_2) blokující C-konec. Prekurzor Crz (Obr. 6) obsahuje 19 aminokyselin dlouhý signální peptid na N-konci a poté samotný corazoninový undekapeptid, který je následovaný corazonin asociovaným peptidem (CAP) o délce 121 aminokyselin (Choi

et al., 2005). Primární struktura je na rozdíl od Akh u všech zatím studovaných druhů hmyzu jednotná s touto sekvencí aminokyselin (Veenstra, 1989, Hummon et al., 2006): pGln-Thr-Phe-Gln-Tyr-Ser-Arg-Gly-Trp-Thr-Asn-NH_2 neboli pQTFQYSRGWTNa.

Obr. 6: Prekurzor Crz u *D. melanogaster*. Obsahuje signální peptid (S) a corazonin (Crz), který je následovaný peptidem asociovaným s corazoninem (CAP). Mezi Crz a CAP je místo posttranslačního úpravy (GKR).

Tato sekvence odpovídající původní sekvenci izolované ze švába, je nejčastěji vyskytující se isoformou Crz a nese v poloze 7 aminokyselinu arginin. V rámci hmyzu bylo nalezeno několik dalších isoforem Crz. Například u kobylek je do polohy 7 zařazena aminokyselina histidin nebo u včely *Apis mellifera* je kromě této změny ještě změna v poloze 4, kam je zařazena aminokyselina threonin místo glutaminu (Verleyen et al., 2006; Predel et al., 2006).

Crz receptor stejně jako receptor pro Akh patří mezi receptory spřažené s G-proteinem (Cazzamali et al., 2002; Park et al., 2002). Přítomnost shodného intronu v genomické sekvenci receptorů pro Akh, Crz i gonadotropin uvolňující hormon (GnRH – Gonadotropin-Releasing Hormone) nacházející se u obratlovců naznačuje, že tyto receptory jsou strukturně příbuzné a že mají společný evoluční původ. Vzhledem k těmto podobnostem bylo sledováno evoluční propojení mezi GnRH receptory a receptory pro Akh, Crz a peptid příbuzný Akh/Crz (Akh/corazonin-related peptide = ACP). Poslední z výčtu jmenovaných byl identifikován jako strukturní meziprodukt receptorů pro Akh a Crz a představuje vhodný příklad koevoluce receptorů, která má pravděpodobně původ již v době vzniku prvoústých (Protostomia) před 700 miliony lety. Předpokládá se, že v této vývojové linii došlo k duplikaci v ancestrálním genu pro GnRH receptor a stejně tak i v jeho ligandu. Následovala diverzifikace vyvolaná mutacemi a selekčním tlakem, která vedla ke vzniku jednotlivých receptorů (Obr. 7), (Hauser et al., 2014).



Obr. 7: Navržená koevoluce Akh/ACP/Crz receptorů (A) a jejich ligandů (B) u prvoústých (Protostomia). Po duplikaci v ancestrálním genu pro receptor GnRH a jeho ligandu došlo k diverzifikaci a ke vzniku – Crz receptoru a corazoninu podobného ligandu a Akh receptoru a adipokinetickému hormonu podobného ligandu u měkkýšů (Molusca) a kroužkovců (Annelida). U Akh receptoru a jemu podobnému ligandu došlo opět k duplikaci, která vedla ke vzniku 3 nezávislých hormonálních systémů zahrnujících Akh, ACP a Crz nacházející se u členovců, Arthropoda. Vysvětlivky k obrázku: CRZR = Crz receptor; ACPR = ACP receptor; AKHR = Akh receptor; a-GnRHR = ancestrální GnRH receptor; a-GnRH = ancestrální GnRH (Hauser et al., 2014).

1.1.2.2 Funkce corazoninu

Funkce Crz a signální dráhy zahrnující Crz nejsou dosud zcela objasněné. Ačkoliv existuje několik fyziologických účinků corazoninu u hmyzu, které svědčí o tom, že se nejedná o úzce specializovaný neuropeptid, žádná univerzální funkce tohoto neuropeptidu zatím nebyla stanovena (Predel et al., 2007; Veestra, 2009).

U *L. migratoria*, bylo zjištěno, že Crz je důležitý pro tvorbu tmavé pigmentace kutikuly během migrace (Tanaka et al., 2002a). U *M. sexta* je Crz exprimován v buňkách cirkadiánních hodin a koordinuje ekdyzi (Kim et al., 2004). Vliv Crz na sníženou rychlost spřádání kokonu byl prokázán u *B. mori (Tanaka et al., 2002b)*.

Jeden z pohledů, který by vedl k ujasnění univerzální funkce Crz, vycházel z distribuce Crz. U larev je lokalizován v neuronech centrálního mozku a ventrálního ganglia. Apoptóza Crz-pozitivních neuronů ve ventrálním gangliu během metamorfózy naznačuje uplatnění Crz při regulaci ekdyze. Přestože u Crz-pozitivních buněk v mozku se také předpokládá zapojení

do kontroly ekdyze, tyto buňky přetrvávají i po metamorfóze a exprimují velké množství mRNA pro Crz na rozdíl od mRNA kódující eklozní hormon nebo eclosion triggering hormone, o kterých je známo, že se rovněž podílí na regulaci ekdyze. Na základě tohoto faktu není funkční spojení Crz a ekdyze zcela prokazatelné (Lee et al., 2007).

U *D. melanogaster* je Crz dáván do souvislosti s energetickým metabolismem, protože Crz-pozitivní neurony v mozku rovněž exprimují krátký neuropeptid F (sNPF) a jsou nervově propojeny se skupinou buněk produkujících insulin (IPC) a mohly by tudíž ovlivňovat tvorbu peptidů na bázi insulinu (Drosophila insulin-like peptides = DILPs) (Kapan et al., 2012).

U corazoninu je tedy velká funkční rozmanitost u všech, zatím studovaných, druhů hmyzu. Uvolňování Crz za podmínek nutričního stresu by však umožnilo logické spojení mezi různými fyziologickými účinky popsaných pro tento neurohormon (Veenstra, 2009).

Společný předchůdce a vysoká sekvenční homologie Crz a Akh naznačuje, že by mohlo dojít k vzájemnému funkčnímu zastoupení jak hormonů, tak jejich receptorů. Zatímco za normálních podmínek se distribuce Crz a Akh v mozku *D. melanogaster* nepřekrývá (Akh je distribuován v kruhové žláze a Crz lze detekovat celkem ve 24 nervových buňkách mozku), (Schaffer et al., 1990; Choi et al., 2005), pokusy na drozofilí linii mutantní v genu pro tvorbu Akh překvapivě odhalily přítomnost Crz v buňkách CC (Sehadová, Žurovec, nepublikovaná data).

2. Cíle práce

Cílem této práce bylo ověřit výskyt Crz v buňkách CC v kruhové žláze *D. melanogaster* u linie mutantní v genu pro Akh (Sajwan et al., 2015) a pokusit se odhalit signální dráhu, pomocí které tato mutace vyvolá produkci Crz v místech, kde se běžně nevyskytuje. K tomu bylo zapotřebí splnění následujících dílčích cílů.

1. Detailně se seznámit s imunohistochemickou lokalizací Akh a Crz v centrální nervové soustavě larev *D. melanogaster*
2. Porovnat imunohistochemickou lokalizaci obou peptidů u několika linií *D. melanogaster* mutantní v genu pro Akh receptor, Crz receptor a Sur.
3. Osvojit si práci na fluorescenčním a konfokálním mikroskopu.
4. Provést analýzu získané fotodokumentace pomocí softwaru Imaris a Adobe Photoshop.
5. Zavést techniku dotblot v laboratoři Střediska mikroskopie a histologie Entomologického ústavu, Biologického centra Akademie věd České republiky.

V příloze této magisterské práce je detailní rozbor principu imunohistochemické detekce proteinů ve tkáních a možnosti jejich značení pomocí fluorescenční a konfokální mikroskopie.

3. Materiál a metody

3.1 Laboratorní zvířata

1) White (w^{1118}); (Bloomington Drosophila Stock Center) – kontrolní linie
2) Yellow white ($y^{1}w^{*}$); (Bloomington Drosophila Stock Center) – kontrolní linie
3) Akh^{1} (Sajwan et al., 2015) – homozygotní linie s mutací v genu pro Akh, která byla provedena cílenou mutagenezí prostřednictvím TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) metody. Jedná se o deleci 3 bp vedoucí ke ztrátě druhé aminokyseliny (Leu) v Akh octapeptidu.
4) $AkhR^{1}$ (Grönke et al., 2007) – linie postrádající receptor pro Akh (AkhR) vytvořena inzercí P-elementu do nepřekládané oblasti 1. exonu v genu kódující AkhR. U linie došlo k odstranění genomické sekvence zahrnující start kodón, což vedlo ke ztrátě celé kódující sekvence.
5) $CrzR^{01}$ (Sha et al., 2014) – linie postrádající receptor pro Crz (CrzR) vytvořena mobilizací transpozibilního elementu Minos v 5. intronu CrzR mutantní linie, což vedlo k 8 kb deleci zahrnující exony 2 – 5.
6) $Sur^{Mi[MIC]}$ (Nagarkar-Jaiswal et al., 2015); (Bloomington Drosophila Stock Center) – linie postrádající sulfonylureový receptor vytvořena inzercí Mi[MIC] kazety do 5. exonu v genu kódující sulfonylureový receptor (Sur).
7) Akh^{1}, $CrzR^{01}$ (Svobodová, 2020) – homozygotní linie byla připravena homologní rekombinací Akh^{1} a $CrzR^{01}$ za přítomnosti balanceru na 3. chromozomu.
8) Akh^{1}/w (tato diplomová práce) – heterozygotní linie vytvořena zpětným křížením homozygota Akh^{1} s kontrolní linií w^{1118}.
9) Akh^{AP} (Gáliková et al., 2015) – mutantní linie, u které nedochází k tvorbě Akh. Připravena metodou CRISPR/Cas9 způsobující deleci o rozsahu 19 bp v oblasti kódující Akh, což vedlo k posunu čtecího rámce a ke ztrátě tvorby jak Akh, tak Akh-AP.

Všechny linie byly drženy na standartním kukuřičném živném médiu v termostatu při teplotě 25 °C a fotoperiodě 12 hodin světlo/12 hodin tma. Pro experimenty byly použity larvy 3. instaru.

3.2 Použité protilátky

Pro detekci Akh byla použita primární polyklonální protilátka připravena imunizací králíka antigenem připraveným konjugací *D. melanogaster* Akh s hemocyaninem přílipky. Specificita protilátky byla ověřena X-gal barvením u linie *D. melanogaster dAkh-gal4 X UAS-lacZ,* kde gal4-UAS systém řídí expresi ß-galaktosidázy v Akh-pozitivních buňkách (Park a Lee, 2004).

Pro detekci Crz byla použita králičí polyklonální protilátka namířena proti [His7]-Crz (Wako, Nagano, Japonsko) a její specificita byla stanovena na základě ztráty imunoreaktivity po preabsorpci se syntetickým peptidem [Arg7]-Crz u 6 druhů hmyzu (Roller et al., 2003).

3.3 Imunohistochemie na totálních preparátech

Z larev 3. instaru byly v 0,01 M fosfátovém pufru (PB, pH 7,4) odstřiženy hlavové části, které byly fixovány 4% roztokem paraformaldehydu v PB 30 minut při pokojové teplotě. Následně byly tkáně promyty 3 x 15 min v PB a byly vypitvány mozky s připojenou kruhovou žlázou.

