

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

**Přírodovědecká fakulta**

**Funkce adipokinetických hormonů  
v metabolismu hmyzích lipidů**

Doktorská disertační práce

Mgr. Iva Bártů

Školitel: Doc. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.

BC AVČR, Entomologický ústav

České Budějovice

2010

**Bártů I. (2010):** Funkce adipokinetických hormonů v metabolismu hmyzích lipidů (A role of adipokinetic hormones in insect lipid metabolism). – 49 s., Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, České Budějovice, Česká republika, Doktorská disertační práce.

**Anotace:**

Tato disertační práce shrnuje vliv adipokinetických hormonů (AKH) na spektrum mobilizovaných lipidů u modelových druhů *Locusta migratoria* a *Pyrrhocoris apterus*. Její výsledky přispívají k řešení problematiky, proč mají některé druhy hmyzu více než jeden AKH. Mobilizace jednotlivých diacylglycerolů a mastných kyselin z tukového tělesa není uniformní a je zde pozorována určitá specifická jednotlivých AKH. Práce studuje také vztah AKH k lipidovému metabolismu ve stresové situaci vyvolané působením insekticidu. Koaplikace AKH a insekticidu zesiluje účinek daného insekticidu.

This PhD. thesis summarizes the effect of adipokinetic hormones (AKHs) on a spectrum of mobilized lipids in model insect species the locust *Locusta migratoria* and the firebug *Pyrrhocoris apterus*. The results revealed that mobilization of diacylglycerols and fatty acids from the fat body into the haemolymph is not uniform and suggested there is partial specificity of individual AKHs. This could contribute to the answer of the question why some insect species have more than one AKH. The results of the thesis are supplemented by studies of AKH effect on lipid metabolism in stress conditions elicited by insecticide treatments. Co-application of AKH and insecticide enhanced the effect of insecticide.

**Finanční podpora:**

Tato práce byla financována z grantů 522/07/0788 a P501/10/1215 Grantové agentury České Republiky (DK).

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že svoji disertační 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 disertační práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 4.8.2010

.....

Iva Bártů

**Prohlášení spoluautorů:**

Prohlašujeme, že se Iva Bártů podstatným způsobem podílela na uvedených publikacích:

**Bártů I., Tomčala A., Socha R., Šimek P., Kodrík D.** (2010) Analysis of lipids mobilized by adipokinetic hormones in the firebug *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) *Eur. J. Entomol.* 107: (in press).

**Kodrík D., Bártů I., Socha R.** (2010) Adipokinetic hormone (Pyrap-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Pest Manag. Sci.* 66: 425-431.

**Tomčala A., Bártů I., Šimek P., Kodrík D.** (2010) Locust adipokinetic hormones mobilize diacylglycerols selectively. *Comp. Biochem. Phys. B* 156: 26-37.

Doc. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc. ....

RNDr. Radomír Socha, DrSc. ....

RNDr. Petr Šimek CSc. ....

RNDr. Aleš Tomčala PhD. ....

**Poděkování:**

Touto cestou bych chtěla poděkovat svému školiteli, Daliborovi Kodříkovi, za odborné vedení, cenné rady a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat všem spoluautorům publikací Alíkovi Tomčalovi, Radomiru Sochovi a Petru Šimkovi a také kolektivu v laboratoři – Janičce Zralé, Josefu Večeřovi a Pavlu Jedličkovi. Mé poděkování patří také rodině a kamarádům.

# Životopis:

**Iva Bártů**

**Datum narození:** 6. 7. 1982

## **Vzdělání a související praxe:**

### **2001-2004:**

Bakalářské studium - Biomedicínská laboratorní technika, Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Téma bakalářské práce: Účinek AKH u makropterních a brachypterních samců *P. apterus*

### **2004-2006:**

Magisterské studium - Klinická biologie, Biologická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Téma magisterské práce: Vzájemné ovlivňování funkcí adipokinetického a juvenilního hormonu u plošnice *P. apterus*

### **2006-2010:**

Doktorské studium – Fyziologie a vývojová biologie živočichů, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Doktorand - Biologické centrum AVCR, Entomologický ústav

## **Publikace:**

**Bártů I., Tomčala A., Socha R., Šimek P., Kodrík D.** (2010) Analysis of lipids mobilized by adipokinetic hormones in the firebug *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) *Eur. J. Entomol.* 107: (in press).

**Kodrík D., Bártů I., Socha R.** (2010) Adipokinetic hormone (Pyrap-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Pest Manag. Sci.* 66: 425-431.

**Tomčala A., Bártů I., Šimek P., Kodrík D.** (2010) Locust adipokinetic hormones mobilize diacylglycerols selectively. *Comp. Biochem. Phys. B* 156: 26-37.

### **Další vědecké výstupy:**

**Bártů I., Tomčala A., Šimek P., Kodrík D.** (2010) Hormonal control of insect lipid metabolism. *86th Physiological Days - Conference of Czech and Slovak Physiological Society - Endocrinology, Prague, Czech Republic, February 9 - 11*,: p. 28.

**Bártů I., Tomčala A., Šimek P., Kodrík D.** (2009) Preferences in mobilization of locust haemolymph lipids after the Locmi-AKHs treatment *VIth International Conference on Arthropods: Chemical, Physiological and Environmental Aspects, Ochotnica Dolna, Poland, June 21-26*,: P-4, 46.

**Kodrík D., Bártů I, Socha R.** (2009) Adipokinetic hormone increases effectivity of insecticide permethrin via stimulation of metabolic activity. *VIth International Conference on Arthropods: Chemical, Physiological and Environmental Aspects, Ochotnica Dolna, Poland, June 21-26*,: P-5, 47.

**Bártů I., Tomčala A., Šimek P., Kodrík D.** (2008) ESI-MS characterization of locust haemolymph lipids mobilized by the Locmi-AKH-I. *24th Conference of European Comparative Endocrinologists, Genoa, Italy, September 2 - 6*,: pp. 2-96.

**Bártů I., Kodrík D.** (2007) Adipokinetic a juvenilní hormony u hmyzu 83. *Fyziologické dny, Brno, 6.- 8. února, Endokrinologie II, p15b.*

**Bártů I., Tomčala A., Šimek P., Kodrík D.** (2007) Characterization of insect haemolymph lipids mobilized by adipokinetic hormones. *Vth International Conference on Arthropods: Chemical, Physiological and Environmental Aspects, Bialka Tatraska, Poland, September 16-21*,: P33.

**Tomčala A., Košťál V., Šimek P., Bártů I., Kodrík D.** (2007) Focused insect lipidomics: solution of physiological questions by liquid chromatography and electrospray quadrupole ion trap mass spectrometry. *Vth International Conference on Arthropods: Chemical, Physiological and Environmental Aspects, Bialka Tatraska, Poland, September 16-21*,: P-36.

**Bártů I., Patočková M., Kodrík D.** (2006) JHa – methoprene modifies adipokinetic hormone characteristics in bugs (Heteroptera, Insecta). *23rd Conference of European Comparative Endocrinologists, Manchester (UK) 29 August - 2 September, P032*,: pp.86.

**Bártů I., Patočková M., Kodrík D.** (2006) Hmyzí adipokinetické peptidy a analogy juvenilního hormonu. 82. *Fyziologické dny, Praha, 7.- 9. února, Endokrinologie-P14*, p 23.

**Patočková M., Bártů I., Kodrík D.** (2005) Interaction of adipokinetic peptides and a juvenoid in bugs. *Biologically Active Peptides IX., Praha, Czech Republic, April 20 - 22, Abstract No. 31.*

**Patočková M., Bártů I., Kodrík D.** (2005) Interaction of adipokinetic peptides and a juvenoid in bugs. *Collection Symposium Series - Biologically Active Peptides IX., (ed. Slaninová J.), Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic 8: 56-58.*



## Obsah

1. Lipidy .....	1
2. Metabolismus hmyzích lipidů.....	2
2.1. Střevo a trávení lipidů .....	2
2.2. Hemolymfa a transport hmyzích lipidů .....	3
2.3. Tukové těleso a intermediální metabolismus hmyzích lipidů.....	5
2.4. Hmyzí svaly a spalování tuků.....	7
3. Regulace metabolismu lipidů u hmyzu: adipokinetické hormony a jejich úloha .....	7
4. Úloha AKH ve specifické stresové situaci – účinek insekticidů .....	10
5. Seznam citované literatury.....	12
6. Locust adipokinetic hormones mobilize diacylglycerol selectively .....	20
7. Analysis of lipids mobilized by adipokinetic hormones in the firebug <i>Pyrrhocoris apterus</i> (L.) .....	28
8. Adipokinetic hormone (Pyrap-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug <i>Pyrrhocoris apterus</i> .....	41
9. Shrnutí.....	49

## 1. Lipidy

Hmyz je schopen využít pro své životní procesy běžné zdroje energie jako jsou lipidy, sacharidy nebo proteiny. Nejeftektivnějším zdrojem energie jsou však lipidy, jejich využití má několik výhod. Mají větší kalorický obsah na jednotku hmotnosti a při oxidaci uvolňují 2x více metabolické vody než např. glykogen. Ve tkáních jsou ukládány v bezvodé formě, mají tedy menší objem a tím větší zásobní kapacitu. Z těchto důvodů bývají lipidy hlavním zdrojem energie převážně pro hmyz, který prochází relativně dlouhým obdobím bez příjmu potravy (např. diapauza, migrační lety). Hmyz tráví a absorbuje lipidy podobně jako obratlovci, existuje však několik důležitých rozdílů (viz dále).

