



Přírodovědecká
fakulta
Faculty
of Science

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Katedra molekulární biologie a genetiky

Účinek mutací v adipokinetickém hormonu a corazoninovém receptoru na metabolismus sacharidů a lipidů u *D. melanogaster*

Diplomová práce

Bc. Karolína Svobodová

Školitel: prof. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

České Budějovice, 2020

Svobodová K, (2020): Účinek mutací v adipokinetickém hormonu a corazoninovém receptoru na metabolismus sacharidů a lipidů u *D. melanogaster*. [The effect of mutations in adipokinetic hormone and corazonin on carbohydrate and lipid metabolism of *D. melanogaster*. Mgr. Thesis, in Czech] – 51 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

In *D. melanogaster*, metabolic homeostasis is regulated by an interplay between insulin-like peptides and glucagon-like neuropeptides. Here we examined the influence of corazonin receptor (CrzR) mutations on levels of circulating saccharides, circulating lipids and starvation resistance. We also verified the interaction between null mutations of corazonin receptor and adipokinetic hormone and checked their influence on insulin signaling.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské 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 systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 20.5.2020

Bc. Karolína Svobodová

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. Michalovi Žurovci za možnost pracovat na tak zajímavém tématu a za ochotu, s níž mi vždy pomohl. Obrovský dík patří také Dr. Lucii Kučerové, která na mne dohlížela celou dobu mé práce v této laboratoři, uvedla mne do dané problematiky a naučila potřebné metodické úkony. Dále bych chtěla poděkovat všem členům Laboratoře molekulární genetiky a Střediska mikroskopie a histologie za ochotu, cenné rady a přátelský přístup. Speciálně děkuji své rodině a příteli za všestrannou podporu, bez které by tato práce nemohla vzniknout.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Metabolismus sacharidů a lipidů u hmyzu.....	1
1.2. Mobilizace energetických zásob.....	2
1.3. Regulace mobilizace energetických zásob.....	3
1.4. Adipokinetické hormony.....	4
1.5. Corazonin.....	4
1.6. Receptory pro AKH a CRZ.....	5
1.7. Koevoluce AKH/AKHR, CRZ/CRZR, ACP/ACPR.....	6
2. Cíle práce.....	8
3. Materiál a metody.....	9
3.1. Chov octomilek.....	9
3.2. Příprava dvojného mutanta.....	9
3.3. Ověření dvojného mutanta.....	12
3.3.1. Izolace DNA.....	12
3.3.2. PCR – polymerázová řetězová reakce.....	12
3.3.3. Gelová elektroforéza.....	13
3.3.4. Měření genové exprese.....	13
3.3.5. Izolace RNA.....	14
3.3.6. Reverzní transkripce.....	15
3.3.7. Kvantitativní PCR v reálném čase (q RT PCR).....	15
3.4. Stanovení hladin sacharidů a lipidů.....	17
3.4.1. Příprava testovaných larev vyvíjejících se na definovaném médiu.....	17
3.4.2. Odběry hemolymfy z larev.....	17
3.4.3. Stanovení hladiny cirkulujících sacharidů u larev pomocí anthronového činidla	17
3.5. Měření efektu injikovaného CRZ na obsah celkových sacharidů v těle dospělého ..	18
3.6. Stanovení obsahu cirkulujících lipidů u larev pomocí sulfo-fosfovanilínového testu	18
3.7. Vážení larev.....	19
3.8. Rezistence vůči hladovění.....	19
3.9. Imunodetekce ILP2 a ILP3.....	20
4. Výsledky.....	21
4.1. Ověření mutantů v <i>CrzR</i>	21
4.2. Konstrukce dvojného nulového mutanta v <i>Akh</i> a <i>CrzR</i>	22
4.3. Rezistence vůči hladovění.....	24

4.4.	Éfekt injekčně podaného roztoku CRZ na metabolismus sacharidů dospělců.....	26
4.5.	Účinky mutací v <i>Akh</i> a <i>CrzR</i> na hladinu cirkulujících sacharidů u larev	27
4.6.	Účinek mutací v <i>Akh</i> a <i>CrzR</i> na inzulínovou signalizaci	28
4.6.1.	Imunodetekce ILP2 a ILP3	29
4.6.2.	Kvantifikace exprese genu <i>Thor</i>	31
4.6.3.	Hmotnost larev	32
4.7.	Účinek mutací v <i>Akh</i> a <i>CrzR</i> na hladinu cirkulujících lipidů.....	33
4.8.	Kvantifikace exprese genu <i>Bmm</i>	34
5.	Diskuze.....	36
5.1.	Vliv <i>Akh</i> a <i>CrzR</i> na hladinu DG a transkripci <i>Bmm</i>	36
5.2.	Vliv <i>Akh</i> a <i>CrzR</i> na metabolismus sacharidů	37
5.3.	Vztah AKH, CRZR a inzulínové signalizace	38
5.4.	Vliv AKH a CRZR na rezistenci vůči hladovění u dospělců	39
6.	Závěr	41
7.	Seznam použitých zkratek.....	42
8.	Seznam literatury	44
9.	Příloha.....	51

1. Úvod

Udržování homeostázy je extrémně důležitá vlastnost organismu, která mu umožňuje vyrovnávat se se změnami vnějšího prostředí a uchovat si své biologické funkce. Mnohobuněčné organismy se musejí neustále potýkat s fluktuacemi energetických substrátů, způsobených např. zvýšeným výdejem energie nebo nedostatečným přísunem živin. Pro udržení metabolické homeostázy je nezbytná kompenzace těchto výkyvů, která je zajištěna regulací metabolismu sacharidů a lipidů (Hardie, 2012).