Mozky byly inkubovány v blokovacím médiu připraveného z 5 % normálního kozího séra v PB s 0,5 % Tritonem X-100 (PB-T) po dobu 2 h při pokojové teplotě. Následná inkubace s primárními látkami ředěnými v inkubačním médiu (anti-Akh v poměru 1:4000, anti-Crz v poměru 1:600) probíhala 3 dny při teplotě 4 °C. Poté byly tkáně promyty 6 x 10 min v PB-T a inkubovány v sekundární protilátce Goat anti-rabbit IgG značené fluoroforem Alexa Fluor 488 (Life Technologies) ředěné v poměru 1:200 v blokovacím médiu 1-2 dny ve 4 °C. Po opětovném promytí 6 x 10 min v PB-T a 10 minut v PB byly mozky přeneseny na podložní sklo do zalévacího média (Vectashield, Vector laboratories). Jelikož se jedná o velmi malé tkáně, podložní sklo bylo nejdříve opatřeno podpůrným kroužkem, aby nedošlo k poškození tkání po přiložení krycího skla. Aby se zabránilo vyschnutí zalévacího média, byly okraje krycího skla opatřeny vrstvou bezbarvého laku na nehty

3.4 Fotodokumentace a analýza získaného obrazu

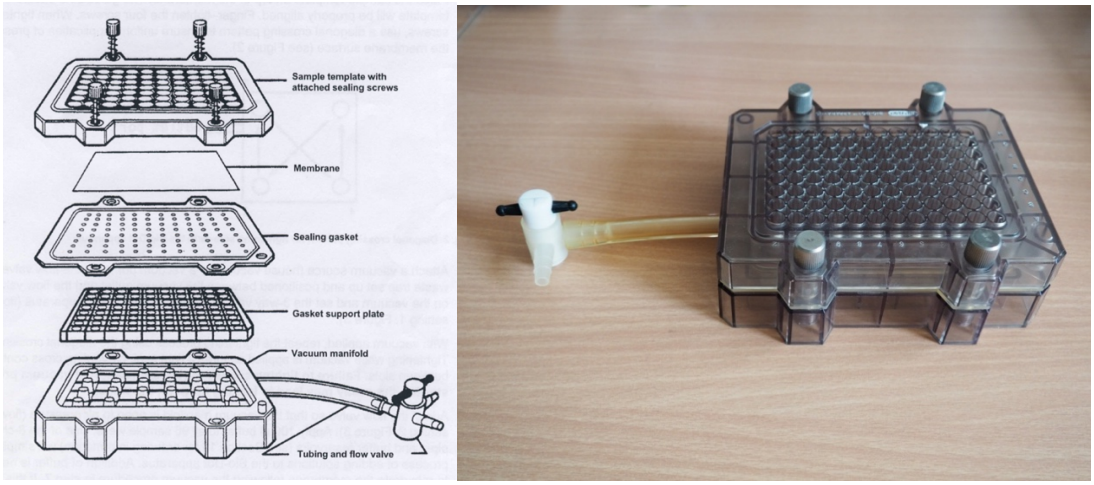
Preparáty byly analyzovány na laserovém skenovacím konfokálním mikroskopu FluoView™ FV 1000 (Olympus) ovládaném softwarem FV 10 za použití imerzních objektivů UPLSAPO 20x a UAPON 40x pro zachycení detailních snímků. Jako excitační světelný zdroj byl použit MultiArgon laser, jehož absorpční maximum je 488 nm a emise byla sbírána z oblasti od 500 do 600 nm. Kromě emise detekované pomocí fotonásobiče byly objekty současně snímány v procházejícím světle pomocí světelného detektoru.

Byly zhotoveny série snímků s různým proostřením v ose Z a s rozlišením 1024x1024 pixelů. Pomocí programu Imaris verze 6.3.1 (Bitplane) byl ze snímků z jednotlivých optických vrstev zrekonstruován 3D obraz. Takto složený obraz byl převeden do formátu tiff umožňující zachovat kvalitu získaných dat. Konečné grafické zpracování obrazu, jako korekce jasu a kontrastu, bylo provedeno v programu Adobe Photoshop (Adobe Systems).

3.5 Imunodetekce peptidů na membráně pomocí techniky dotblot

Pro testování imunoreaktivity Crz protilátky technikou Dotblot byly použity následující peptidy: Drome-Akh, Akh[1] a Crz (Shanghai Royobiotech, Čína). Jako kontrola byla použita část proteinu Timeless z octomilky, *C. costata* (peptid o délce 13 aminokyselin), syntetizovaná firmou Moravian-Biotechnology (Brno, Česká republika). Peptidy byly naředěny v 80 % methanolu za pomocí sonikace v poměru 1 mg/ml.

Přenos peptidů na membránu a jejich následná imunodetekce (dotblot) byla provedena pomocí aparatury Bio-Dot microfiltration (Bio-Rad) podle postupu uvedeném v instrukčním manuálu výrobce (Obr. 8). Místo Tris pufru byl použit fosfátový pufr (PBS). Nitrocelulózová membrána byla nejdříve ponořena ve smáčecím roztoku PBS s 0,05 % Tweenem 20 (PBS-T) po dobu 10 minut. Poté byla membrána umístěna do dotblotu mezi gumové těsnění a 96 - jamkovou destičku, která je určena k aplikaci jednotlivých vzorků. Gumové těsnění stranou odvrácenou k membráně přiléhá k podpůrné destičce, která nasedá na vakuový zásobník. Takto sestavená základní aparatura je připojena ke zdroji vakua pomocí průtokového ventilu umožňující systematické vypínání a zapínání vakua během celé procedury.

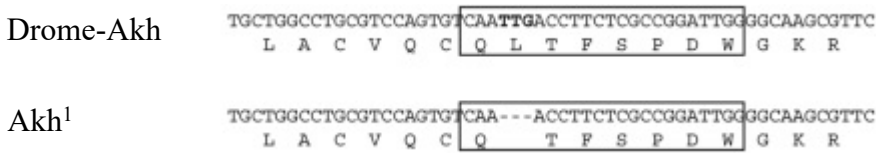


Obr. 8: Aparatura Bio-Dot microfiltration (Bio-Rad).

Do každé jamky bylo naneseno 100 µl roztoku PBS-T, aby se docílilo opětovného namočení membrány, které je nutné pro kompletní navázání antigenů na membránu. Pufr byl ihned odstraněn vakuem. Poté bylo do jamek aplikováno 50 µl naředěných peptidů (viz výše), které vlivem pasivní filtrace trvající cca 25 minut byly ukotveny k membráně. Následovala inkubace v blokovacím roztoku (3 % Bovine Serum Albumin v PBS-T) v objemu 250 µl na jamku, který po dobu 60 minut samovolně protekl membránou. Jamky byly pomocí vakua dvakrát promyty PBS-T. Bylo aplikováno 100 µl anti-Crz protilátky ředěné v blokovacím médiu v poměru 1:600 a ponecháno cca 30 minut, než samovolně proteklo membránou. Membrána byla třikrát promyta 250 µl PBS-T pomocí vakua a následně inkubována se 100 µl sekundární protilátky Goat anti-rabbit značené křenovou peroxidázou (Life Technologies) ředěné v poměru 1:1000 v blokovacím médiu, která pasivně protekla během 30 minut. Po opětovném promytí třikrát v PBS-T byla membrána vyjmuta z dotblotu a smočena v 0,05 M Tris-HCl (pH 7,6). K vizualizaci sekundární protilátky byl použit substrát křenové peroxidázy 3,3-diaminobenzidin tetrachlorid (DAB) v koncentraci 0,4 mg/ml v 0,05M Tris-HCl (pH 7,6) a 0.01 % peroxid vodíku jako katalyzátor. Po vytvoření barevného signálu byla membrána promyta v destilované vodě a usušena na vzduchu. K dokumentaci signálu byl využit skener CanoScan 4400F.

4. Výsledky

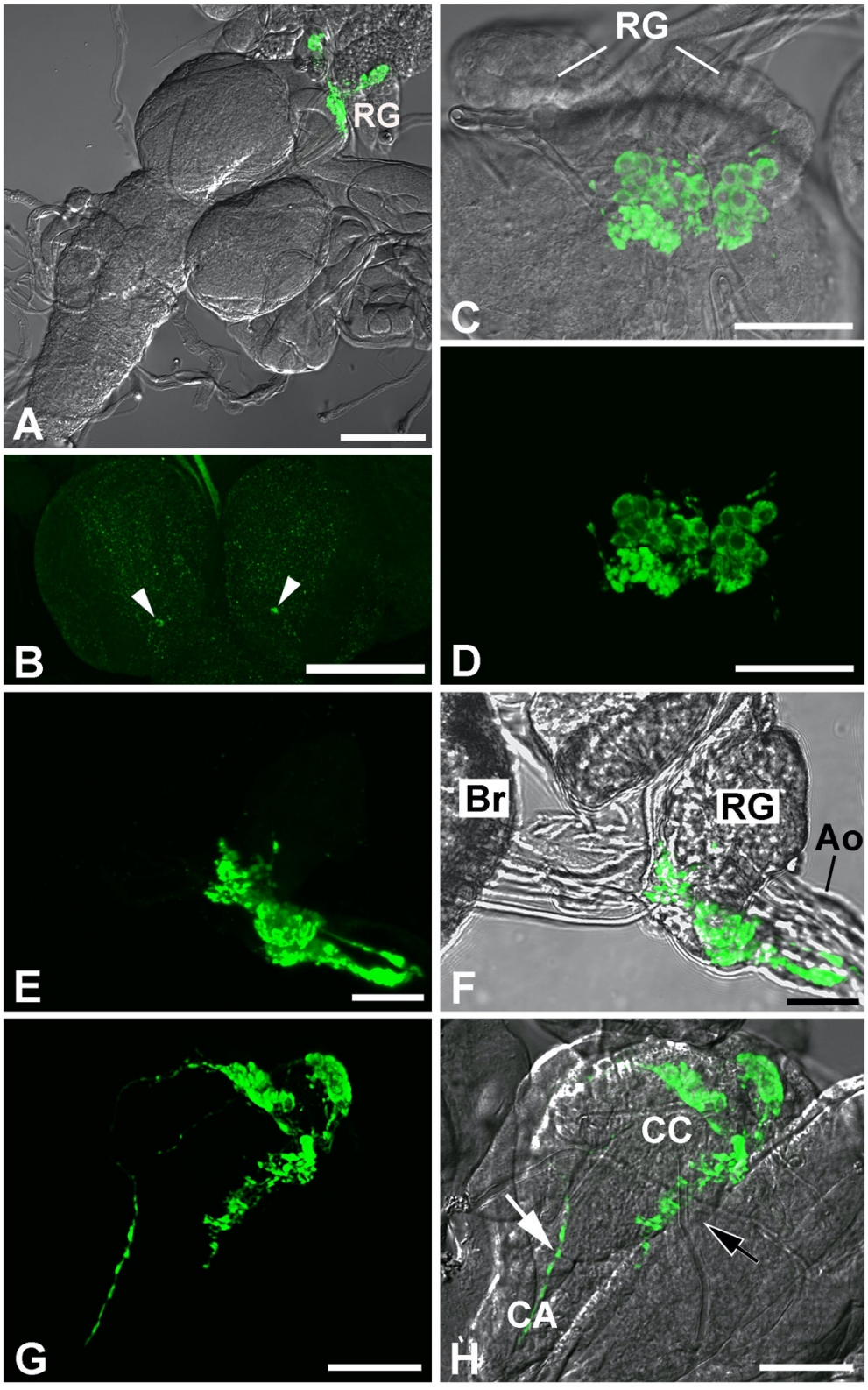
Pilotní experimenty srovnávající distribuci Akh a Crz v larválním mozku *D. melanogaster* mezi linií přírodní (w^{1118}) a mutantní pro Akh (Akh^1) ukázaly přítomnost Crz v buňkách kruhové žlázy v cytoplasmě buněk CC u Akh^1, zatímco u přírodního typu se v této oblasti nachází pouze axonální zakončení Crz-pozitivních neuronů ležících v laterálních oblastech mozku (Sehadová, Žurovec, nepublikovaná data). U mutanta Akh^1 byla provedena cílená mutageneze v genu pro tvorbu Akh vedoucí k deleci 3 bp vedoucí ke ztrátě druhé aminokyseliny (Leu) v původním oktapeptidu (Sajwan et al., 2015; Obr. 9). Homozygotní mutanti mají sníženou hladinu cukrů v hemolymfě a zvýšenou odolnost vůči hladovění, což odpovídá charakteristice pozorované při cíleném odstranění Akh-buněk (Lee a Park, 2004). Pro správnou interpretaci dat bylo nutné se dokonale seznámit s distribucí obou peptidů v larválním mozku *D. melanogaster* a ověřit získaná data s dostupnou literaturou.



Obr. 9: Porovnání sekvencí Akh u kontrolní linie typu wild type (Drome-Akh) a mutantní linie Akh^1. Nahoře je uvedena část cDNA příslušná k sekvenci aminokyselin níže. Sekvence kódující aktivní oktapeptid Akh je ohraničena rámečkem. Čárkovaně je značen deletovaný trinukleotid TTG kódující aminokyselinu leucin (Sajwan et al., 2015).