Lipidy zahrnují velkou skupinu strukturně rozdílných sloučenin. Tyto sloučeniny jsou nerozpustné ve vodě, zato jsou rozpustné v nepolárních látkách (např. chloroform a aceton). Zahrnují mastné kyseliny (MK), acylglyceroly, sfingolipidy, fosfoglyceroly, vosky, terpenoidy, steroly, prostaglandiny a hybridní molekuly jako lipoproteiny a glykolipidy. Z fyziologického hlediska se lipidy dělí podle své funkce na zásobní a strukturní. Běžnou zásobní formou tuků u zvířat a rostlin jsou triacylglyceroly (TG). Skládají se z kostry glycerolu, ke které je esterovou vazbou připojena jedna nebo více MK. U hmyzu slouží TG jako dominantní rezerva metabolické energie, která může být mobilizována a využita podle potřeby. Hlavním zdrojem TG je tukové těleso.

Hlavním transportním lipidem v hemolymfě hmyzu jsou diacylglyceroly (DG). Pro své hydrofobní vlastnosti musí být v hemolymfě navázány na nosič, lipoprotein (Chino a Downer 1982). Většina DG je v hemolymfě přítomna jako sn-1,2-izomery (Van der Horst 1982 b). Další 2 izomery sn-1,3 a sn-2,3 jsou přítomné pouze v malém množství (Tietz a kol 1975, Arrese a Wells 1997). Z energetického hlediska jsou nejdůležitější součástí DG MK, protože většina potenciálně využitelné energie je obsažena právě v jejich molekule. U hmyzu bylo identifikováno několik desítek MK, avšak majoritní zastoupení má pouze 8 z nich. Jsou to nasycené MK – myristová (C 14:0), palmitová (16:0) a stearová (18:0), mononenasycené MK – palmitolejová (16:1), olejová (18:1) a polynenasycené MK – linolová (18:2) a linoleová (18:3). Nasycené a mononenasycené MK jsou u hmyzu syntetizovány z acetyl-CoA jako u ostatních organismů. Hmyz však není schopen syntetizovat polynenasycené MK, a proto je musí přijímat v potravě. Nedostatek těchto MK může působit zhoršený růst, vývoj a sníženou kapacitu reprodukce. Arachidonová kyselina, která je vyžadována pro normální růst a vývoj, je také prekurzorem pro tvorbu prostaglandinů (Downer 1978).

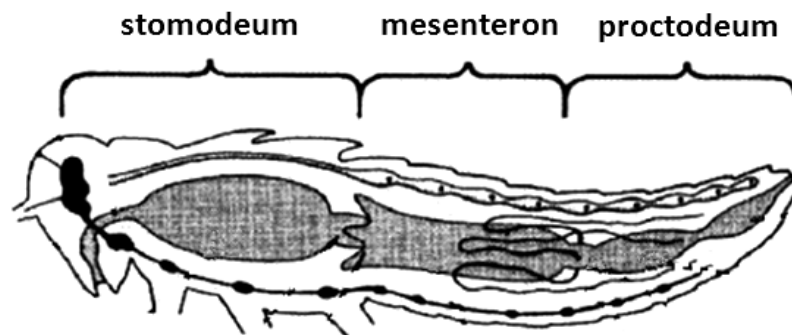
Mezi strukturní lipidy se řadí fosfolipidy, steroly a komplex lipidických látek, které jsou součástí kutikuly. Fosfolipidy jsou základní částí biologických membrán a nachází se

tedy ve všech buňkách. Přes 70% všech těchto látek zahrnují fosfatidylcholiny a fosfatidyletanolaminy. Steroly plní u hmyzu několik funkcí. Jsou esenciální složkou subcelulární membrány; jsou prekurzorem pro svlékací hormony ecdysteroidy; jsou podstatnou částí povrchu kutikuly; a jsou součástí lipoproteinové molekuly. Hmyz není schopen tyto látky syntetizovat, a proto musí steroly přijímat v potravě (Downer 1978). Kutikulární lipidy jsou sekretovány hmyzem jako tenká vrstva na vnější straně kutikuly a slouží jako ochranu proti vyschnutí, odření a pronikání mikroorganismů.

## 2. Metabolismus hmyzích lipidů

### 2.1. Střevo a trávení lipidů u hmyzu

Hmyzí trávicí trubice je rozdělena do tří částí: stomodeum (přední střevo), mesenteron (střední střevo) a proctodeum (zadní střevo) (viz Obr. 1). Hlavní úlohou střeva je trávit živiny přijaté z potravy, absorbovat je a připravit jejich produkty na transport hemolymfou. Tyto procesy probíhají převážně ve středním střevě. Stejně je tomu i u trávení lipidů - buňky střeva produkují enzymy (lipázy), které hydrolyzují esterovou vazbu glyceridů (Jensen 1971) a jsou specifické pro dlouhé řetězce MK (Gilbert 1967). Výsledkem této hydrolýzy jsou monoacylglyceroly (MG) a volné MK. Lipázy uvolňují MK z 1- a 3- pozice a preferují nenasycené MK (Bollade a kol. 1970, Weintraub a Tietz 1973, Hoffman a Downer 1979). U některých druhů hmyzu, zvláště u Lepidopter, které mají vysoké pH v lumenu střeva, vede hydrolýza TG až k produkci volného glycerolu a MK (Applebaum 1985, Beenackers a kol. 1985, Downer 1985, Turuner 1985, Turunen a Craiheim 1996, Arrese a kol. 2001). Tato kompletní hydrolýza zahrnuje migraci MK z pozice 2-MG na 1-MG a byla pozorována u *Manduca sexta* (Tsuchida a Wells 1988, Law a kol. 1992, Soulages a Wells 1994).



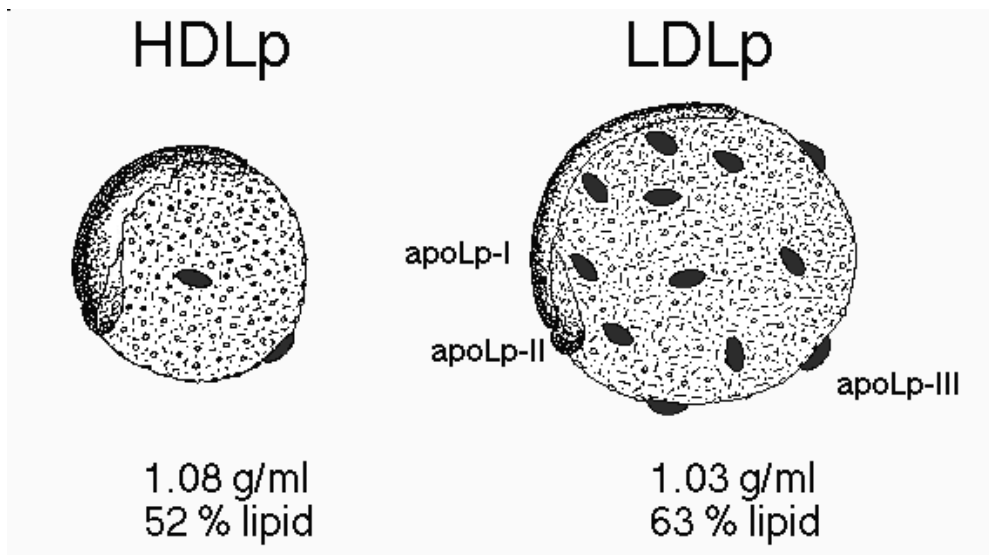
Obr. 1: Schématická stavba hmyzího střeva

Hmyz netvoří žluč, ale vyvinuly se u něj jiné strategie k emulgaci lipidů. Např. u cvrčka *Gryllus bimaculatus* se tvoří komplexy acylů MK a aminokyseliny k usnadnění rozpuštění lipidů (Collatz a Mommsen 1974). Bělásek *Pieris brassicae* zase využívá k usnadnění emulgace polární lipidy z potravy (Turunen a Kastari 1979). MK můžou procházet skrz plasmatickou membránu difúzí, usnadněnou difúzí nebo pinocytózou. Absorbované acyly MK a neúplné acylglyceroly jsou v enterocytech přeměněny na DG, TG a fosfolipidy. Syntéza TG nebo DG může zahrnovat acylaci 2-MG (monoacylglycerolová cesta) anebo de novo acylaci glycerol-3-fosfátu ( $\alpha$ -glycerolfosfátová cesta) (McFarlane 1976, Downer 1985, Turunen a Cranlheim 1996, Canavoso a Wells 2000). Volné MK používají k přeměně na DG  $\alpha$ -glycerolfosfátovou cestu (Canavoso a Wells 2000). DG mohou být rychle přeměněny na TG, které slouží jako zásobárna MK, anebo mohou být přímo uvolněny do hemolymfy. Tento mechanismus dovoluje maximální absorpci MK z lumen střeva a zároveň udržuje nízkou intracelulární koncentraci jak MK tak DG, které mohou být ve vysokých koncentracích pro organismus toxické (Canavoso a Wells 2000).