1.1. Metabolismus sacharidů a lipidů u hmyzu

Během životního cyklu hmyzu často dochází k situacím, které vyžadují velké množství energie – ať už se jedná např. o proces metamorfózy u hmyzu s dokonalou proměnou, zdolávání větších vzdáleností pomocí letu nebo o proces reprodukce. Kromě toho se hmyz také musí vyrovnat s nedostatkem potravy při nepříznivých podmínkách prostředí. Z toho důvodu si v době dostatečného přísunu živin buduje značné energetické zásoby – zásobní sacharidy ve formě polymerního glykogenu a lipidy uloženy jako triglyceridy (Lorenz a Gäde, 2009).

Důležitou složku hmyzí potravy tvoří sacharidy. Polysacharidy z potravy jsou hydrolyzovány ve střevě na glukózu, ta poté prochází přes střevní epitel do hemolymfy a následně do tukového tělesa. Zde je glukóza působením enzymu trehalóza-6-fosfátsyntáza rychle konvertována na trehalózu (Matsuda et al., 2014). Trehalóza je neredukující disacharid, který je hlavní sacharidovou složkou hmyzí hemolymfy. Po dosažení určité koncentrace trehalózy je její syntéza zastavena a glukóza je působením enzymu glykogen syntáza ukládána ve formě glykogenu. U dospělých much jsou glykogenové zásoby lokalizovány především v tukovém tělese a létacích svalech, kdežto larvy ukládají glykogen hlavně ve svalech tělní stěny (Roach et al., 2012).

Dalším významným energetickým substrátem jsou lipidy. Hlavní zásobní formou lipidů jsou triglyceridy (TG), molekuly glycerolu se třemi mastnými kyselinami připojenými esterovými vazbami. TG jsou formovány esterifikací diglyceridů (DG) vzniklých např. degradací fosfolipidů, či z kyseliny fosfatidové produkované glycerol fosfátovou dráhou (Canavoso et al., 2001). Hlavním místem akumulace TG je tukové těleso. Adipocyty tukového tělesa mají pro lipidy větší zásobní kapacitu než glykogen. Navíc lipogeneze bývá před syntézou glykogenu upřednostněna. Například u samic *A. aegypti* je 50 % glukózy přijaté

stravou použito pro syntézu lipidů a 35 % pro syntézu glykogenu (Zhou et al., 2004). TG totiž obsahují přibližně osmkrát vyšší kalorický podíl na jednotku hmotnosti a pro organismus jsou proto výhodnější energetické zásoby ve formě tuků (Downer a Matthews, 1974).

Akumulace energetických zásob je řízena především inzulínovou signalizací (Semiuk et al., 2018), která je jedním z klíčových regulátorů rovnováhy mezi uloženými a cirkulujícími sacharidy. U *D. melanogaster* bylo popsáno celkem 8 ILP, které se podílejí nejen na regulaci metabolické homeostázy, ale také na vývoji stresových reakcí a délce života (Teleman, 2010).

Tyto peptidy aktivují inzulínový receptor a spouštějí tím intracelulární kaskádu, která je evolučně velmi konzervovaná. Signál od ILP je přenášen přes inzulínový receptor a jeho substrát CHICO na fosfatidylinositol 3-kinázu (PI3K), která konvertuje fosfatidylinositolbisfosfát (PIP2) na fosfatidylinositoltrisfosfát (PIP3). Ten aktivuje protein kinázu B (dAkt), která fosforyluje transkripční faktor dFOXO. Fosfatidylinositoltrisfosfát-3-fosfatáza (PTEN) konvertuje PIP3 zpátky na PIP2, čímž inzulínovou dráhu negativně reguluje (Grutenko a Rauschenbach, 2017).

Působení inzulínové signalizace u *D. melanogaster* způsobuje akumulaci glykogenu a zásobních TG (DiAngelo a Birnbaum, 2009), potlačuje glukogenezi a indukuje glykolýzu (Musselman et al., 2011). Kromě toho také reguluje příjem potravy (Nassel et al., 2013). Zdá se, že na regulaci metabolismu se podílejí především ILP2, 3, 5 a 6.