4.1 Distribuce Akh v larválním mozku *D. melanogaster*

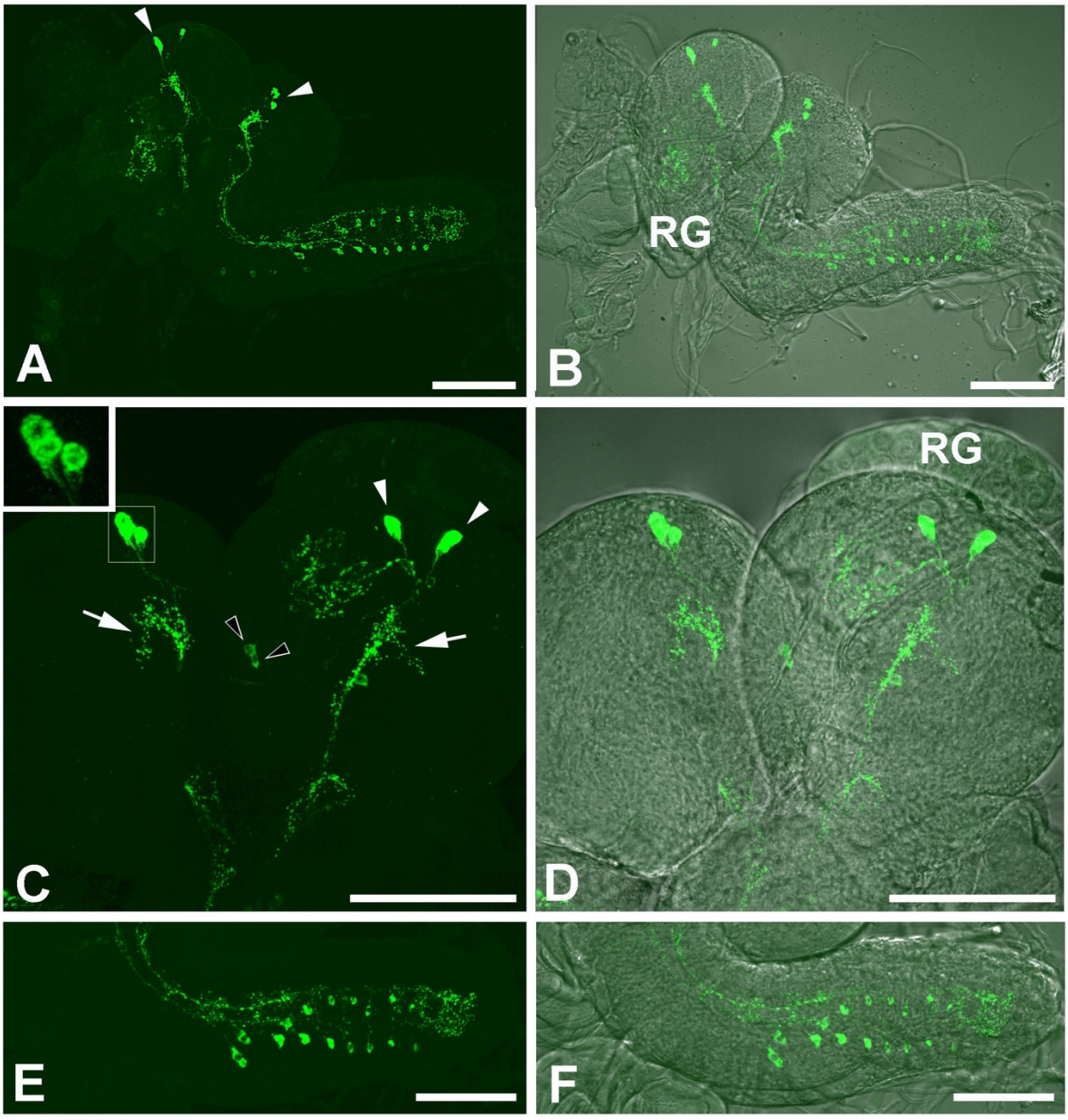
Protilátka proti Akh odhalila výrazný pozitivní signál v kruhové žláze, kde se nachází dvě bilaterální skupiny 7 neuronů v oblasti CC přiléhající k mozku (Obr. 10 A, C, D). Z těchto neuronů vybíhají 2 svazky axonů: kratší jdoucí frontálně směrem k centrálnímu mozku a delší posteriorní svazek inervující aortu (Obr. 10 E – H). Ojediněle byly zaznamenány axony vedoucí z CC přes prothorakální žlázy do CA (bílá šipka v Obr. 10 H). V centrálním mozku byl zaznamenán slabší signál v 1 páru bilaterálních neuronů v oblasti mediálního deutocerebra (Obr. 10 B).



Obr. 10: Imunodetekce Akh v corpora cardiaca u larev *D. melanogaster*. A Skupina 7 bilaterálních neuronů v kruhové žláze a jejich axonální procesy. **B** Pár bilaterálních neuronů v mediálním deutocerebru. **C, D** Detailní pohled na buňky v corpora cardiaca (CC). Kombinace fluorescenčního signálu (D) s obrazem z procházejícího světla (C). **E, F** Nervové dráhy inervující aortu. Fluorescenční signál (E) v kombinaci s obrazem z procházejícího světla (F). **G, H** Bílá šipka ukazuje na nervové dráhy vedoucí z CC do corpora allata (CA), černá šipka značí axonální procesy k mozku a k aortě. Br, mozek; RG, kruhová žláza; Ao, aorta. Měřítko v A, B je 100 µm; v C, D, E, F 20 µm; v G, H 50 µm.

4.2 Distrubuce Crz v larválním mozku *D. melanogaster*

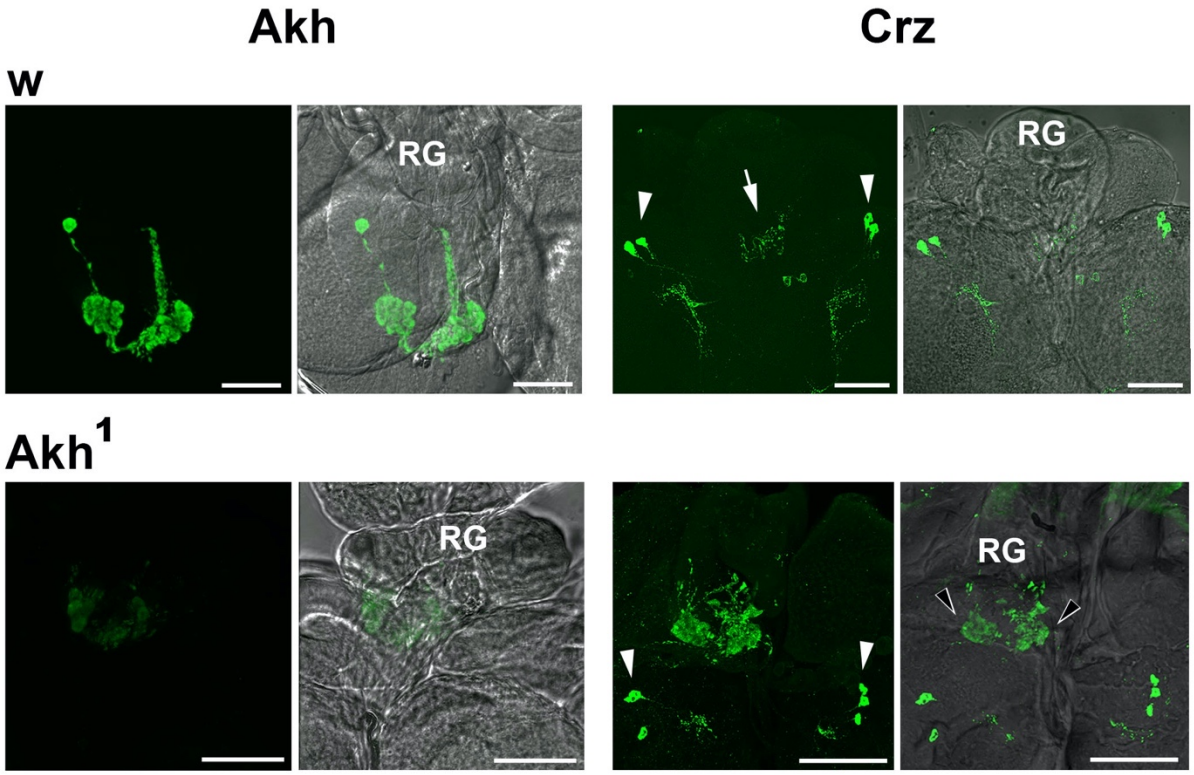
Protilátka proti Crz značí neurony v centrálním mozku a ve ventrálním nervovém gangliu (Obr. 11). V centrálním mozku se nachází bilaterální skupina 3 neuronů v oblasti dorsolaterálního protocerebra a pár slabě značených bilaterálních buněk v mediální oblasti protocerebra (Obr. 11 A – D). Axony vycházející z velkých dorsolaterálních neuronů se spojují v tenký nervový svazek běžící mediálně, který se dělí do 2 svazků. Jeden pokračuje do středové oblasti protocerebra, kde se spojuje s nervovými drahami vycházejících z kontralaterálních mediálních neuronů, stáčí se ventrálně a větví se v nadjícnové oblasti tritocerebra. Druhý svazek vybíhá anteriorně v medioventrálním směru a ve středové oblasti mozku se stáčí posteriodorsálně a ústí do kruhové žlázy. Zde se větví v oblasti CC (Obr. 11 C) a některé procesy vbíhají do oblasti prothorakální žlázy směrem k CA, jiné běží směrem k aortě. V abdominální části ventrálního ganglia leží 8 párů bilaterálních neuronů, jejichž axony tvoří síť komisur a konektiv dávají vznik 2 silným nervovým vláknům vedoucím dorsálně do centrálního mozku, kde se větví v oblasti mediálního protocerebra (Obr. 11 A, B, E, F).



Obr. 11: Imunodetekce Crz v mozku u larev *D. melanogaster*. A, B Celkový pohled na mozek s Crz-pozitivními buňkami a jejich procesy. **C, D** Detail Crz-imunoreaktivity v centrálním mozku a v kruhové žláze. Bílé šipky značí větvení nervových drah vybíhajících z nervového ganglia do mediálního protocerebra. Výřez z obrázku C značený rámečkem představuje detailní pohled na skupinu buněk dorsomediálního protocerebra. **E, F** Detail 8 bilaterálních párů neuronů v abdominální části ventrálního ganglia a jejich nervových procesů. Bílé hlavy šipek značí skupiny buněk v dorsolaterální oblasti protocerebra, černé hlavy šipek ukazují pár bilaterálních neuronů v mediálním protocerebru. Fotografie v levém sloupci ukazují fluorescenční signál, fotografie v pravém sloupci fluorescenční signál proložený s obrazem z procházejícího světla. RG, kruhová žláza; Měřítko v A, B, C, D je 50 μm, v E, F 100 μm.

4.3 Distribuce Akh a Crz u mutantní linie Akh^{1}

Po ověření specificity protilátek bylo možné přistoupit k testování distribuce Akh a Crz u mutantní linie Akh^{1}. Protilátka proti Akh rozpoznávala i mutovaný Akh^{1}, ale pozitivní signál byl v buňkách CC v porovnání s kontrolou výrazně slabší. Crz byl kromě své typické lokalizace detekován rovněž u většiny (ne-li u všech) buněk CC (Obr. 12).