## **2.2. Hemolymfa a transport hmyzích lipidů**

Lipidy absorbované ze střeva se na místo určení transportují hemolymfou. Lipidický profil hmyzí hemolymfy kolísá podle fyziologického stavu zvířete. Nejpočetnější třídou lipidů přenášenou hemolymfou jsou produkty lipolýzy ze střeva nebo tukového tělesa. Do hemolymfy tyto produkty vstupují jako DG. DG jsou tedy hlavní transportní formou lipidů v hmyzím těle (Rimoldy a kol. 1985, Tsuchida a Wells 1988, Bauerfeind a Komnick 1992, Weer a kol. 1993, Canavoso a Wells 2000). Glycerol, který zůstane po hydrolýze TG, je rychle vychytáván z lumenu střeva a prochází nezměněn do hemolymfy (Weintraub a Tietz 1973).

Jako hlavní přenašeče hydrofobních částic v hemolymfě slouží lipoproteiny lipoforiny (Chino 1985, Tsuchida a Wells 1988). Lipoforiny jsou pojmenovány podle své hustoty: lipoforin o nízké hustotě (LDLp), lipoforin o vysoké hustotě (HDLp), a lipoforin o velmi vysoké hustotě (VHDLp) (Beenackers 1985). Jsou to kulovité částice, jejichž povrch je tvořen fosfolipidy a proteiny (viz Obr. 2). Každá HDLp částice obsahuje 2 apolipoproteiny: apolipoprotein-I (apoLp-I) a apolipoprotein-II (apoLp-II). Třetí výměnný apolipoprotein, apolipoprotein-III (apoLp-III), se nachází volně v hemolymfě nebo je spojen s LDLp, čímž zvyšuje jeho přepravní kapacitu. Jádro lipoforinu je u hmyzu tvořeno neutrálními lipidy, převážně DG a jinými acylglyceroly a menším množstvím sterolů, glycidů nebo karotenoidů (Soulages a Wells 1994).



Obr. 2: Srovnání dvou typů hmyzích lipoproteinů

Vysvětlivky k obrázku: HDLp - lipoforin o vysoké hustotě, LDLp - lipoforin o nízké hustotě, apoLp-I - apolipoprotein-I, apoLp-II - apolipoprotein-II, apoLp-III - apolipoprotein-III

ApoLp-I a apoLp-II jsou syntetizovány v tukovém tělese jako jediný proteinový prekurzor (Weer a kol. 1992, Van Heusden a kol. 1998, Van der Horst a kol. 1999), který je kódován samostatnou 10-kb mRNA. cDNA sekvence proapolipoproteinu odhalila, že apoLp-I se nachází na N-konci molekuly a apoLp-II na jejím C-konci. Na proapolipoproteinu se mezi apoLp-I a apoLp-II nachází jedno společné štěpící místo (Kutty a kol. 1996, Sundermeyer a kol. 1996). Proteolytické štěpení proapolipoproteinu v tomto místě tedy zajišťuje poměr obou apolipoproteinů ve všech lipoforinech 1:1. Proces, kterým se apolipoproteiny a transportované lipidy balí dohromady a tvoří lipoproteinovou částici, se nazývá lipidace. Lipidace probíhá následně po translaci prekurzoru. Lipidy a apolipoproteiny jsou u sebe drženy hydrofobními interakcemi. Rychlost biosyntézy lipoforinu u larvy *M. sexta* je nezávislá na množství lipidů v potravě. Je tu ale přímý vztah mezi obsahem lipidů v lipoproteinu a množstvím lipidů přijatých v potravě (Fernando-Warnakulasuriya a kol. 1988).

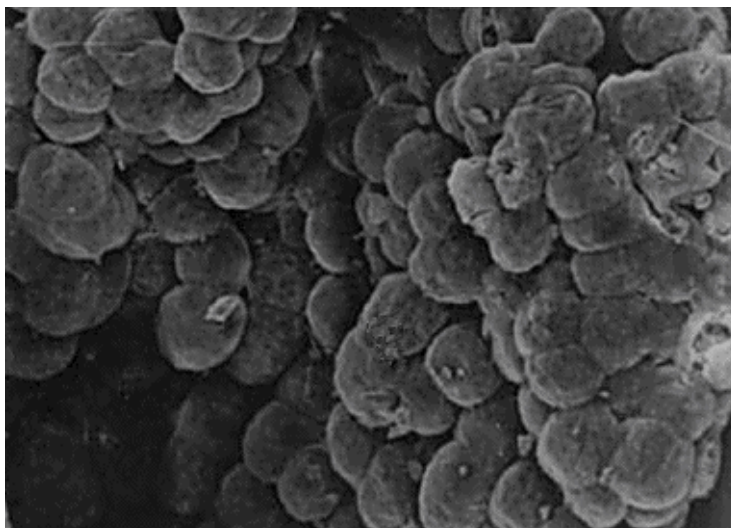
Hlavní funkcí lipoforinu je přenášet lipidy z místa absorpce (střevo) nebo uskladnění (tukové těleso) do místa spotřeby (Chino 1985, Kanost a kol. 1990, Van der Horst 1990, Soulages a Wells 1994, Arrese a kol. 2001). U různých druhů hmyzu může stejná lipoproteinová částice přenášet rozmanité skupiny lipidů a dalších hydrofobních složek. Charakteristickým znakem lipoforinového transportu u hmyzu je tkáňová specifita při doručení. Stejný typ lipoforinové molekuly může tedy selektivně doručit DG do tukového tělesa, u larvy *M. sexta* karotenoidy a hydrokarbony do kutikuly, zatímco u *Bombyx mori* karotenoidy dopraví do snovací žlázy (Arrese a kol. 2001).

Ve srovnání s obratlovcí se hmyzí transportní systém lipidů liší v několika důležitých bodech (1) je účinnější, protože lipidy jsou doručeny do cílové tkáně bez vstupu lipoforinu do buňky a bez jeho destrukce (Chino 1985, Ryan a kol. 1986, Soulages a Wells 1994, Tsuchida a Wells 1988, Aresse a kol. 2001), (2) hlavní exportovanou formou lipidů u hmyzu je DG. Tím se hmyzí transportní systém liší od obratlovčího, kde jsou lipidy transportovány ve formě volných MK vázaných na albumin. (3) Uvolnění DG do hemolymfy nezahrnuje tvorbu nové lipoproteinové částice, ale DG se rovnou naváže na existující lipoforin v hemolymfě (Chino 1985, Prasad a kol. 1986, Shapiro a kol. 1988, Ryan 1990, Soulages a Wells 1994).

Přesun DG ze tkáně (střevo, tukové těleso) na lipoforinovou částici je komplikovaný proces, kterého se účastní 2 faktory. Jedním je lipoforinový receptor a druhým je lipid přenášející částice (lipid transfer particle - LTP). Lipoforinový receptor interaguje s tkání skrz specifické vazebné místo a tento proces probíhá na povrchu buňky (Tsuchida a Wells 1988, Arrese a kol. 2001). LTP je lipoprotein o velmi vysoké hustotě (VHDLp) izolovaný z hemolymfy několika druhů hmyzu (Ryan a kol. 1986, Ryan 1990, Blacklock a Rayn 1994, Ryan a Van der Horst 2000). U *M. sexta* je LTP syntetizována v tukovém tělese a sekretována do hemolymfy (Van Heusden a kol. 1996). LTP katalyzuje výměnu a přesun DG: (1) z tukového tělesa na HDLp (Van Heusden a Law 1989), (2) ze střeva na HDLp (Arrese a kol. 2001), a (3) z HDLp nebo LDLp na vitelogenin, samičí specifický lipoprotein transportovaný hemolymfou do ovaríí (Tsuchida a kol. 1997). LTP také usnadňuje přenos dalších lipidů (např. fosfolipidy) z HDLp na LDLp (Tsuchida a kol. 1998, Takeuchi a Chino 1993).

### **2.3. Tukové těleso a intermediální metabolismus hmyzích lipidů**

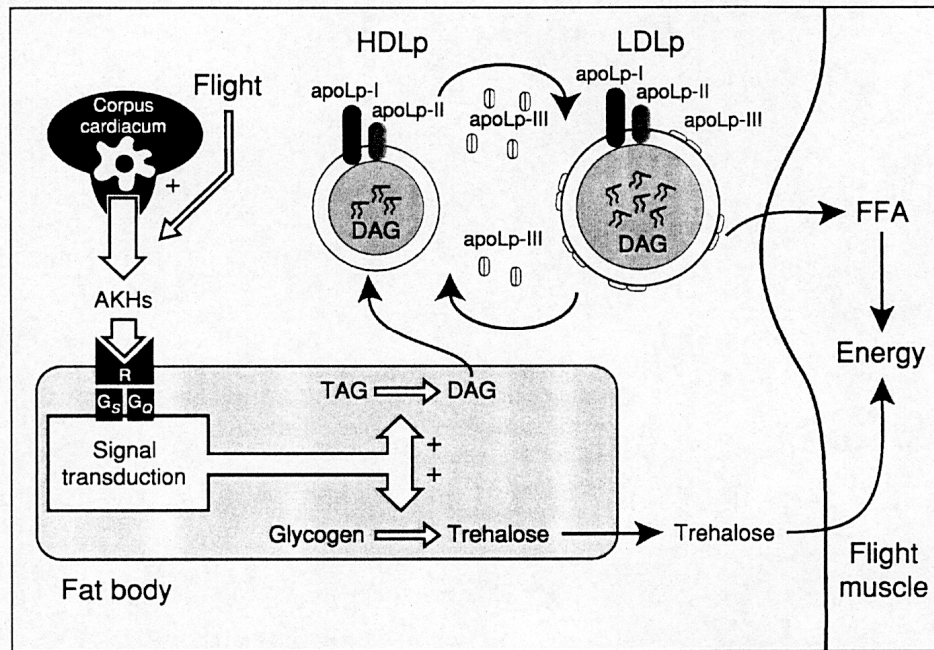
Většina zásobních lipidů hmyzu se nachází v tukovém tělese. Tukové těleso je orgán anatomicky a funkčně podobný obratlovčím játrům a tukové tkáni. Je relativně veliké a je rozmístěno skrz celé hmyzí tělo. Má rozvolněnou strukturu a tvoří tenké laloky, jež jsou omývány hemolymfou (viz Obr. 3). Je to místo syntézy proteinů hemolymfy, zásobního glykogenu a tuků a centrum mnoha metabolických reakcí (Beenackers a kol. 1985, Candy 1985, Arrese 2010). Více než 90% lipidů skladovaných v tukovém tělese jsou TG (Beenackers a kol. 1985, Downer 1985, Arrese a Wells 1997, Canavoso a kol. 1998), které pochází z lipidových složek potravy. Menší množství TG může pocházet z glycidových zdrojů (Beenackers a kol. 1985, Downer 1985).



Obr. 3: Buňky tukového tělesa

Během transportu lipidů se lipoforin váže na receptor tukového tělesa (Ryan a van der Horst 2000, Arrese a kol. 2001). V tukovém tělese u *M. sexta* byl charakterizován HDLp-vázající protein. K vazbě HDLp tento protein potřebuje přítomnost  $\text{Ca}^{2+}$  (Tsuchida a Wells 1988). Na druhé straně HDLp vázající protein identifikovaný u *Locusta migratoria* má širší specifitu a nepotřebuje  $\text{Ca}^{2+}$  (Tsuchida a Wells 1990). Role LTP v přesunu lipidů z lipoforinu do tkáně je nejasná.

Jak už bylo uvedeno, lipidy jsou mobilizovány v případě potřeby z tukového tělesa ve formě DG. Tato mobilizace je indukována adipokinetickými hormony (AKH, viz dále), které spustí kaskádu reakcí vedoucí ke štěpení TG na DG a jejich uvolnění do hemolymfy (viz Obr. 4) (Beenackers a kol 1985). Po uvolnění do hemolymfy jsou DG lipoforiny transportovány do cílových tkání. Tento proces je stejný jako transport DG ze střeva. Export DG z tukového tělesa nezahrnuje syntézu nové lipoforinové částice, místo toho se DG opět naváže na volný HDLp v hemolymfě (Soulages a Wells 1994, Chino 1997, Haunerland 1997). LTP částice katalyzuje přesun DG z tukového tělesa na HDLp (Van Heusden a Law 1989). Po vazbě DG na HDLp se výsledná velikost celé částice podstatně zvětší. Kapacita HDLp přijímat DG je limitována. Povrch částice se stává nestabilní ve chvíli, kdy se lipidové jádro vystaví hemolymfě. ApoLp-III má vysokou afinitu pro toto fázové rozhraní mezi lipidy a vodou. Váže se na zvětšující se částici, stabilizuje její povrch a umožní vylpování dalšího DG (Soulage a Wells 1994, Soulages a kol. 1995, Soulages a kol. 1996). Finálním produktem je LDLp částice, která má dvakrát větší hmotnost než HDLp. Za tento nárůst je zodpovědný nejen přepravovaný DG, ale i apoLp-III, protože poměr obou molekul je přibližně stejný.



Obr. 4: Schéma transdukce signálu AKH v tukovém tělese (Van der Horst a kol. 2009)

Vysvětlivky k obrázku: HDLp - lipoforin o vysoké hustotě, LDLp - lipoforin o nízké hustotě, apoLp-I - apolipoprotein-I, apoLp-II - apolipoprotein-II, apoLp-III - apolipoprotein-III, TAG-triacylglycerol, DAG-diacylglycerol, FFA - volné mastné kyseliny, AKH - adipokinetický hormon, R- AKH receptor, G-G protein.

## 2.4. Hmyzí svaly a spalování tuků

Hmyzí létací svaly jsou jedny z metabolicky nejaktivnějších tkání v živočišné říši. Tyto svaly nejsou schopny skladovat větší množství lipidů, proto musí být efektivně zásobovány DG výše popsaným transportním systémem. Svalově specifická lipoforin lipáza hydrolyzuje DG a uvolňuje volné MK a glycerol, které jsou využity létacím svaelem. Tato membránově vázaná lipáza preferuje LDLp oproti HDLp (Van Heusden a kol. 1986). Po odštěpení DG se oddělí také apoLp-III a probíhá regenerace HDLp z volného LDLp. HDLp a apoLp-III mohou být znovu využity k tvorbě LDLp v tukovém tělese.

Energie obsažená v molekule MK je buňce přístupná při postupném odbourávání dvouuhlíkaté jednotky -  $\beta$ -oxidaci, jejímž produktem je acetylkoenzym A (Acetyl-CoA). Acetyl-CoA podstupuje kondenzaci s oxalacetátem a tvoří citrát, který je následně oxidován na  $\text{CO}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  v Krebsově cyklu při souběžné produkci ATP během oxidativní fosforylace v mitochondriích.

## 3. Regulace metabolismu lipidů u hmyzu: adipokinetické hormony a jejich úloha

Metabolismus lipidů je u hmyzu tak jako mnoho dalších biochemických procesů řízen hormonálně. Základní roli zde hrají adipokinetické hormony. Adipokinetické hormony resp.

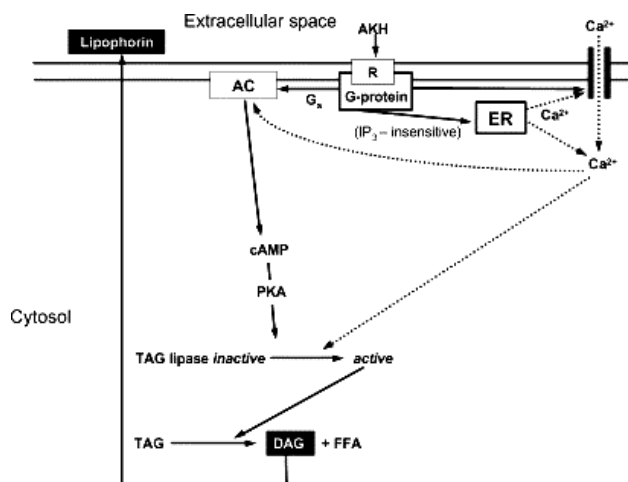


AKH/RPCH (adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone) rodina jsou nejlépe prostudovanou skupinou hmyzích neuropeptidů. Jejich hlavní funkcí je mobilizace různých energetických zdrojů (lipidy, glycidy a prolin). Mezi nejdříve identifikované zástupce patří chromatoforotropin RPCH popsaný u koryšů (Ferlund a Josefsson 1972) a Locmi-AKH-I izolovaný ze saranče stěhovavé *L. migratoria* (Stone a kol. 1976). Dosud bylo identifikováno a charakterizováno více než 50 různých druhů AKH u zástupců všech hlavních hmyzích řádů (Gäde 2009) a 2 zástupci u koryšů (Marco a Gäde 2010). Počet AKH u jednoho druhu hmyzu kolísá od jednoho u většiny druhů až po tři u *L. migratoria* (Oudejans a kol. 1991) a několik dalších druhů.

Všechny hormony z AKH/RPCH rodiny se skládají z 8 až 10 aminokyselin s jedinou výjimkou, AKH z motýla *Vanessa cardui* obsahuje 11 aminokyselin (Kollisch a kol. 2000). Jsou to tedy okta-, nona- nebo deka-peptidy, které mají N-konec molekuly blokováný kyselinou pyroglutamovou a C-konec amidovaný (Gäde 1990). AKH jsou syntetizovány, skladovány a uvolňovány z neurosekretorických buněk corpora cardiaca (CC). CC je neuroendokrinní žláza spojená s mozkem a slouží jako neurohemální orgán mozkových neurohormonů a syntetizuje také hormony vlastní. Malé množství AKH bylo také nalezeno v buňkách mozku (Moshitzky a kol. 1987a, b, Bray a kol. 1993, Kodrík a kol. 2003) U *Schistocerca gregaria*, kde byly popsány 2 AKH (Schgr-AKH-I, -II), bylo zjištěno, že každý z hormonů má specifickou m-RNA, která je translatována do prekurzoru pre-pro-AKH o složení: signální peptid + příslušná AKH sekvence + sekvence pro další peptid s neznámou funkcí (O'Shea a Rayne 1992). Při transportu hemolymfou není AKH vázán na žádný nosič (Oudejans 1996). Po splnění své funkce je AKH štěpen peptidázami/proteázami (Isaac 1978). AKH jsou pojmenovány podle své prvně zjištěné funkce - mobilizace lipidů z tukového tělesa u *L. migratoria* (Mayer a Candy 1969), kde zajišťují využití energetických zdrojů v létacích svalech během dlouhodobých migračních letů (Goldsworthy 1990, Ayali a kol. 1996). AKH jsou však pleiotropní hormony, protože zasahují i do dalších energeticky náročných procesů jako je svlékání, reprodukce, růst, hladovění a diapauza (Gäde 1990). Z biochemických funkcí lze jmenovat inhibici syntézy lipidů (Gokuldas a kol. 1988), bílkovin (Carlisle a Loughton 1979, Moshitzky a Applebaum 1990) a RNA (Kodrík a Goldsworthy 1995), aktivaci adenylátcyklázy a lipázy (Spencer a Candy 1976), glykogenfosforylázy (Van Marrewijk a kol. 1980), akumulaci cAMP (Goldsworthy 1983). AKH hrají roli i v procesu přenosu lipidů zvýšením kapacity jejich přenašečů – lipoproteinů (Gäde 1997, Van der Horst a kol. 1999). Tyto hormony také působí na fyziologické úrovni. Stimulují srdeční frekvenci (Scarborough a kol. 1984) a pohybovou aktivitu (Socha a kol. 1999), potlačují vitelogenezi inaktivací

transkripčního faktoru, který se podílí na regulaci JH-dependentních genů (Glinka 1996, Zhou 2002). Jejich další účinek je spojen s aktivací imunitní odpovědi (Goldsworthy a kol. 2003). Působení AKH je tedy mnohem širší než naznačuje jejich název - jsou to typické stresové hormony – stimulují reakce vedoucí k produkci energie a inhibují anabolické pochody, které jsou v dané situaci méně důležité (Kodrík 2008). V případě potřeby mobilizují další stresové reakce, které doplňují hlavní metabolickou odpověď, a komplexně tak zajišťují eliminaci nebo alespoň zmírnění dopadu stresu na organismus.