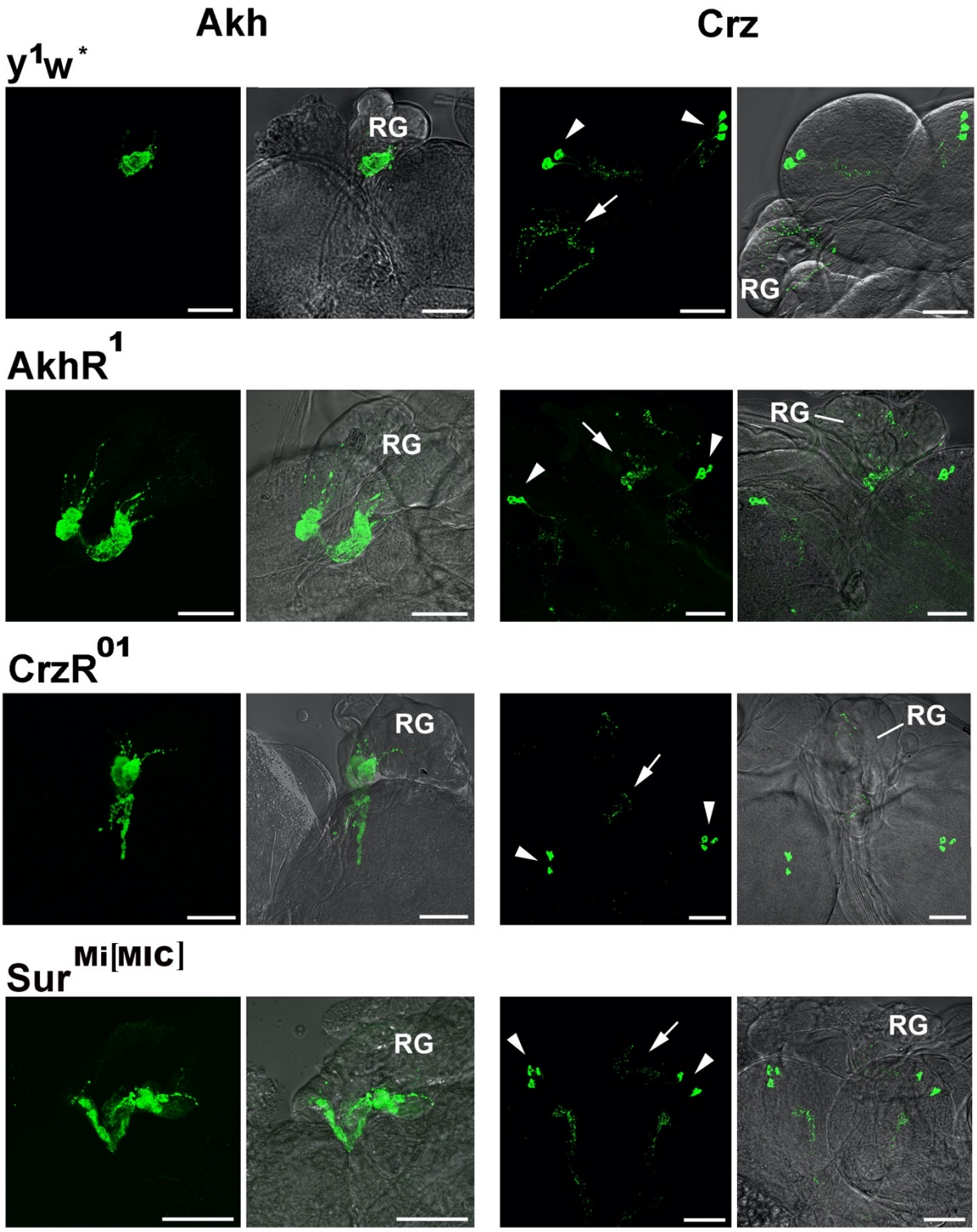


Obr. 12: **Distribuce Akh a Crz v mozku *D. melanogaster* mutantní v Akh^{1} a u kontrolní linie w^{1118}.** První a třetí sloupec ukazuje fluorescenční signál s Akh v kruhové žláze a Crz v dorsolaterálním protocerebru a v kruhové žláze, druhý a čtvrtý sloupec jsou tytéž snímky proložené obrazem v procházejícím světle. U linie Akh^{1} byl Crz atypicky detekován v buňkách kruhové žlázy (černé hlavy šipek). Bílé hlavy šipek značí Crz-pozitivní neurony v dorsolaterálním protocerebru, bílá šipka ukazuje na Crz-pozitivní nervové procesy v kruhové žláze (RG). Měřítko 50 µm.

4.3.1 Jaká signální dráha vyvolá tvorbu Crz v kruhové žláze?

Ke zjištění, jaká signální dráha je zapojena v kontrole produkce Crz kruhovou žlázou u Akh^1, bylo vytipováno několik mechanismů, které by zprostředkovaly informaci o přítomnosti nefunkčního Akh^1. Informace by mohla vést jednak přes Akh receptor, který by mutantní Akh^1 nebyl schopen rozpoznat a zvýšená hladina Akh^1 v hemolymfě by tak nevyvolala uvolnění cukrů z tukového tělesa. Vzhledem k blízké fylogenetické příbuznosti jak Akh a Crz, tak jejich receptorů, by změna v sekvenci Akh mohla vyvolat aktivaci receptoru pro Crz. Podobný účinek jako nefunkční AkhR by mohla vyvolat mutace v receptoru pro sulfonylureu, který za normálních podmínek reaguje na zvýšenou hladinu cukrů v hemolymfě. Na základě těchto předpokladů byla otestována distribuce Akh a Crz u linií mutantních v receptorech pro Akh, Crz a sulfonylureu ($AkhR^1$, $CrzR^{01}$, $Sur^{Mi[MIC]}$; podrobnější popis viz Materiál a metody). Souběžně byla provedena imunodetekce u kontrolních linií odpovídají genetickému pozadí jednotlivých mutantů, a to pozadí typu white (w^{1118}) pro mutaci v Akh receptoru a yellow white (y^1w^*) pro mutaci v receptorech pro Crz a sulfonylureu.

U žádného z mutantů nebyla zaznamenána výrazná změna v intenzitě Akh pozitivního signálu v porovnání s kontrolními liniemi. Ani v jedné mutantní linii nebyla potvrzena přítomnost Crz v buňkách CC (Obr. 13), přičemž celková distribuce Crz odpovídá kontrole.



Obr. 13: Distribuce Akh a Crz v mozku *D. melanogaster* mutantní v receptorech pro Akh (AkhR^{1}), Crz (Crz^{01}) a sulfonylureu (Sur$^{Mi[MIC]}$) a u kontrolní linie y^{1}w*. První a třetí sloupec ukazuje fluorescenční signál s Akh v kruhové žláze a Crz v dorsolaterálním protocerebru a v kruhové žláze, druhý a čtvrtý sloupec jsou tytéž snímky proložené obrazem v procházejícím světle. Bílé hlavy šipek značí Crz-pozitivní neurony v dorsolaterálním protocerebru, bílá šipka ukazuje na Crz-pozitivní nervové procesy v kruhové žláze (RG). Kontrola w^{1118} k linii AkhR^{1} je uvedena na Obr. 12. Měřítko 50 µm.

4.3.2 Může syntézu Crz v kruhové žláze vyvolat homozygotní mutace v Akh a receptoru pro Crz?

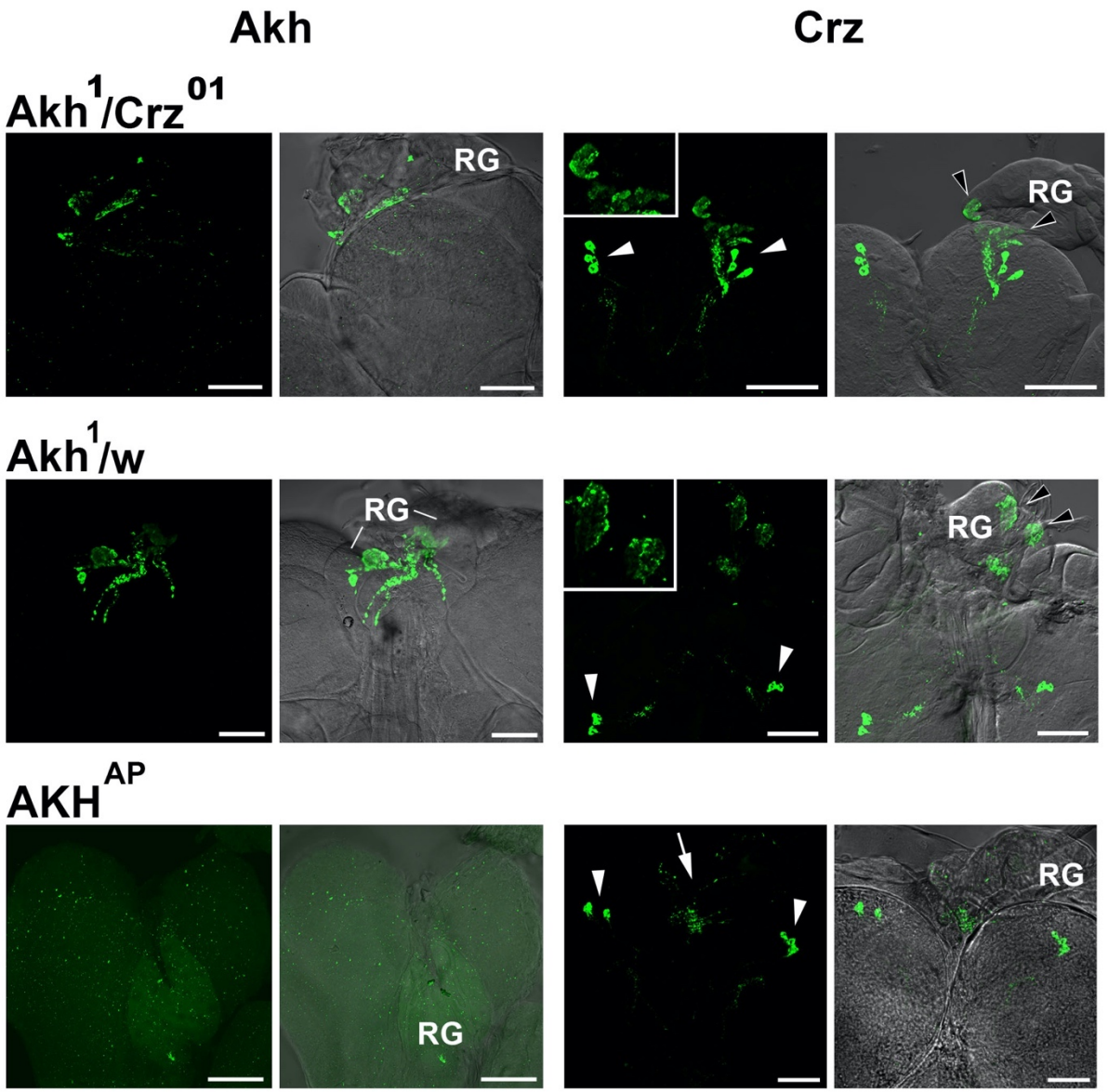
Pro souběžný výzkum v laboratoři prof. RNDr. M. Žurovce, CSc. byl připraven dvojný mutant (Svobodová, 2020) homozygotní pro mutaci v Akh a receptoru pro Crz (Akh^{1}, Crz^{01}). U tohoto mutanta by signální dráhy zahrnující Akh a Crz měly být nefunkční. Porovnání imunoreaktivity Akh a Crz dvojných mutantů a kontroly distribuci Crz v buňkách CC u dvojných mutantů.

Vzhledem k tomu, že u dvojných mutantů byla intenzita značení Crz-pozitivních buněk v buňkách kruhové žlázy srovnatelná s Akh^{1} mutantem (Obr. 14), neměla mutace v CrzR žádný vliv na regulaci hladiny Crz v kruhové žláze.

Zajímalo nás, zda i přítomnost mutace Akh^{1} v heterozygotní formě vyvolá podobný efekt. Tato linie byla připravena (Akh^{1}/w^{1118}) a otestována a imunodetekce Akh i Crz vykazovala stejný pattern, ale nižší intenzitu než u Akh^{1} homozygota a dvojného mutanta (Obr. 14).

4.3.3 Vyvolá nulová mutace Akh podobný efekt jako ztráta 1 aminokyseliny v Akh^{1}?

Následně byla otestována přítomnost a hladina Akh a Crz i v nulovém mutantovi Akh^{AP}. Dle očekávání nebyl u těchto mutantů detekován žádný Akh, ale překvapivě nebyl potvrzen ani výskyt Crz v buňkách kruhové žlázy. Z toho vyplývá, že distribuce Crz v kruhové žláze je typická pouze pro Akh^{1} mutanta.



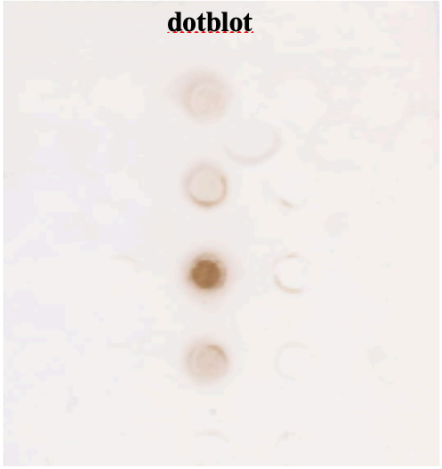
Obr. 14: Distribuce Akh a Crz v mozku *D. melanogaster* u mutantních linií Akh^1, Crz^{01}, Akh^1/w a Akh^{AP}. První a třetí sloupec ukazuje fluorescenční signál s Akh v kruhové žláze a Crz v dorsolaterálním protocerebru a v kruhové žláze, druhý a čtvrtý sloupec jsou tytéž snímky proložené obrazem v procházejícím světle. U linie Akh^1, Crz^{01} a Akh^1/w byl Crz atypicky detekován v buňkách kruhové žlázy (černé hlavy šipek). Bílé hlavy šipek značí Crz-pozitivní neurony v dorsolaterálním protocerebru, bílá šipka ukazuje na Crz-pozitivní nervové procesy v kruhové žláze (RG). Výřez ve třetím sloupci značený rámečkem představuje detailní pohled na skupinu Crz-pozitivních buněk v RG. Měřítko 50 μm.

Tab. I: Přehled výskytu Akh a Crz pozitivního signálu v CC u všech mutantních a kontrolních linií. Červeně je vyznačena změna distribuce Akh a Crz oproti kontrole. Závěry v tabulce jsou založeny na pozorování imunoreaktivity nejméně v 15 mozcích.

Linie	Distribuce v kruhové žláze	
	Akh	Crz
w^{1118}	Výrazný signál v neuronech	Výrazný signál v procesech
Akh^{1}	Slabý signál v neuronech	Výrazný signál v neuronech
$y^{1}w^{*}$	Výrazný signál v neuronech	Výrazný signál v procesech
$AkhR^{1}$	Výrazný signál v neuronech	Výrazný signál v procesech
$CrzR^{01}$	Výrazný signál v neuronech	Výrazný signál v procesech
$Sur^{Mi[MIC]}$	Výrazný signál v neuronech	Výrazný signál v procesech
Akh^{1}, Crz^{01}	Slabý signál v neuronech	Výrazný signál v neuronech
Akh^{1}/w	Slabý signál v neuronech	Výrazný signál v neuronech
Akh^{AP}	Žádný signál v neuronech	Výrazný signál v procesech

4.3.4 Vyloučení krosreaktivity protilátky proti Crz s Akh^{1}

Jelikož u nulového mutanta nebyla prokázána přítomnost Crz v kruhové žláze, bylo nutné vyloučit možnost, že protilátka proti Crz rozpoznává rovněž mutantní Akh^{1}. Z tohoto důvodu byla protilátkou proti Crz provedena detekce peptidů Drome-Akh, Akh^{1} a Crz na nitrocelulózové membráně technikou dotblot (Obr. 15). Jako kontrolní peptid byla použita část proteinu Timeless z *C. costata* o velikosti 13 aminokyselin. Imunodetekce na dotblotu odhalila výrazný signál s Crz v porovnání se všemi ostatními peptidy, kde byla síla výsledné enzymatické reakce srovnatelná s peptidem kontrolním. U těchto peptidů se pravděpodobně jedná pouze o pozadí způsobené formou detekce. Vzhledem ke srovnatelné intenzitě reakce Akh^{1} a Drome-Akh, lze říci, že protilátka proti Crz nevykazuje vyšší afinitu k mutovanému Akh^{1}.

Peptid	Sekvence	dotblot
Drome Akh	pQLTFSPDWa	
Akh[1]	pQTFSPDWa	
Crz	pQTFQYSRGWTNa	
Timeless	CTPRKTAEAISRK	

Obr. 15: Test imunoreaktivity protilátky proti Crz s peptidy Drome Akh, Akh[1] a Crz na nitrocelulózové membráně. Jako kontrolní peptid byla použita část proteinu Timeless s *C. costata*. U Akh[1] se delecí 2. aminokyseliny změní aminokyselinová sekvence tak, že se primární sekvence prvních 3 aminokyselin u Akh[1] a Crz shoduje.

5. Diskuze

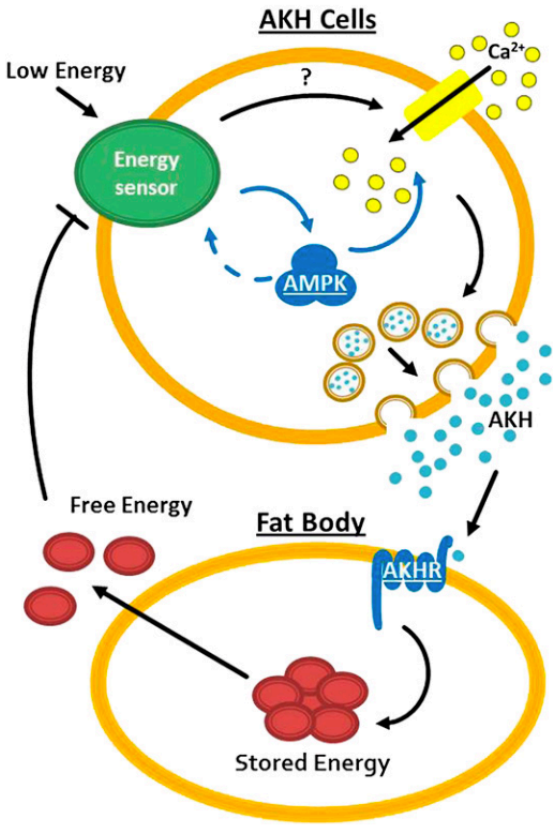
Adipokinetické hormony hrají klíčovou roli v regulaci metabolismu, zejména pak v mobilizaci energetických zásob během fyziologických procesů vyžadujících zvýšený přísun energie (Gäde a Auerswald, 2003). Akh je uvolňován v CC, odkud se dostává do hemolymfy a na cílové orgány působí přes receptory, které patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem (Staubli et al., 2002). U drosofilí linie mutantní v Akh (Akh^1) došlo ke snížení schopnosti uvolňování cukrů do hemolymfy, což zpomalilo katabolismus a jedinci se stávali odolnější vůči hladovění (Sajwan et al., 2015). Sledování distribuce Akh a příbuzného neuropeptidu Crz u Akh^1 odhalilo přítomnost Akh^1 i Crz v buňkách CC. Vzhledem k tomu, že Akh je produkováno v 7 bilatelárních buňkách, které představují většinu (ne-li všechny) buněk CC (Lee a Park, 2004), je Crz lokalizován v Akh-pozitivních buňkách.

Lokalizace Crz v neurosekretorických buňkách kruhové žlázy u *D. melanogaster* je velice překvapivá, proto byla distribuce obou peptidů porovnána s polohou pozitivního signálu u drosofilí linie přírodního typu. V našich experimentech byly použity protilátky, jejichž specificita byla důkladně ověřena v předchozích studiích (Park a Lee, 2004; Kim a Neufeld, 2015; Scopellity et al., 2019; Roller et al., 2003; Sehadová et al., 2006; Qi-Miao et al., 2003). U *D. melanogaster* přírodního typu imunodetekce Akh a Crz odpovídala publikovaným výsledkům, kde byla poloha Akh- a Crz-pozitivního signálu stanovena za použití protilátek z různých zdrojů popřípadě pomocí genetických markerů (Noyes et al., 1995; Kim a Rulifson, 2004; Isabel et al., 2004; Lee a Park, 2004; Choi et al., 2005, 2008; Veenstra, 1994; Lee et al., 2008). Jediným zjištěným rozdílem byla přítomnost slabě značené Akh pozitivní buňky ležící bilaterálně v mediálním deutocerebru. Tuto rozdílnost lze vysvětlit vyšší senzitivitou naší imunodetekce nebo navázáním protilátky na podobný epitop. Přítomnost Akh v neuronech mozku byla prokázána u několika hmyzích druhů jako *L. migratoria* (Schooneveld et al., 1985; Moshitzky et al., 1987; Bray et al., 1993), *Carausius morosus* a *Sarcophaga bullata* (Clottens et al., 1989), *P. apterus* (Kodrík et al., 2003; Kodrík et al., 2000) nebo *Aedes aegypti* (Kaufmann et al., 2009). U měkkýše *Aplysia californica* a švába *P. americana* byla přítomnost *Akh* mRNA v mozku odhalena pomocí RT-PCR (Johnson el al., 2014; Wicher et al., 2006).

Pro objasnění signální dráhy, která by mohla vyvolat neobvyklou produkci Crz v Akh-pozitivních buňkách, byla testována distribuce obou neuropeptidů u několika drosofilích linií mutantních v komponentech zapojených v Akh-signální dráze. Jedná se o komponenty, u kterých se předpokládá uplatnění v regulaci uvolňování Akh z neurosekretorických buněk a v recepci Akh jeho cílovými buňkami (Obr. 16).

Pro sekreci Akh z neurosekretorických buněk je potřeba přítomnost vnitřního energetického senzoru, který by koordinoval uvolňování Akh v závislosti na hladině trehalózy. Zatím není známo, o jaký typ senzoru se jedná. Byla prokázána souvislost tohoto mechanismu s AMP-aktivovanou-proteinovou kinázou (AMPK), která moduluje biofyzikální vlastnosti draselných kanálů (Braco et al., 2012). Předpokladem pro tuto hypotézu byla odezva vyvolaná snížením funkce AMPK (Johnson et al., 2010) nebo aplikací antagonisty draselného kanálu tolbutamidu, která se shodovala s fenotypem pozorovaným u jedinců, u kterých došlo k ablaci Akh-pozitivních buněk (Kim a Rulifson, 2004).

Jako energetický senzor v Akh buňkách byl navrhnut sulfonylureový receptor (Braco et al., 2012), který byl u *D. melanogaster* detekován v Akh-pozitivních buňkách a u savců byla prokázána jeho funkce v regulaci uvolňování glukagonu (Akh ekvivalentu) z buněk pankreatu. Na úrovni recepce Akh cílovými buňkami byla kromě Akh receptoru zvažována možnost zapojení receptoru pro Crz na základě toho, že se oba receptory nachází v buňkách tukového tělesa, patří do skupiny receptorů spřažených s G-proteinem a v průběhu evoluce došlo k jejich oddělení ze společného ancestrálního receptoru. Dokonce byla prokázána vzájemná vazba jak Akh, tak Crz ligandu na příbuzné receptory s větší afinitou obou ligandů k vlastnímu receptoru (Park et al., 2002).



Obr. 16: Model uvolňování Akh z neurosekretorických buněk zahrnující AMP-aktivovanou proteinovou kinázu (AMPK). Nízká hladina trehalózy vyvolá aktivaci AMPK dosud neznámým mechanismem, aktivace AMPK vyvolá zvýšenou hladinou Ca^{2+} kationtů v Akh-buňkách a vyvolá zvýšené uvolňování Akh do hemolymfy. Akh prostřednictvím receptoru stimuluje tukové těleso k uvolnění energetických zásob. To blokuje další sekreci Akh (Braco et al., 2012).

Regulace exprese Crz v buňkách CC u Akh^1 mutanta nezahrnuje žádnou z navržených komponent Akh-signální dráhy, protože ani u jedné z linií mutantních v receptoru pro Akh, Crz a sulfonylureu nebyl Crz v buňkách CC detekován. Crz-pozitivní signál v CC byl detekován pouze u dvojné mutace Akh^1, Crz^{01}. Vzhledem k tomu, že byla prokázána i u heterozygotní linie Akh^1/w^{1118} a zároveň nebyla potvrzena u nulového mutanta Akh^{AP} (Gáliková et al., 2015), lze usuzovat, že distribuce Crz v Akh-pozitivních buňkách je specifická pouze pro Akh^1 mutantní linii.

Možným vysvětlením by mohla být krosreaktivita protilátky proti Crz s Akh^1, kdy vlivem ztráty 2. aminokyseliny u Akh^1 mutanta dochází ke změně primární aminokyselinové sekvence Akh způsobem, kdy sekvence prvních 3 aminokyselin se u Akh^1 a Crz shoduje. Možnost krosreaktivity byla testována pomocí dotblotu, který nevykázal zvýšenou afinitu Crz k Akh^1 v porovnání s Drome-Akh. Nelze však vyloučit, že by protilátka proti Crz ve tkáni mohla reagovat rozdílně než při detekci na nitrocelulózové membráně.

Vzhledem k tomu, že se krosreaktivitu protilátku proti Crz nepodařilo prokázat, lze uvažovat o specifické roli Crz pouze v Akh^1 mutantech. Současné výzkumy porovnávající fyziologické projevy mutanta Akh^1, nulového Akh^{AP} mutanta a mutanta s ablací Akh buněk, kteří vykazují stejné množství cirkulujících sacharidů ukázal, že pokud by byl Crz exprimován v Akh buňkách, nemá vliv na okamžité uvolňování energetických zásob během zatížení organismu (Sajwan et al., 2015; Svobodová, 2020). Jediným pozorovaným rozdílem v chování Akh^1 a nulového mutanta Akh^{AP} byla délka přežití při hladovění. Akh^1 popřípadě $Akh^1/CrzR^{01}$ přežíval signifikantně delší dobu než nulový mutant. Crz by se tedy mohl uplatňovat v jiné signální dráze, která ovlivňuje zpomalení katabolických procesů, například snížením sekrece insulinu z CC do hemolymfy.

6. Závěr

Tato práce uvádí atypický výskyt neuropeptidu Crz v buňkách kruhové žlázy u linie *D. melanogaster* mutantní v Akh a testuje možné mechanismy regulující expresi Crz v těchto buňkách. Vylučuje zapojení receptorů pro Akh, Crz a sulfonylureu, u kterých se předpokládá úloha v uvolňování Akh z buněk kruhové žlázy a při recepci Akh cílovými buňkami. Specifická distribuce Crz v buňkách kruhové žlázy je typická pouze pro Akh^1 mutanta, kterému chybí 2. aminokyselina v jeho sekvenci, u nulového Akh mutanta nebyla potvrzena. Z toho lze usuzovat na pravděpodobnou krosreaktivitu protilátky proti Crz s Akh^1 peptidem, ale možnost jeho specifické funkce u Akh^1 mutantů nelze zcela vyloučit.