Mobilizace energetických rezerv z tukového tělesa je potřebná na zajištění prakticky všech fyziologických dějů v těle, dominantní roli však hraje lokomoce, proto z této oblasti pochází nejvíce údajů o funkci AKH. Primárním stimulem pro uvolnění AKH z CC je u *L. migratoria* let. Cílem adipokinetického signálu pro mobilizaci TG z tukového tělesa je enzym TG lipáza (Ogoyi a kol. 1998, Arrese a kol. 1999). Proces aktivace je zprostředkován prostřednictvím specifických receptorů. AKH receptory byly charakterizovány u několika druhů hmyzu (Park a kol. 2002, Staubli a kol. 2002, Kaufmann a Brown 2006, Hansen a kol. 2006). Tyto receptory jsou spojeny s G proteinem a jsou strukturně příbuzné obratlovčímu receptoru gonadotropin releasing hormonu. Mechanismus působení AKH byl studován u několika druhů hmyzu (Gäde a Aueswald 2003) a je podrobně popsán pro aktivaci základních metabolických substrátů – lipidů, glycidů a prolinu. Po uvolnění AKH z CC do hemolymfy se AKH peptidy vážou na receptor tukového tělesa a tím změní konformaci  $G_s$  proteinu, který aktivuje adenylát cyklázu (adenylatcyklázová cesta) nebo fosfolipázu C (fosfolipázová cesta) (Gäde a Aueswald 2003). Druhy hmyzu preferující mobilizaci lipidů využívají převážně adenylátcyklázovou cestu s následným nárůstem intracelulárního cAMP (Arrese a kol. 1999). cAMP stimuluje lipázovou aktivitu aktivací proteinkinázové kaskády (Arrese a kol. 1999). Celý proces je podmíněn nárůstem hladiny intracelulárního  $Ca^{2+}$  (viz Obr. 5). Úlohou AKH v mobilizaci různých lipidových zdrojů se zabývají publikace uvedené v kapitolách 5. a 6 této dizertační práce.



Obr. 5: Mechanismus působení AKH vedoucí k mobilizaci lipidů - adenylátcyklázová cesta (Gäde a Auerswald 2003)

Vysvětlivky k obrázku: TAG-triacylglycerol, DAG-diacylglycerol, FFA - volné mastné kyseliny, AKH - adipokinetický hormon, R- AKH receptor, G-G protein, ER – endoplasmatické retikulum, AC- adenylátcykláza, cAMP-cyklický adenosinmonofosfát, PKA-proteinkináza A.

#### 4. Úloha AKH ve specifické stresové situaci – účinek insekticidů

AKH se účastní řízení různých stresových reakcí, nedávno bylo zjištěno (viz níže), že tomu je i v případě ošetření hmyzu insekticidem. Takové ošetření představuje stresovou situaci v cílovém organismu, která vyžaduje mobilizaci energetických zásob ke zmírnění dopadu na fyziologické a další funkce. Nárůst titru AKH po aplikaci insekticidu byl zaznamenán u několika druhů hmyzu (Samaranayaka 1974, Candy 2002, Kodrík a Socha 2005), což naznačuje zapojení AKH do obranných mechanismů. Uvolnění AKH z izolovaných CC po aplikaci insekticidu bylo popsáno u *L. migratoria* (Singh a Orchard 1982). U *S. gregaria* byl nárůst AKH v hemolymfě způsoben aplikací deltamethrinu (Candy 2002). Hladina AKH (Peram-CAH-I a CAH-II) v CC a hemolymfě vzroste u dospělců *Leptinotarsa decemlineata* krměných geneticky modifikovanými bramborami produkujícími toxin *Bacillus thuringiensis* nebo lektin *Galanthus nivalis* a podobný nárůst byl zaznamenán i po aplikaci paraquatu (herbicid, derivát 4,4-bipyridylu), který se běžně používá k navození podmínek oxidačního stresu v pokusném organismu (Kodrík a kol. 2007). Po aplikaci paraquatu, který působil 4 hodiny, vzrůstá hladina AKH u *P. apterus* pouze v hemolymfě. V CNS byly zaznamenány nespecifické změny (Večeřa a kol 2007). Po aplikaci permethrinu (syntetický pyretroid) vzrůstá hladina AKH v hemolymfě i při nízkých dávkách (Kodrík a Socha 2005), při vyšších vzroste titr AKH i CNS (Kodrík a kol. 2009). AKH má schopnost

pronikat kutikulou a může tedy ovlivnit metabolické funkce při topikální aplikaci (Kodrík a kol 2002a, Kodrík a kol. 2002b, Lorenz a kol. 2004). Tato vlastnost ho činí potencionálním kandidátem využitelným na agens při kontrole populací hmyzích škůdců.

Úlohou AKH ve vztahu k insekticidům a k energetickému metabolismu se zabývá publikace v kapitole 7 této dizertační práce.

## 5. Seznam citované literatury

- Applebaum S.W. 1985:** Biochemistry of digestion. Kerkut G.A., Gilbert L.I. eds. 1985. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. *Oxford, UK: Pergamon.10:279-311.*
- Aresse E.L., Canavoso L.E., Jouni Z.E., Pennington J.E., Tsuchida K. and Wells M.A. 2001:** Lipoprotein metabolism in insects: current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol. 31:7-17.*
- Arrese E. L. and Soulages J. L. 2010:** Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annu. Rev. Entomol. 55:207-225.*
- Arrese E.L. and Wells M.A. 1997:** Adipokinetic hormone-induced lipolysis in the fat body of an insect *Manduca sexta*: synthesis of sn-1,2-diacylglycerols. *J. Lipid Res. 38:68–76.*
- Arrese E.L., Flowers M.T., Gazard J.L. and Wells M.A. 1999:** Calcium and cAMP are second messenger in the adipokinetic hormone-induced lipolysis of triacylglycerols in *Manduca sexta* fat body. *J. Lipid Res. 40: 556–564.*
- Ayali A., Golenser E. and Peter M. P. 1996:** Flight fuel related differences between solitary and gregarious locusts (*Locusta migratoria migratorides*). *Physiol. Entomol. 21: 1-16.*
- Bauerfeind R. and Komnick H. 1992:** Lipid-loading and unloading of lipophorin in the midgut epithelium of dragonfly larvae, *Aeshna cyanea*. *J. Insect Physiol. 38:147-60.*
- Beenackers A.M.T., Van der Horst D.J. and Van Marrewijk W.J.A. 1985:** Insect lipids and their role in physiological processes. *Prog. Lipid Res. 24:19-67.*
- Blacklock B.J. and Ryan R.O., 1994:** Haemolymph lipid transport. *Insect Biochem. Mol. Biol. 24: 855–873.*
- Bollade D., Paris R. and Moulins M., 1970.** Origine et mode d'action de la lipase intestinale chez les blattles. *J. Insect Physiol. 16: 45–53.*
- Bray M.M., Shafi S., Wheeler C.H. and Goldsworthy G.J. 1993:** Quantification by radioimmunoassay of adipokinetic hormone-I in neural tissues in the head of *Locusta migratoria*, *Comp. Biochem. Physiol. 106A: 257–262.*
- Canavoso L.E., Bertello L.E., de Lederkremer R.M. and Rubiolo E.R. 1998:** Effect of fasting on the composition of the fat body lipid of *Dipetalogaster maximus*, *Triatoma infestans* and *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Comp. Physiol. B 168:549-54.*
- Canavoso L.E., Wells M.A. 2000:** Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol. 30:1173-1180.*
- Candy D.J. 1985:** Intermediary metabolism. Kerkut G.A., Gilbert L.I. eds. 1985. Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. *Oxford, UK: Pergamon.10:1-41.*

**Candy D.J. 2002:** Adipokinetic hormones concentrations in the haemolymph of *Schistocerca gregaria*, measured by radioimmunoassay. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1361-1367.

**Carlisle J. and Loughton B. G. 1979:** Adipokinetic hormone inhibits protein synthesis in *Locusta*. *J. Insect Physiol.* 282: 420-450.

**Chino H. 1985:** Lipid transport: biochemistry of haemolymph lipophorin. Kerkut G.A., Gilbert L.I. eds. 1985. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Oxford, UK: Pergamon.10:115-35.

**Chino H. 1997:** Physiological significance of lipid transport by lipophorin for long distance flight in insects. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B:475-82.

**Chino H. and Downer R.G.H. 1982:** Insect haemolymph lipophorin: a mechanism of lipid transport in insects. *Adv. Biophys.* 15, 67-92.

**Collatz K.G. and Mommsen T. 1974:** Structure of emulsifying substances in several invertebrates. *J. Comp. Physiol.* 94. 339-352.

**Downer 1978:** Functional role of lipids in insect. In *Biochemistry of Insect*. Edited by M. Rockstein. Pp.57-92. *Academic Press*. New York.

**Downer R.G.H. 1985:** Lipid metabolism. Kerkut G.A., Gilbert L.I. eds. 1985. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Oxford, UK: Pergamon.10:77-113.

**Ferlund P. and Josefsson L. 1972:** Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. *Science*, 177: 173-175.

**Fernando-Warnakulasuriya G.J.P., Tsuchida K. and Wells M.A. 1988.** Effect of dietary lipid content on lipid transport and storage during larval development of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 18:211-14.

**Gäde G. 1990:** The Adipokinetic hormone/Red pigment concentrating hormone peptide family: Structures, interrelationships and fiction. *J. Insect Physiol.* 36: 1-12.

**Gäde G. 1997:** The explosion of structural information on insect neuropeptides. In: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer-Verlag, New York, 71: 1-128.

**Gäde G., Auerswald, L. 2003:** Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132: 10–20.

**Gäde, G. 2009:** Peptides of the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family: a new take on biodiversity. *NYAS*, 1163, 125-136.

**Gilbert L.I. 1967:** Lipid metabolism and function in insect. *Adv. Insect Physiol.* 4. 69-211.

**Glinka A. V. and Wyatt G. R. 1996:** Juvenile hormone activation of gene transcription in locust fat body. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 13-18.

**Gokuldas M., Hunt A. P. and Candy D. J. 1988:** The inhibition of lipid synthesis in vitro in the locust, *Schistocerca gregaria*, by factors from the corpora cardiaca. *Physiol. Entomol.* 13: 43-48.

**Goldsworthy G. J. 1983:** The endocrine control of flight metabolism in locusts. *Adv. Insect Physiol.* 17: 149-204.

**Goldsworthy G. J. 1990:** Hormonal control of flight metabolism in locust. In: *Biology of Grasshoppers*, Chapman R. and Joern A. (Eds.), John Wiley and Sons, Inc., New York, 205-225.

**Goldsworthy G. J., Mullen L., Opoku-Ware K. and Chandrakant S. 2003:** Interactions between the endocrine and immune systems in locust. *Physiol. Entomol.* 28: 54-61

**Hansen K.K., Hauser F., Cazzamali G., Williamson M. and Grimmelikhuijzen C.J.P. 2006:** Cloning and characterization of the adipokinetic hormone receptor from the cockroach *Periplaneta americana*. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 343: 638-643.

**Hauerland N.H. 1997:** Transport and utilization of lipids in insect flight muscles. *Comp. Biochem. Physiol.* 117B:475-82.

**Hoffman, A.G.D. and Downer, R.G.H., 1979:** End product specificity of triacylglycerol lipases from intestine, fat body, muscle and haemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana* L. *Lipids* 14, pp. 893–899.

**Hui T.Y. and Bernlohr D.A. 1997:** Fatty acid transporter in animal cells. *Front. Biosci.* 2:222-231.

**Isaac R., Coates D., Williams T. A. and Schoofs L. E. 1978:** Insect angiotensin-converting enzyme: comparative biochemistry and evolution. In: GM Coast, editor. *Recent advances in arthropod endocrinology*. Webster. Soc. Exp. Biol., Seminar Series 65 (Part IV) 1998; p. 357–78.

**Jensen R.G. 1971:** Lipolytic enzymes. *Prog. Chem. Fats Other Lipids.* 11, part 3, 347-349.

**Kanost M. R., Kawooya J. K., Law J. H., Ryan R. O., Van Heusden M. C. and Ziegler R. 1990:** Insect haemolymph proteins. *Adv. Insect Physiol.* 22: 299-396.

**Kaufmann C. and Brown M.R: 2006:** Adipokinetic hormone in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*: Identification and expression of genes for two peptides and a putative receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 466-481.

**Kodrik D. 2008:** Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiol. Entomol.* 33: 171-180.

**Kodrik D. and Goldsworthy G. J. 1995:** Inhibition of RNA synthesis by adipokinetic hormones and brain factors in adult in fat body of *Locusta migratoria*. *J.Insect Physiol.* 41: 127-133.

- Kodrík D. and Socha R. 2005:** The effect of insecticide treatment on adipokinetic hormone titre in insect body. *Pest Manag Sci* 61: 1077-1082.
- Kodrík D., Bártů I. and Socha R. 2010:** Adipokinetic hormone (Pyrp-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Pest. Mang. Sci.* 66: 425-461.
- Kodrík D., Krishnan N. and Habuštová O. 2007:** Is the titer of adipokinetic peptides in *Leptinotarsa decemlineata* fed on genetically modified potatoes increased by oxidative stress? *Peptides* 28: 974-980.
- Kodrík D., Šimek P., Lepša L. and Socha R. 2002b:** Identification of the cockroach neuropeptide Pea-CAH-II as a second adipokinetic hormone in the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Peptides* 23: 583-585.
- Kodrík D., Socha R. and Srová Z. 2003:** Developmental and diel changes of adipokinetic hormone in CNS and haemolymph of the flightless wing-polymorphic bug, *Pyrrhocoris apterus*. *J. Insect Physiol.* 49: 53-61.
- Kodrík D., Socha R. and Zemek R. 2002a:** Topical application of Pya-AKH stimulates lipid mobilization and locomotion in the flightless bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Physiol. Entomol.* 27: 15-20.
- Kollisch G. V., Lorenz M. W., Kellner R., Verhaert P. D. and Hoffmann K. H. 2000:** Structure elucidation and biological activity of an unusual adipokinetic hormone from corpora cardiaca of the butterfly, *Vanessa cardui*. *Europ J. Biochem.*, 267: 5502-5508.
- Kutty R.K., Kutty G., Kambadur R., Duncan T. and Koonin E.V. 1996:** Molecular characterization and developmental expression of a retinoid- and fatty acid-binding glycoprotein from *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 271:20641-49.
- Law J.H., Wells M.A. 1989:** Insects as biochemical models. *J. Biol. Chem.* 264:13665-38
- Lorenz M.W., Zemek R., Kodrík D. and Socha R. 2004:** Lipid mobilisation and locomotor stimulation in *Gryllus bimaculatus* (de Geer) (Ensifera, Gryllidae) by topically applied adipokinetic hormone. *Physiol. Entomol.* 29: 146-151.
- Marco H. G. and Gäde G. 2010:** Biological activity of the predicted red pigment-concentrating hormone of *Daphnia pulex* in crustacean and an insect, *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 104-110.
- Mayer R. J. and Candy D. J. 1969:** Control of haemolymph lipid concentration during locust flight: an adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. *J. Insect Physiol.* 15: 611-620.
- McFarlane J.E. 1976:** Vitamin K: growth factor for the house cricket (Orthoptera: Gryllidae). *Can. Entomol.* 108:391-94.



- Moshitzky P , Henzel W.J., Rafaeli A., Ramachandran J. and Applebaum S.W. 1987a:** Synthesis of adipokinetic hormone (AKH-I) in the locust brain, *Insect Biochem.* 17:1133–1137.
- Moshitzky P. and Applebaum S. W. 1990:** The role of adipokinetic hormone in the control of vitellogenesis in locusts. *Insect Biochem.* 20: 319-323
- Moshitzky P., Yamashiro D., Stuve L., Ramachandran J. and Applebaum S.W.1987b:** Determination of locust AKH-I by radioimmunoassay and the identification of AKH-like factor in the locust brain, *Insect Biochem.* 17: 765–769.
- O’Shea M. and Rayne R. C. 1992:** Adipokinetic hormones: cell and molecular biology. *Experientia*, 48:430-38.
- Ogoyi D.O., Osir E.O. and Olembo N.K. 1998:** Fat body triacylglycerol lipase in solitary and gregarious phases of *Schistocerca gregaria* (Forsk.) (Orthoptera: Acrididae). *Comp. Biochem. Mol. Biol.* 119:163-167.
- Oudejans R. C. H. M., Vroemen S. F., Jansen R. F. R. and Van der Horst D. J. 1996:** Locust adipokinetic hormones: carrier-independent transport and differential inactivation at physiological concentrations during rest and flight. *PNAS, USA*, 93: 8654-59.
- Oudejans R. Ch. M., Kooiman F. P. and Heerma W. 1991:** Isolation and structure elucidation a novel adipokinetic hormone (Lom-AKH-III) from the glandular lobes of the corpus cardiacum of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Europ. J. Biochem.* 195: 351-359.
- Park Y., Kim Y. J. and 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. *PNAS, USA*, 99:11423-28.
- Prasad S.V., Fernando-Warnakulasuriya G.J.P., Sumida M., Law J.H. and Wells M.A. 1986:** Lipoprotein biosynthesis in the larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 261:17174-76.
- Rimoldi O.M., Peluffo R.O., Gonzalez S.M., Brenner R.R. 1985:** Lipid digestion, absorption and transport in *Triatoma infestans*. *Comp. Biochem. Physiol.* 82B:187-90.
- Ryan R.O. 1990:** Dynamics of insect lipophorin metabolism. *J. Lipid Res.* 31:1725-39.
- Ryan R.O., Prasad S.V., Henriksen E.J., Wells M.A., Law J.H. 1986:** Lipoprotein interconversions in an insect, *Manduca sexta*. Evidence for a lipid transfer factor in the haemolymph. *J. Biol. Chem.* 261:563-68.
- Ryan R.O., Van der Horst D.J. 2000:** Lipid transport biochemistry and its role in energy metabolism. *Annu. Rev. Entomol.* 45:133-60.
- Samaranayaka M. 1974:** Insecticide-induced repase of hyperglycaemic and adipokinetic hormones of *Schistocerca gregaria*. *Gen. Comp. Endocrinol* 24: 424-436.