Práce je součástí většího projektu mapující účinek Akh^1 mutace (viz diplomová práce K. Svobodové, 2020) a přispívá k celkové specifikaci Akh^1 mutanta.

Při studiu této problematiky jsem se zdokonalila v imunodetekci proteinů ve tkáních a naučila se pracovat s konfokálním mikroskopem (Olympus) a zpracovat pořízenou fotodokumentaci v programech Adobe Photoshop (Adobe System) a Imaris (Bitplane).

7. Seznam použitých zkratek

ACP	peptid příbuzný adipokinetickému hormonu a corazoninu
Akh	adipokinetický hormon
Akh-AP	peptid asociovaný s Akh
AkhR	receptor pro adipokinetický hormon
ATP	adenosin trifosfát
CA	corpora allata
CAP	peptid asociovaný s corazoninem
CC	corpora cardiaca
cDNA	komplementární DNA
DL	dorsolaterální
CNS	centrální nervová soustava
Crz	corazonin
CrzR	receptor pro corazonin
DILPs	peptidy na bázi insulinu
DM	dorsomediální
Drome-Akh	adipokinetický hormon *Drosophily melanogaster*
GDP	guanosin difosfát
GnRH	gonadotropin-uvolňující hormon
GPCR	receptory spřažené s G-proteinem
GTP	guanosin trifosfát
IPC	insulin-produkující buňky
K_{ATP}	ATP-dependentní draselný kanál
K^{ATP}	ATP-sensitivní draselný kanál
Kir6.2	pór draselného kanálu
NSCs	neurosekretorické buňky
PB	fosfátový pufr
PB-T	fosfátový pufr s Tritonem X-100
PG	prothoracikotropní žláza
sNPF	krátký neuropeptid F
Sur	sulfonylureový receptor

8. Seznam použité literatury

Adamo S. A., Roberts J. L., Easy R. H., Ross N. W. 2008 Competition between immune function and lipid transport for the protein apolipophorin III leads to stress-induced immunosuppression in crickets. Journal of Experimental Biology 211 (4). pp. 531–538. DOI: 10.1242/jeb.013136

Ahmad M., He. L., Perrimon N. 2019. Regulation of insulin and adipokinetic hormone/glucagon production in flies. Wires Developmental Biology 9 (2). pp. 1 – 13. DOI: 10.1002/wdev.360

Ashcroft F. M., Harrison D. E., Ashcroft S. J. 1984. Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. Nature 312(5993). pp. 446-8. DOI: 10.1038/312446a0

Auerswald L., Gäde G., 1999 Effects of metabolic neuropeptides from insect corpora cardiaca on proline metabolism of the African fruit beetle, *Pachnoda sinuata*. Journal of Insect Physiology 45. pp. 535–543

Azeez O. I., Meintjes R., Chamunorwa J. P. 2014. Fat body, fat pad and adipose tissues in invertebrates and vertebrates: the nexus. Lipids in Health and Disease 13. pp. 71. DOI: 10.1186/1476-511X-13-71

Bednářová A., Kodrík D., Krishnan N. 2013 Unique roles of glucagon and glucagon-like peptides: Parallels in understanding the functions of adipokinetic hormones in stress responses in insects. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology. 164 (1). pp. 91–100. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.10.012

Beenakkers A. M. T. 1969. The influence of corpus allatum and corpus cardiacum on fatty acid metabolism in *Locusta migratoria* General and Comparative Endocrinology 13. pp. 492

Braco J. T., Gillespie E. L., Alberto G. E., Brenman J. E., Johnson E. C. Energy-Dependent Modulation of Glucagon-Like Signaling in Drosophila via the AMP-Activated Protein Kinase. Genetics 192. pp. 457–466

Bray M.M., Shafi S., Wheeler C.H. Goldsworthy G.J. 1993. Quantification by radioimmunoassay of the adipokinetic hormone-I in neural tissues in the head of *Locusta migratoria*. Comp. Biochem.Physiol. A 106. pp. 257-262.

Cazzamali G., Grimmelikhuijzen C.J., 2002. Molecular cloning and functional expression of the first insect FMRFamide receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 99 (19). pp. 12073–12078. DOI: 10.1073/pnas.192442799

Clottens F., Gäde G., Huybrechts R., De Loof A. 1989. Immunohistochemical localisation of the hypertrehalosemic hormone II (Cam-HrTH-II) and related peptides in the nervous system of *Carausius morosus* and *Sarcophaga bullata*. Cell Tissue Res. 258. pp. 631-636.

Gäde G., Auerswald L. 2003. Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. General and Comparative Endocrinology 132 (1). pp. 10–20. DOI: 10.1016/S0016-6480(03)00159-X

Gäde G., Marco H. G. 2013. "AKH-RPCH peptides". In: Kastin A. J. (eds), Handbook of Biologically Active Peptides. 2nd Edn. Elsevier. San Diego. pp. 185–190.

Gäde G., Marco H., Šimek P., Audsley N., Clark K. D., Weaver R. J. 2008. Predicted versus expressed adipokinetic hormones, and other small peptides from the corpus cardiacum–corpus allatum: A case study with beetles and moths. Elsevier 29 (7). pp. 1124–1139. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.03.002

Gäde M., Hoffmann K. H., Spring J. H. 1997. Hormonal Regulation in Insects: Facts, Gaps, and Future Directions. Physiological Reviews 77 (4). pp. 963-1032. DOI: 10.1152/physrev.1997.77.4.963

Gáliková M., Diesner M., Klepsatel P., Hehlert., Xu Y., Bickmeyer I., Predel R., Kühnlein R. P. 2015. Energy Homeostasis Control in DrosophilaAdipokinetic Hormone Mutants. Genetics Investigation 201. pp. 665–683. DOI: 10.1534/genetics.115.178897

Géminard Ch., Rulifson E. J., Léopold P. 2009. Remote Control of Insulin Secretin by Fat Cells in Drosophila. Cell Metabolism 10 (3). pp. 199–207. DOI: 10.1016/jcmet.2009.08.002

Geminard C., Arquier N., Layalle S., Bourouis M., Slaidina M., Delanoue R., Bjordal M., Ohanna M., Ma M., Colombani J., Leopold P. 2006. Control of metabolism and growth through insulin-like peptides in *Drosophila*. Diabetes 55 (2). pp. S5-S8

Grönke S., Müller G., Hirsch J., Fellert S., Andreou A., Haase T., Jäckle H., Kühnlein R. P. 2007. Dual Lipolytic Control of Body Fat Storage and Mobilization in *Drosophila*. PLoS Biology 5 (6). pp. 1248–1256

Hansen I. A., Sehnal F., Meyer S. R., Scheller K. 2001. Corazonin gene expression in the waxmoth *Galleria mellonella*. Insect Molecular Biology 10 (4). pp. 341–346. DOI: 10.1046/j.0962-1075.2001.00272.x

Hartenstein V.2006. The neuroendocrine system of invertebrates: a developmental and evolutionary perspective. Journal of Endocrinology 190 (3). pp. 555–570. DOI: 10.1677/joe.1.06964

Hauser F., Grimmelikhuijzen C. J. P. 2014. Evolution of the AKH/corazonin/ACP/GnRH receptor superfamily and their ligands in the Protostomia. General and Comparative Endocrinology 209. pp. 35–49. DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.07.009

Hua Y-J., Ishibashi J., Saito H., Tawfik A. I., Sakakibara M., Tanaka Y., Derua R., Waelkens E., Baggerman G., De Loof A., Schoofs L., Tanaka S. 2000. Identification of [Arg^{7}] corazonin in the silkworm, *Bombyx mori*, and the cricket, *Gryllus bimaculatus*, as a factor inducing dark color in an albino strain of the locust, *Locusta migratoria*. Journal of Insect Physiology 46. pp. 853–859

Hummon A. B., Richmond T. A., Verleyen P., Baggerman G., Huybrechts J., Ewing, M. A., Vierstraete E., Rodriguez-Zas S. L., Schoofs L., Robinson G. E., Sweedler J. V. 2006. From the genome to the proteome: uncovering peptides in the Apis brain. Science 314 (5759). pp. 647–649. DOI: 10.1126/science.1124128

Choi Y. J., Lee G., Hall J. C., Park J. H. 2005. Comparative analysis of Corazonin-encoding genes (Crz's) in *Drosophila* species and functional insights into Crz-expressing neurons. Journal of Comparative Neurology 482 (4). pp. 372–385. DOI: 10.1002/cne.20419

Choi Y. J., Lee G., Hall J. C., Park J. H. 2005. Comparative analysis of Corazonin-encoding genes (Crz's) in *Drosophila* species and functional insights into Crz-expressing neurons. Journal of Comparative Neurology. 482 (4). pp. 372–385. DOI: 10.1002/cne.20419

Inagaki N., Gonoi T., Clement J. P., IV Wang, C., Aguilar-Bryan L., Bryan J., Seino S. 1996. A family of sulfonylurea receptors determines the pharmacological properties of ATP-sensitive K^{+} channels. Neuron 16 (5). pp. 1011–1017. DOI: 10.1016/s0896-6273(00)80124-5

Inagaki N., Gonoi T., Clement J. P., Namba N., Inazawa J., Gonzalez G., Aguilar-Bryan L., Seino S., Bryan J. 1995. Reconstitution of IKATP: An Inward Rectifier Subunit Plus the Sulfonylurea Receptor. Science 270 (5239). pp. 1166 1170. DOI: 10.1126/science.270.5239.1166

Ishibashi J., Kataoka H., Nagasawa H., Isogai A., Suzuki A. 1992. Isolation and Identification of Adipokinetic Hormone of the Silkworm, *Bombyx mori*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 56 (1). pp. 66–70

Isomoto S., Kondo C., Yamada M., Matsumoto S., Higashiguchi O., Horio Y., Matsuzawa Y., Kurachi Y. 1996. A novel sulfonylurea receptor forms with BIR (Kir6.2) a smooth muscle type ATP-sensitive K^+ channel. Journal of Biogical Chemistry. 271 (40). pp. 24321–24324. DOI: 10.1074/jbc.271.40.24321

Johnson E. C., Kazgan N., Bretz C. A., Forsberg L. J., Hector C. E., Worthen R. J., Onyenwoke R., Brenman J. E. 2010. Altered metabolism and persistent starvation behaviors caused by reduced AMPK function in *Drosophila*. PloS one, 5(9). 12799. DOI: 10.1371/journal.pone.0012799

Johnson E. C., White M. P. 2009. Stressed-out insects: behavioral modifications and hormonal actions. In: Pfaff D. W., Arnold A. P., Etgen A. M., Fahrbach S. E., and Rubin R. T. (eds), Hormones, Brain and Behavior Vol. 2. 2nd Edn. Academic Press, San Diego, pp. 1069–1096

Johnson J. I., Kavanaugh S. I., Nguyen C., Tsai P-S. 2014. Localization and functional characterization of a novel adipokinetic hormone in the mollusk, *Aplysia californica*. PloS ONE 9(8)

Kapan N., Lushchak O. V., Luo J., Nässel D. R. 2012. Identified peptidergic neurons in the *Drosophila* brain regulate insulin-producing cells, stress responses and metabolism by coexpressed short neuropeptide F and corazonin. Cellular and molecular life sciences 69 (23). pp. 4051–4066. DOI: 10.1007/s00018-012-1097-z

Kaufmann C., Merzendorfer H., Gäde G. 2009. The adipokinetic hormone systém in Culicinae (Diptera: Cuilicidae): Molecular identification and characterization of two adipokinetic hormone (AKH) precursors from *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* and two receptor variants from *A. aegypti*. Insect Biochem. Mol. Biol. 39. pp. 770-781.

Kaun K. R., Chakaborty-Chatterjee M., Sokolowski M. B. 2008 Natural variation in plasticity of glucose homeostasis and food intake. Journal of Experimental Biology 211. pp. 3160–3166. DOI: 10.1242/jeb.010124

Kim J., Neufeld T. P. 2015. Dietary sugar promotes systemic TOR activation in *Drosophila* through AKH-dependent selective secretion of Dilp3. Nature Communications 6. pp. 1–10. DOI: 10.1038/ncomms7846

Kim S. G., Rulifson E. J. 2004. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila* corpora cardiaca cells. Nature 431. pp. 316–320. DOI: 10.1038/nature02897

Kim S. K., Rulifson E. J. 2004. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila* corpora cardiaca cells. Nature 431. pp. 316-320.

Kim Y. J., Spalovska-Valachova I., Cho K. H., Zitnanova I., Park Y., Adams M. E., Zitnan D. 2004. Corazonin receptor signaling in ecdysis initiation. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 101 (17). pp. 6704–6709. DOI: 10.1073/pnas.0305291101

Kodrík D., Socha R., Šimek P., Zemek R., Goldsworthy G. J. 2000 A new member of the AKH/RPCH family that stimulates locomotory activity in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). Insect Biochemistry and Molecular Biology 30 (6). pp. 489–498. DOI: 10.1016/S0965-1748(00)00025-4

Kodrík D. 2014. Hormony a hormonální řízení antistresové odpovědi u hmyzu. Živa. Academia (5). pp. 206-208.

Kodrík D., Socha R., Simek P., Zemek R., Goldsworthy G.J. 2000. A new member of the AKH/RPCH family that stimulates locomotory aktivity in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). Insect Biochem Mol. Biol. 30. pp. 489-498.

Kodrík D., Socha R., Syrová Z. 2003. Developmental and diel changes of adipokinetic hormone in CNS and haemolymph of the flightless wingpolymorphic bug, *Pyrrhocoris apterus*. J. Insect Physiol. 49. pp. 53-61.

Kodrík D., Vinokurov K., Tomčala A., Socha R. 2012. The effect of adipokinetic hormone on midgut characteristics in *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera). Elsevier 58 (1). pp. 194–204 DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.11.010

Lee G., Kim K., Kikuno K., Wang Z., Choi Y-J., Park J. H. 2008. Developmental regulation and functions of the expression of the neuropeptide corazonin in *Drosophila melanogaster*. Cell and Tissue Research 331. pp. 659–673 DOI: 10.1007/s00441-007-0549-5

Lee G., Park J. H. 2004. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone – encoding gene in *Drosophila melanogaster*. Genetics. 167 (1). pp. 311-323.

Lorenz M. W. 2003. Adipokinetic hormone inhibits the formation of energy stores and egg production in the cricket *Gryllus bimaculatus*. Comparative Biochemistry and

Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology. 136 (2). pp. 197–206. DOI: 10.1016/s1096-4959(03)00227-6

Mayer R. J., Candy D. J. 1969. Control of hemolymph lipid concentration during locust flight: an adipokinetic hormone from the corpora cardiaca Journal of Insect Physiology 15. pp. 611-620

Metaxakis A., Tain L. S., Grönke S., Hendrich O., Hinze Y., Birras U., Partridge L. 2014. Lowered insulin signalling ameliorates age-related sleep fragmentation in *Drosophila*. PLoS Biology 12 (4). DOI: 10.1371/journal.pbio.1001824

Miki T., Liss B., Minami K., Shiuchi T., Saraya A., Kashima Y., Horiuchi M., Ashcroft F., Minokoshi Y., Roeper J., Seino S. 2001. ATP-sensitive K^+ channels in the hypothalamus are essential for the maintenance of glucose homeostasis. Nature Neuroscience 4(5). pp. 507-512. DOI:10.1038/87455

Molnár Z., Balogh L., Kappelmayer J., Madar L., Gombos É., Balogh I. 2017. Congenital Hyperinsulinism Caused by a De Novo Mutation in the ABCC8 Gene – A Case Report. Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory medicine. 28 (1). pp. 85–91. PMCID: PMC5387702

Moshitzky P., Henzel W.J., Rafaeli A., Ramachandran J., Applebaum S.W. 1987. Synthesis of adipokinetic hormone (AKH-I) in the locust brain. Insect Biochem. 17. pp. 1133-1137.

Nagarkar-Jaiswal S., Lee P. T., Campbell M. E., Chen K., Anguiano-Zarate S., Gutierrez M. C., Busby T., Lin W. W., He Y., Schulze K. L., Booth B. W., Evans-Holm M., Venken K. J., Levis R. W., Spradling A. C., Hoskins R. A., Bellen H. J. 2015. A library of MiMICs allows tagging of genes and reversible, spatial and temporal knockdown of proteins in *Drosophila*. elife 4. DOI: 10.7554/eLife.05338. PMID: 25824290; PMCID: PMC4379497.

Nasonkin I., Alikasifoglu A., Ambrose C., Cahill P., Cheng M., Sarniak A., Egan M., Thomas P. M. 1999. A Novel Sulfonylurea Receptor Family Member Expressed in the Embryonic *Drosophila* Dorsal Vessel and Tracheal System. Journal of Biological Chemistry 274 (42). pp. 29420–29425. DOI: 10.1074/jbc.274.41.29420

Noyes B. E., Katz F. N., Schaffer M. H. 1995. Identification and expression of the *Drosophila* adipokinetic hormone gene. Molecular and Cellular Endocrinology 109 (2). pp. 133–141. DOI: 10.1016/0303-7207(95)03492-P

Oudejans R. C. H. M., Kooiman F. P., Heerma W., Versluis C., Slotboom A. J., Beenakkers M. T. 1991. Isolation and structure elucidation of a novel adipokinetic hormone

(Lom-AKH-III) from the glandular lobes of the corpus cardiacum of the migratory locust, *Locusta migratoria*. European Journal of Biochemistry 195 (2). pp. 351 - 359

Park Y., Kim Y. J., Adams M. E. 2002. Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A. 99 (17). pp. 11423–11428. DOI: 10.1073/pnas.162276199

Park Y., Kim Y. J., Adams M. E. 2002. Identification of G protein-coupled receptors for Drosophila PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99(17). pp. 11423–11428. DOI: 10.1073/pnas.162276199

Predel R., Neupert S., Russell W. K., Scheibner O., Nachman R. J. 2007. Corazonin in insects. Peptides 28 (1). pp. 3–10. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.10.011

Qi-Miao S., Tanaka S., Takeda M. Immunohistochemical localization of clock proteins (DBT and PER), and [His7]- and [Arg7]-corazonins in the cerebral ganglia of *Bombyx mori*: Are corazonins downstream regulators of circadian clocks?. European Journal of Entomology 100. pp. 283–286. ISSN 1210-5759

Roller L., Tanaka S., Kimura K., Satake H., Tanaka Y. 2006. Molecular cloning of [Thr^4, His^7]-corazonin (Apime-corazonin) and its distribution in the central nervous system of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera : Apidiae). Appl Entomol Zool 41. pp. 331–338

Roller L., Tanaka Y., Tanaka S. 2003. Corazonin and corazonin-like substances in the central nervous system of the Pterygote and Apterygote insects. Cell and Tissue Research 312 (3). pp. 393–406. DOI: 10.1007/s00441-003-0722-4

Rui L. 2014. Energy metabolism in the liver. Comprehensive Physiology 4 (1). pp. 177–197. DOI: 10.1002/cphy.c130024.

Sajwan S. Sidorov R., Stašková T., Žaloudíková A., Takasu Y., Kodrík D., Žurovec M. 2015. Targeted mutagenesis and functional analysis of adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 61. pp. 79 – 86. DOI: j.ibmb.2015.01.011

Saltiel A. R., Kahn C. R. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 414 (6865). pp. 799–806. DOI: 10.1038/414799a

Satake S., Masumura M., Ishizaki H., Nagata K., Kataoka H., Suzuki A., Mizoguchi A. 1997. Bombyxin, an insulin-related peptide of insects, reduces the major storage

carbohydrates in the silkworm *Bombyx mori*. Comparative Biochemistry and Physiology B 118 (2). pp. 349–357. DOI: 10.1016/s0305-0491(97)00166-1.

Scarborough R. M., Jamieson G. C., Kalish F., Kramer S. J., McEnroe G. A., Miller C. A., Schooley D. A. 1984. Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 81. pp. 5575–5579

Scopelliti A., Bauer Ch., Yu Y., Zhang T., Kruspig B., Murphy D. J., Vidal M., Maddocks O. D. K., Cordero J. B. 2019. Neuronal Relay Mediates a Nutrient Responsive Gut/Fat Body Axis Regulating Energy Homeostasis in Adult *Drosophila*. Cell Metabolism 29 (2). pp. 269–284. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.09.021

Sehadová H., Qi-Miao S., Sehnal F., Takeda M. Neurohormones as putative circadian clock output signals in the central nervous systém of two cricket species. Cell and Tissue Research 328. pp. 239–255. DOI: 10.1007/s00441-006-0339-5

Sha K., 2013. Functional Analysis of Corazonin and Its Receptor in *Drosophila melanogaster*, University of Tennessee, Knoxville, disertační práce

Sha K., Choi S-H., Im J., Lee G. G., Loeffler F., Park J. H. 2014. Regulation of Ethanol-Related Behavior and Ethanol Metabolism by the Corazonin Neurons and Corazonin Receptor in *Drosophila melanogaster*. PLoS One 9 (1). pp. 1–10.

Schaffer M. H., Noyes B. E., Slaughter C. A., Thorne G.C., Gaskell S. J. 1990. The fruitfly *Drosophila melanogaster* contains a novel charged adipokinetic-hormone-family peptide. The Biochemical Journal 269 (2). pp. 315–320. DOI: 10.1042/bj2690315

Schmeltz L., Metzger B. 2007. Diabetes/Syndrome X. In: Taylor J. B., Triggle D. J. (eds), Comprehensive Medicinal Chemistry II Vol 6, 2nd Edn. T Blackburn Helicon Therapeutics Inc, New York. pp. 417–458

Schooneveld H., Romberg-Privee H. M., Veenstra J. A. 1985. Adipokinetic hormone-immunoreactive peptide in the endocrine and central nervous sytem of several insect species: a comparative immunocytochemical approach. Gen Comp. Endocrinol. 57. pp. 184-194.

Siegert K., Morgan P., Mordue W. 1985. Primary structures of locust adipokinetic hormones II. Biological Chemistry Hoppe-seyler 366 (8). pp. 723–727 DOI: 10.1515/bchm3.1985.366.2.723

Staubli F., Jorgensen T. J., Cazzamali G., Williamson M., Lenz C., Sondergaard L., Roepstorff P., Grimmelikhuijzen C. J. 2002. Molecular identification of the insect

adipokinetic hormone receptors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99(6). pp. 3446–3451. DOI: 10.1073/pnas.052556499

Steele J. E. 1961. Occurrence of a hyperglycaemic factor in the corpus cardiacum of an insect. Nature 192. pp. 680-681

Stoffolano J. G., Croke K., Chambers J., Gäde G., Solari P., Liscia A. 2014 Role of Phote-HrTH (*Phormia terraenovae* hypertrehalosemic hormone) in modulating the supercontractile muscles of the crop of adult Phormia regina Meigen. Journal of Insect Physiology 71. pp. 147–155.

Stone J. V., Mordue W., Batley K. E., Morris H. R. 1976. Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight. Nature 263. pp. 207–211

Svobodová K., 2020. Účinek mutací v adipokinetickém hormonu a corazoninovém receptoru na metabolismus sacharidů a lipidů u *Drosophila melanogaster*. Přírodovědecká fakulta. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Diplomová práce.