- Scarborough R. M., Jamieson G. C., Kalish F., Kramer S. J., McEnroe G. A., Miller C. M. and Schooley D. A. 1984:** Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. *PNAS, USA*, 81: 5575-5579.
- Shapiro J.P., Law J.H., Wells M.A. 1988:** Lipid transport in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 33:297-318.
- Singh G.J.P. and Orchard I. 1982:** Is insecticide-induced release of insect neurohormones a secondary effect of hyperactivity of the central nervous system? *Pestic Biochem Physiol* 17: 232-242.
- Socha R., Kodrík D. and Zemek R. 1999:** Adipokinetic hormone stimulates insect locomotor activity. *Naturwissenschaften*, 88: 85-86.
- Soulages J. L. and Wells M. A. 1994:** Effect of diacylglycerol content on some physicochemical properties of the insect lipoprotein, lipophorin. Correlation with the binding of apolipophorin-III. *Biochemistry*, 33: 2356-62.
- Soulages J. L. and Wells M. A. 1994:** Lipophorin, the structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insect. *Adv. Protein Chem.* 45: 371-415.
- Soulages J. L., Salamon Z., Wells M. A. and Tollin G. 1995:** Low concentrations of diacylglycerol promote the binding of apolipophorin-III to a phospholipid surface: a surface plasmon resonance spectroscopy study. *PNAS, USA*, 92: 5650-54.
- Soulages J. L., Van Antwerpen R., Wells M. A. 1996:** Role of diacylglycerol and apolipophorin-III in regulating the physicochemical properties of lipophorin surface: metabolic implications. *Biochemistry*, 35: 5191-98.
- Spencer, I.M. and Candy, D.J., 1976.** Hormonal control of diacylglycerol mobilization from fat body of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochem.* 6: 289-296.
- Staubli F., Jorgensen T. J. D., Cazzamali G., Williamson M., Lenz C. et al. 2002:** Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *PNAS, USA*, 99: 3446-51.
- Stone J. V., Mordue W., Blatney K. E. and Morfia H. R. 1976:** Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight. *Nature*, 236: 207-211.
- Sundermeyer K., Hendricks J.K., Prasad S.V., Wells M.A. 1996:** The precursor protein of the structural apolipoproteins of lipophorin: cDNA and deduced amino acid sequence. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26:735-38.
- Takeuchi, N. and Chino, H., 1993.** Lipid transfer particle in the haemolymph of the American cockroach, evidence for its capacity to transfer hydrocarbons between lipophorin particles. *J. Lipid Res.* 34: 543-551

**Tietz, A., Weintraub, H. and Peled, Y., 1975.** Utilization of 2-acyl-sn-glycerol locust fat body microsomes. Specificity of the acyl-transferase system. *Biochem. Biophys. Acta* 618: 80–87.

**Tsuchida K. and Wells M.A. 1990:** Isolation and characterization of lipoprotein receptor from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 265:5761-5767.

**Tsuchida K., Wells M.A.1988:** Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval stadium of *M. sexta*. Changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary lipid to the fat body. *Insect Biochem.* 18:263-68.

**Tsuchida, K., Arai, M., Tanaka, Y., Ishihara, R., Ryan, R.O. and Maekawa, H., 1998.** Lipid transfer particle catalyzes transfer of carotenoids between lipophorins of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 927–934.

**Tsuchida, K., Soulages, J.L., Moribayashi, A., Suzuki, K., Maekawa, H. and Wells, M.A., 1997.** Purification and properties of a lipid transfer particle from *Bombyx mori*. Comparison to the lipid transfer particle from *Manduca sexta*. *Biochem. Biophys. Acta.* 1337: 57–65.

**Turunen S. 1985:** Absorption. Kerkut G.A., Gilbert L.I. eds. 1985. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology.* Oxford, UK: Pergamon.4:241-78.

**Turunen S., Crailheim K. 1996:** Lipid and sugar absorption. Lehane M.J., Billingsley P.F. eds. 1996. *Biology of Insect Midgut.* London: Capman and Hall. 293-320.

**Turuner S. and Kastari T. 1979:** Digestion and absorption of lecithin in larvae of cabbage butterfly, *Pieris Brassicae*. *Comp. Biochem. Physiol.* 62A, 933-937.

**Van der Horst D.J, Roosendaal S.D. and Rodenburg K.W. 2009:** Circulatora lipid transport: lipoprotein assembly and function from an evolutionary perspective. *Mol. Cell. Biochem.* 326: 105-19-19.

**Van der Horst D.J. 1982b:** Lipid transport in insects. In *Metabolit Aspects of Lipid Nutrition in Insects.* Edited by T.E. Mittler and R. H. Dadd, pp. 183-202. Westview ress, Boulder, Colorado.

**Van der Horst D.J. 1990:** Lipid transport function of lipoproteins in flying insects. *Biochem. Biophys. Acta* 1047:195-211.

**Van der Horst D.J., Van Marrewijk W.J.A., Vulling H.G.B., Diederren J.H.B. 1999:** Metabolic neurohormones: release, signal transduction and physiological responses of adipokinetic hormones in insects. *Eur. J. Entomol.* 96:299-308.

**Van Heusden M. C. and Law J. H. 1989:** An insect lipid transfer particle promotes lipid loading from fat body to lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 264: 17287-92.

**Van Heusden M.C., Thomson F., Dennis J.1998:** Biosynthesis of *Aedes aegypti* lipophorin and gene expression of its apolipoproteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28:733-38.

**Van Heusden M.C., Van der Horst D.J., Van Doorn J.M., Wes J. and Beenackers A.M.T. 1986:** Lipoprotein lipase activity in the flight muscle of *Locusta migratoria* and its specificity for haemolymph lipoproteins. *Insect Biochem.* 16:517-13.

**Van Heusden M.C., Yepiz-Plascencia G.M., Walker A.M. and Law J.H., 1996.** Manduca sexta lipid transfer particle, synthesis by fat body and occurrence in haemolymph. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31: 39-51

**Van Marrewijk W.J.A., Van der Broek A.T.M. and Van der Horst D.J. 1980:** Regulation of glycogenolysis in the locust fat-body during flight. *Insect Biochem.* 10: 675-679.

**Večeřa J, Krishnan N, Alquicer G, Kodrík D and Socha R 2007:** Adipokinetic hormone-induced enhancement of antioxidant capacity of *Pyrrhocoris apterus* haemolymph in response to oxidative stress. *Comp Biochem Phys C* 146: 336-342.

**Weer P.M.M., Van der Horst D.J., Van Marrewijk W.J.A., Van der Eijnde M., Van Door J.M., Beenakker A.M.T. 1992:** Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein. *J. Lipid Res.* 33:485-91.

**Weer P.M.M., Van Marrewijk W.J.A., Beenakker A.M.T., Van der Horst D.J. 1993:** Biosynthesis of locust lipophorin. Apolipophorins I and II originate from a common precursor. *J. Biol. Chem.* 268:4300-3.

**Weintraub H., Tietz A. 1973:** Triglyceride digestion and absorption in the locust, *Locusta migratoria*. *Biochem. Biophys. Acta* 306:31-41.

**Zhou S., Zhang J., Hirai M., Chinzei Y., Kayser H. et al. 2002:** A locust DNA-binding protein involved in gene regulation by juvenile hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 190: 177-85.

## 6. Locust adipokinetic hormones mobilize diacylglycerol selectively

Tomčala A., Bártů I, Šimek P., Kodrík D. (2010) Locust adipokinetic hormones mobilize diacylglycerols selectively. *Comp. Biochem. Phys. B* 156: 26-37.

### Abstract

The diacylglycerols (DG) molecular species and their fatty acid (FA) composition were investigated by electrospray mass spectrometry (ESI-MS) and by gas chromatography with flame ionisation detection (GC-FID) in haemolymph of *Locusta migratoria* after application of adipokinetic hormones Locmi-AKH-I, -II and -III. The analyses showed (1) a heterogeneous distribution of individual DGs in haemolymph after the hormone application. The results revealed that mobilization of the DGs is molecular species-specific with the highest proportion of 34:1 DG (16:0/18:1 - mw 595.0 Da) for all Locmi-AKHs bearing palmitic acid (C16:0) and oleic acid (C18:1) residues, and forming about 20% of the total mobilized DG content. (2) Analysis of fat body triacylglycerols revealed that all Locmi-AKHs mobilize the DGs selectively with the preference of those possessing the C18 and C16 FAs. The fat body FAs with carbon chain longer than 18 did not participate in the mobilization. (3) A distribution of FAs in the DG structures obtained by LC/ESI-MS, and FA analysis by GC-FID after transmethylation indicated a certain degree of Locmi-AKH selectivity toward the mobilized DGs and hence the FAs. The Locmi-AKH-I significantly prefers mobilization of DGs containing unsaturated FAs, while Locmi-AKH-II and -III prefer mobilization of saturated FAs.