Tanaka S., Zhu D. H., Hoste B., Breuer M., 2002 a. The dark-color inducing neuropeptide, [His(7)]-corazonin, causes a shift in morphometic characteristics towards the gregarious phase in isolated-reared (solitarious) *Locusta migratoria*. Journal of Insect Physiology 48 (11). pp. 1065–1074. DOI: 10.1016/s0022-1910(02)00199-3

Tanaka Y., Hua Y., Roller L., Tanaka S., 2002 b. Corazonin reduces the spinning rate in the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Physiology. 48 (7). pp. 707–714. DOI: 10.1016/S0022-1910(02)00094-X

Van der Horst D. J. 2003. Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology 136(2). pp. 217–226 DOI: 10.1016/s1096-4959(03)00151-9

Van der Horst D. J., Van Marrewijk W. J., Diederen J. H. 2001. Adipokinetic hormones of insect: release, signal transduction, and responses. International Review of Cytology 211. pp. 179-240. DOI: 10.1016/s0074-7696(01)11019

Veenstra J. 1991. Presence of corazonin in three insect species, and isolation and identification of [His^7] corazonin from *Schistocerca americana*. Peptides 12 (6). pp. 1285–1289. DOI: 10.1016/0196-9781(91)90208-7

Veenstra J. A. 1989. Isolation and structure of corazonin, a cardioactive peptide from the american cockroach. FEBS Letters 250 (2). pp. 231–34. DOI: 10.1016/0014-5793(89)80727-6

Veenstra J. A. 1994. Isolation and Structure of the *Drosophila* Corazonin Gene. Biochemical and biophysical research communications 204 (1). pp. 292-6. DOI: 10.1006/bbrc.1994.2458

Veenstra J. A. 2009. Does corazonin signal nutritional stress in insects? Insect Biochemistry and Molecular Biology 39 (11). pp. 755–762. DOI: 10.1016/j.ibmn.2009.09.008

Velasco B., Erclik T., Shy D., Sclafani J., Lipshitz H., McIness R., Hartenstein V. 2007. Specification and development of the pars intercerebralis and pars lateralis, neuroendocrine command centers in the *Drosophila* brain. Elsevier 302 (1). pp. 309–323. DOI: 10.1016/j.ydbio.2006.09.035

Verleyen P., Baggerman G., Mertens I., Vandersmissen T., Huybrechts J., Van Lommel A., De Loof A., Schoofs L. 2006. Cloning and characterization of a third isoform of corazonin in the honey bee Apis mellifera. Peptides 27 (3). pp. 493–9. DOI: 10.1016/j.peptides.2005.03.065

Vinokurov K., Bednářová A., Tomčala A., Stašková T., Krishnan N., Kodrík D. 2014 Role of adipokinetic hormone in stimulation of salivary gland activities: the fire bug *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera) as a model species. Journal of Insect Physiology 60. pp. 58–67. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2013.11.005

Wang S., Tulina N., Carlin D. L., Rulifson E. J. 2007. The origin of islet-like cells in Drosophila identifies parallels to the vertebrate encocrine axis. axisProceedings of the National Academy of Sciences 104 (50). pp. 19873–19878. DOI: 10.1073/pnas.0707465104

Wicher, D., Agricola, H. J. Sohler, S., Gundel, M., Heinemann, S.H. Wollweber, L., Stengl M., Derst C., 2006. Diffrential receptor activation by cockroach adipokinetic hormons produces diferential effects on ion currents, neuronal activity, and locomotion. J. Neurophysiol. 95. pp. 2314-2325.

Wu Q., Brown M. R. 2006. Signaling and function of insulin-like peptides in insects. Annual Review of Entomology 51. pp. 1–24. DOI: 10.1146/annurev.ento.51.110104.151011

Zandawala M., Nguyen T., Johard H. A. D., Amcoff M., Paluzzi J-P., Nässel D. R. 2019. Corazonin neuroendocrine patrhway orchestrates stress-associated physiology in Drosophila. Biorxiv, DOI: 10.1101/522441

Ziegler R., Eckhart K., Schwarz H., Keller R. 1985. Amino acid sequence of *Manduca sexta* adipokinetic hormone elucidated by combined fast atom bombardment (FAB)/Tandem mass spektrometry. Biochemical and Biophysical Research Communications 133 (1). pp. 337–342.

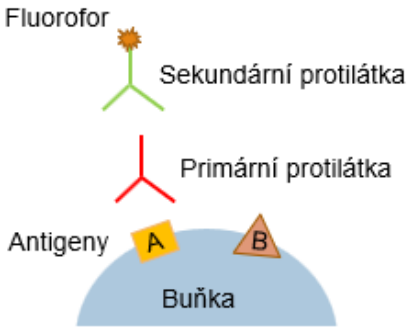
9. Přílohy

Příloha 1 Imunohistochemické značení neuropeptidů

Princip této metody je založen na imunologické detekci antigenu ve tkáních pomocí protilátky, tzv. primární protilátky, která se specificky váže na cílový antigen, proti kterému byla vytvořena (Kabiraj et al. 2015). Před aplikací primární protilátky je nutné zablokovat vazebná místa ostatních proteinů, aby se protilátka navázala pouze na svůj specifický antigen. Toho je dosaženo inkubací tkáně s tzv. normálním sérem, které pochází z jiného druhu zvířete než primární protilátka. Váže se ke snadno reaktivním nespecifickým místům a tím zabraňuje vazbě protilátky na tato místa.
(https://www.biomedscidirect.com/journalfiles/IJBMRF20151859/principle_and_techniques_of_immunohistochemistry_a_review.pdf)

Navázanou primární protilátku je nutné zviditelnit pomocí markeru jako jsou například fluorescenční barviva (pro pozorování ve fluorescenčním mikroskopu), enzymy (pro pozorování v optickém mikroskopu) nebo se využívá značení koloidním zlatem (v elektronové mikroskopii). Tyto značky se vážou buď přímo na primární protilátku nebo nepřímo na protilátku sekundární, která je namířena proti imunoglobulinům zvířete, ze kterého byla získána primární protilátka. Na základě toho se metody imunohistochemie rozdělují na přímé a nepřímé. Nepřímá metoda (Obr. 17) jednak zvyšuje citlivost vzhledem k vyššímu počtu molekul markerů navázaných na antigen a jednak proces usnadňuje, jelikož je třeba připravovat poměrně málo typů protilátek s navázaným markerem. Používá se proto častěji (Beranová a Toran, 2002).

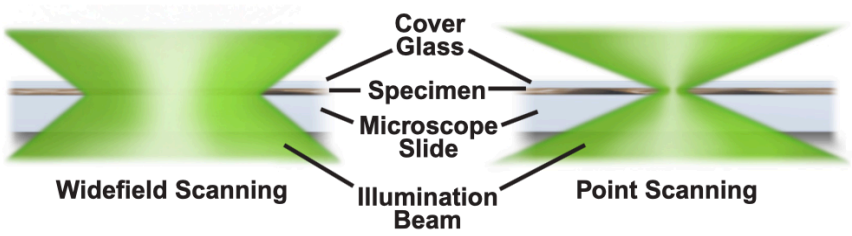
Ke značení protilátek se nejčastěji využívají fluorofory, které jsou k protilátkám kovalentně připojeny. Jejich vlastnosti týkající se rychlé odezvy po excitaci intenzivním zdrojem světla umožňují pozorování ve fluorescenčním a konfokálním mikroskopu.
(http://histologie.lfp.cuni.cz/education/guides/ihc_hi_res.pdf)



Obr. 17: Princip nepřímé (dvoustupňové) imunohistochemické metody. Primární protilátka (červeně) se specificky váže na antigen A a je zviditelněna pomocí sekundární protilátky (zeleně) označené fluoroforem.

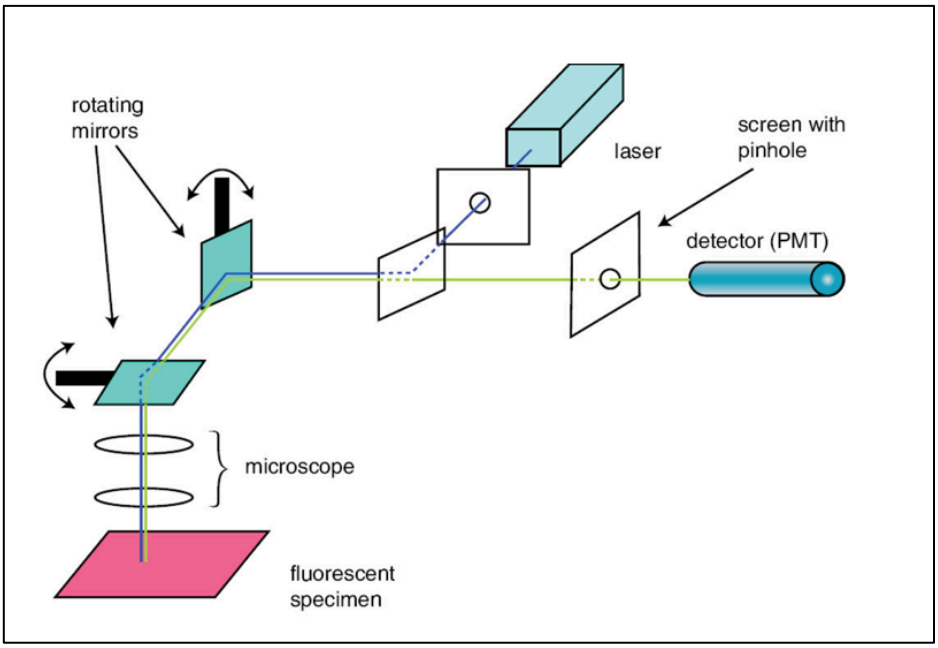
Příloha 2 Princip konfokální mikroskopie

Konfokální mikroskopie nabízí oproti konvenční optické mikroskopii několik výhod, jako je malá hloubka ostrosti nebo schopnost sbírat sériové optické vrstvy ze silnějších vzorků. Co ale způsobilo obrovskou popularitu této zobrazovací techniky a její široké využití, je schopnost odstranit neostrý fluorescenční signál. Ten vzniká ve fluorescenční mikroskopii samovolně v důsledku toho, že vzorek je zcela osvětlen excitačním zářením, takže celý vzorek vykazuje fluorescenci, tedy i část mimo oblast našeho zájmu. Dochází tedy k interferenci rozlišení mezi jednotlivými body vzorku, která se projeví jako neostré fluorescenční pozadí. U konfokální mikroskopie je tato nevýhoda odstraněna přítomností bodové clonky (konfokální pinhole), která je konjugována s fokálním (ohniskovým) bodem vzorku a ten je potom excitován (Paddock et al., 2020).



Obr 18. Celoplošné ozáření vzorku v klasické fluorescenční mikroskopii v porovnání s bodovým osvětlením v konfokální mikroskopii. V konvenčním širokoúhlém mikroskopu je vzorek osvětlován celý a obraz lze poté pozorovat přímo okem nebo po promítnutí na zařízení pro snímání obrazu. Naproti tomu v konfokálním mikroskopu je obraz získán zaostřením jednoho nebo více paprsků laseru do fokálního bodu čočky. Obrazy vytvořené skenováním vzorku tímto způsobem se nazývají optické vrstvy (Paddock et al., 2020).
Převzato z: https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/introductory-confocal-concepts

V současné době je komerčně k dispozici několik typů konfokálních mikroskopů, které se liší uspořádáním a typem skenovacího zařízení. Nejčastější je laserový rastrovací konfokální mikroskop (LSCM, Laser Scanning Confocal Microscope), u kterého je skenovací zařízení schopno skenovat bod po bodu napříč vzorkem (prostřednictvím bodové clonky). Ohnisko laseru je směrováno dvoudimenzionálně (v ose X a Y) pomocí 2 pohyblivých zrcadel (Obr. 19). Tím je zajištěno postupné osvícení celého vzorku v jedné optické vrstvě (při malé hloubce ostrosti) a postupným sbíráním mnoha takových obrazů z jednotlivých optických vrstev může být zrekonstruován trojrozměrný obraz vzorku (Paddock et al., 2020).
(https://www.microscopyu.com/techniques/confocal/introductory-confocal-concepts)



Obr. 19: Schéma laserového rastrovacího konfokálního mikroskopu. Laser (modře) se přes bodovou clonku odráží od dichroického zrcátka na 2 otočná řádkovací zrcadla, která posouvají laser napříč vzorkem v osách X a Y. Daný bod ve fluorescenčním vzorku se excituje a při návratu do klidového stavu emituje fluorescenční záření (zeleně). To zaujímá stejnou optickou cestu jako excitační záření z laseru (tzn. přes obě řádkovací zrcadla), nicméně jeho vyšší vlnová délka umožňuje jeho průchod dichroickým zrcátkem přes bodovou clonku (screen with pinhole) až na detektor, kterým je fotonásobič (PMT).
Převzato z: https://cse.lmu.edu/research/instrumentsandfacilities/confocalmicroscopecm/

Příloha 3 Příprava použitých roztoků

10x Fosfátový pufr (PB), 1M, pH 7,4

Připravit: 1M roztoku $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ (roztok 1)
1M roztoku $NaH_2PO_4 \cdot 2\ H_2O$ (roztok 2)

Zásobní 1M roztok PB byl připraven postupným přiléváním cca 100 ml roztoku 2 do 400 ml roztoku 1 k ustálení pH na hodnotě 7,4.

1x Fosfátový pufr (PB) s Tritonem X 100 (PB-T)

25 ml	zásobního roztoku 10x PB, pH 7,4
1,25 ml	0,5 % Tritonu X–100
Do 250 ml	destilovaná voda

Fyziologický roztok pufrovaný fosfáty (PBS) 1 M, pH 7,4

12,2g	hydrogen fosforečnanu sodného (Na_2HPO_4; 8,55 mM)
1,7 g	dihydrogen fosforečnanu sodného (NaH2PO4; 1,45 mM)
85 g	chloridu sodného (NaCl; 145 mM)
5 g	azidu sodného (NaN3)
1 l	destilované vody (H2O)

Pracovní roztok PBS pufru je 0,1 M s pH 7,4

1x Fyziologický roztok pufrovaný fosfáty (PBS) s Tweenem (PBS-T)

50 ml	Zásobního roztoku 10x PBS, pH 7,4
0,25 ml	0,05 % Tweenu 20
Do 500 ml	destilovaná voda