### Abstrakt

Pomocí HPLC- ESI-MS (liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry) a GC-FID (gas chromatography with flame ionisation detection) byl zkoumán vliv tří adipokinických hormonů (Locmi-AKH-I, -II a -III) na distribuci různých tříd diacylglycerolů (DG) a jejich mastných kyselin (MK) v hemolymfě *Locusta migratoria*. Výsledky odhalily, že mobilizace DG je druhově specifická. Nejvíce zastoupený DG po aplikaci všech AKH byl 34:1 (m.w. 595.0 Da). Je tvořen palmitovou (16:0) a olejovou (18:1) kyselinou a jeho účast na celkové mobilizaci činí 20%. Analýza tukového tělesa odhalila, že

Locmi-AKH mobilizují DG selektivně a upřednostňují DG, které obsahují MK C16 a C18. MK z tukového tělesa, které mají řetězec delší než 18 uhlíků, se neúčastní mobilizace. Distribuce MK v DG struktuře získané HPLC-ESI-MS a analýza MK pomocí GC-FID po předchozí trasmetylaci naznačuje jistý stupeň selectivity Locmi-AKH. Locmi-AKH-I přednostně mobilizuje DG obsahující nenasyčené MK, zatímco Locmi-AKH-II a -III preferenčně mobilizují nasycené MK.

Oba dva autoři (Tomčala A. a Bártů I.) se na práci podíleli rovnoměrně 40%.

Práce je publikována.

## 7. Analysis of lipids mobilized by adipokinetic hormones in the firebug *Pyrrhocoris apterus* (L.)

**Bártů I., Tomčala A., Socha R., Šimek P., Kodrík D.** (2010) Analysis of lipids mobilized by adipokinetic hormones in the firebug *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) *Eur. J. Entomol.* 107: (in press).

### Abstract

An effect of two adipokinetic hormones (Pyrap-AKH and Peram-CAH-II) on distribution of diacylglycerol (DG) molecular species and their fatty acid (FA) constituents were investigated by liquid chromatography (HPLC) - electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) in haemolymph of the firebug *Pyrrhocoris apterus*. The results show that DGs with characteristic FAs are preferentially mobilized from fat body (FB) by the action of both AKHs produced by *P. apterus*. Both the macropterous and brachypterous morphs show very close DG and FA profiles. A separate action of the Pyrap-AKH and the Peram-CAH-II, however, exerts distinct differences in FA distribution at the macropterous morph. It seems that partially C16 and mainly unsaturated C18 FAs play a dominant role in the AKH action with an exclusive position of linoleic acid (18:2) which represents 50 - 60% of the total DG mobilization. The metabolically active C16 and C18 FAs are preferentially absorbed from the linden seeds and accumulated in the FB. The relationships between the AKH action and FA distribution in DGs in *P. apterus*, and in other insect species are summarized and discussed in detail.

### Abstrakt

Pomocí HPLC- ESI-MS (liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry) byl zkoumán vliv dvou adipokinetických hormonů (Pyrap-AKH a Peram-CAH-II) na distribuci různých tříd diacylglycerolů (DG) a jejich mastných kyselin (MK) v hemolymfě *Pyrrhocoris apterus*. Výsledky odhalily, že po aplikaci obou AKH produkovaných *P. apterus* jsou přednostně mobilizovány z tukového tělesa DG s charakteristickými MK. Obě dvě morfy (makropterní a brachypterní) mají velmi podobné DG a MK profily. Samostatný vliv Pyrap-AKH a Peram-CAH-II se projevuje zřetelnými rozdíly v distribuci MK pouze u makropterní formy. Zdá se, že C16 a nenasycené C18 MK

hrají dominantní roli v působení AKH, kdy hlavní postavení má kyselina linolová (18:2), která reprezentuje 50-60% z celkově mobilizovaných DG. Metabolicky aktivní C16 a C18 MK jsou přednostně absorbovány z lipových semínek a akumulovány v tukovém tělese. Vliv AKH na distribuci MK v DG u *P. apterus* a dalších druhů hmyzu je shrnuto a detailně diskutováno.

Bártů I. se na práci podílela 60%.

U práce probíhají korektury před vytištěním.



## **8. Adipokinetic hormone (Pyrap-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug *Pyrrhocoris apterus*.**

**Kodrík D., Bártů I., Socha R.** (2010) Adipokinetic hormone (Pyrap-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Pest Manag. Sci.* 66: 425-431.

### **Abstract**

**BACKGROUND:** Adipokinetic hormones (AKHs) are insect neuropeptides controlling stress situations including those elicited by insecticide treatment. The effect of Pyrap-AKH on the mortality of the firebug *Pyrrhocoris apterus* treated by the insecticide permethrin (Ambush 25 EC) was studied.

**RESULTS:** Co-injection of 50 ng permethrin with 80 pmol Pyrap-AKH induced a significant 2.3 fold increase in the bug mortality compared to the insecticide alone. The results were confirmed also by topical co-application of both agents (400 ng and 80 pmol, respectively). Injections of 50 and 100 ng permethrin elicited significant increase of the AKH level in CNS and the haemolymph. The results indicate an involvement of AKH in stress response to permethrin. The enhanced effect of insecticide by AKH treatments probably results from the stimulatory role on bug metabolism: the carbon dioxide production was increased 3.5 and 2.5 times, 1 and 3 hours after the permethrin treatment, respectively, and 4.3 and 3.4 times after the permethrin plus AKH co-treatment, compared to control.

**CONCLUSION:** The elevation of metabolism could intensify the permethrin action by its faster penetration into tissues and by stimulation of biochemically active cells, and could be a reason for enhanced action of permethrin after its co-treatment with Pyrap-AKH.

### **Abstrakt**

Adipokinetické hormony jsou hmyzí neuropeptidy kontrolující stresové situace, které mohou být vyvolány i působením insekticidu. Byl studován vliv Pyrap-AKH na mortalitu *Pyrrhocoris apterus* po ošetření insekticidem permethrinem (Ambush 25 EC).

Ko-injekce 50 ng permethrinu a 80pmol Pyrap-AKH způsobí 2,3x větší nárůst mortality než samotný insekticid. Tyto výsledky byly potvrzeny i topikální aplikací obou látek (400 ng a 800pmol). Injekce 50 a 100 ng permethrinu vyvolá nárůst hladiny AKH v CNS a v hemolymfě. Výsledky naznačují zahrnutí AKH ve stresové reakci způsobené permethrinem. Zvýšení účinku insekticidu po AKH může vyplývat ze stimulace hmyzího metabolismu: produkce CO<sub>2</sub> byla 3,5x a 2,5x zvýšena po 1 a 3 hodinách působení permethrinu; a 4,3x a 3,4x zvýšena po působení permethrinu a AHK (vs. kontrola).

Zrychlený metabolismu může zesílit účinek permethrinu rychlejším pronikáním látky do tkáně a stimulací biochemicky aktivních buněk, a může být důvodem pro zvýšený účinek permethrinu a jeho koaplikaci s Pyrap-AKH.

Bártů I. se na práci podílela 30%.

Práce je publikována.

## 9. Shrnutí

Tato dizertační práce shrnuje vliv AKH na spektrum mobilizovaných lipidů u modelových druhů *L. migratoria* a u *P. apterus*. Její výsledky přispívají k řešení problematiky, proč mají některé druhy hmyzu více než jeden AKH. Práce studuje také vztah AKH k lipidovému energetickému metabolismu ve stresové situaci vyvolané působením insekticidu a naznačuje, že AKH by v budoucnu mohly zasáhnout do problematiky kontroly hmyzích populací.

- U *L. migratoria* mobilizace DG a/nebo MK z tukového tělesa po aplikaci AKH není jednotná. Jednotlivé druhy DG jsou mobilizovány selektivně. Jsou preferovány DG, které obsahují MK s řetězcí dlouhými 16 nebo 18 uhlíků, především nenasycená kyselina olejová. Byla také pozorována částečná specifická jednotlivých AKH k určitým DG nebo MK s tím, že Locmi-AKH-I preferuje mobilizaci nenasycených MK (hlavně linoleovou kyselinu), zatímco Locmi-AKH-II a Locmi-AKH-III preferují nasycené MK (většinou stearovou a myristovou kyselinu).
- Po aplikaci AKH u *P. apterus* jsou hlavními přenášenými lipidy v hemolymfě DG, které obsahují MK o délce řetězce 16 nebo 18 uhlíků. Byla také pozorována částečná preference MK mobilizovaných po aplikaci AKH, tato volba je téměř identická u obou morf *P. apterus*. Pouze u makropterní formy byl zaznamenán rozdíl v profilech MK po aplikaci Pyrap-AKH-I a Peram-CAH-II. MK, které se účastní mobilizace lipidů, jsou prioritně absorbovány z lipového semínka, základní potravy *P. apterus*, a ukládány v tukovém tělese.
- U *P. apterus* vede působení insekticidu permethrinu ke zvýšenému titru AKH v hemolymfě, ale i v CNS, což naznačuje zapojení těchto hormonů do obranných mechanismů vůči insekticidnímu působení. Koaplikace AKH a permethrinu zesiluje účinek permethrinu, který se projeví průkazným nárůstem mortality. Bylo navrženo vysvětlení, že za tento fenomén je zodpovědný celkový nárůst metabolismu po aplikaci AKH.