ILP2, 3 a 5 jsou produkovány dvěma skupinami celkem 14 neurosekretorických buněk mozku, tzv. inzulín produkujícími buňkami (IPC). Ablace těchto buněk způsobuje hyperglykémii, což ukazuje, že peptidy produkované IPC mají podobnou funkci jako savčí inzulín (Rulifson et al., 2002). Oproti tomu ILP6, produkováný tukovým tělesem, má k těmto peptidům opačný účinek. Jeho působení zvyšuje hladinu cirkulujících sacharidů a potlačuje transkripci ILP2, 3 a 5 (Suzawa et al., 2019).

1.2. Mobilizace energetických zásob

Přestože k mobilizaci energetických zásob dochází po celý život jedince, jejich fyziologický význam se v různých životních etapách liší. Zatímco v larválním stádiu je mobilizace zásob nezbytná především pro metamorfózu a přechody mezi jednotlivými vývojovými stádii, pro dospělé mají zásoby význam především pro pokrytí energetického požadavku během pohybových aktivit a pro reprodukci.

Larvy hmyzu s dokonalou proměnou procházejí několika larválními instary a stádiem kukly. Larva konstantně přijímá potravu, dochází k intenzivnímu dělení buněk a zvětšování

organismu. Po dosažení plné velikosti se prudce zvýší koncentrace ekdysteroidů, která započiná proces svlékání. Ke svlékání dochází během larválního vývoje několikrát, až larva dosáhne plné velikosti. Poté je uvolněna velká dávka ekdysteroidů (u některých druhů hmyzu dvě dávky) a ta započne proces metamorfózy v rámci stádia kukly. Během metamorfózy je larvální organismus kompletně reorganizován v dospělé. Tyto procesy jsou energeticky velmi náročné a vyžadují intenzivní mobilizaci glykogenu. Mobilizaci glykogenu katalyzuje enzym glykogen fosforyláza, který odštěpuje trehalózu z konců glykogenového řetězce. Během metamorfózy často dochází k jeho úplnému vyčerpání, proto je nedostatek energetických zásob během metamorfózy spojený s vysokou mortalitou (Arrese a Soulages, 2010).

Energeticky nejvíce náročnou činností dospělé hmyzu je let. Létací svaly mají pouze omezenou zásobní kapacitu, proto energii získávají mobilizací a transportem zásob z tukového tělesa. V první řadě dochází ke štěpení glykogenu, za současného uvolnění trehalózy a po jeho vyčerpání je energie získávána ze zásobních TG (Robinson a Goldsworthy, 1979). Štěpení TG katalyzují lipázy za vzniku DG, jenž je ve vazbě na nízkodenzitní lipoforin transportován hemolymfou. Komplex nízkodenzitních lipoforinů je hydrolyzován lipoforin lipázami, čímž se odštěpují mastné kyseliny a glycerol (Chino a Downer, 1982). Létací sval přijímá mastné kyseliny pomocí transportních proteinů podobných savčím FAT/CD36 (Brinkmann et al., 2002). Mastné kyseliny pak v mitochondriích následně podléhají beta oxidaci mastných kyselin (Canavoso et al., 2001).

Zásoby energie jsou nutné také pro plodnost jedince. Pro správný vývoj vajíček je nezbytný transport energeticky bohatých molekul z tukového tělesa do vaječnicků (Arrese a Soulages, 2010).

1.3. Regulace mobilizace energetických zásob

Mobilizace energetických zásob je zprostředkována především adipokinetickými hormony (AKH) a příbuznými peptidy. Jejich produkce je lokalizována v neurosekretorických buňkách *corpora cardiaca*, odkud jsou v případě potřeby uvolněny do hemolymfy a transportovány do tukového tělesa (Kim a Rulifson, 2004). Adipocyty tukového tělesa jsou opatřeny receptory pro adipokinetický hormon (AKHR), jež se po navázání ligandu aktivují a vyvolávají kaskádu reakcí vedoucí k aktivaci enzymů štěpících glykogen a TG.

Úloha AKH v mobilizaci energetických zásob byla zkoumána u celé řady hmyzích druhů, včetně *D. melanogaster*. Ztráta funkce AKH u *D. melanogaster* má za následek

zvýšenou hladinu tukových a glykogenových zásob a sníženou hladinu cirkulujících sacharidů a DG (Gálíková et al., 2015). U nulových mutantů v *Akh* byla zjištěna také vyšší rezistence vůči hladovění (Sajwan et al., 2015). Navíc v souladu s funkcí AKH při mobilizaci energie, injekčně vpravený AKH peptid výrazně zvyšuje hladinu jednoduchých sacharidů (Kučerová, nepublikovaná data).

1.4. Adipokinetické hormony

AKH tvoří rodinu malých peptidických hormonů, která zahrnuje přes 60 členů a byla nalezena u více než 80 druhů hmyzu (Gäde et al., 2008). U některých druhů hmyzu, např. *B. mori*, bylo nalezeno více rozdílných AKH i jejich receptorů (Roller et al., 2008).

Všechny nalezené hmyzí AKH peptidy mají některé společné znaky, zejména jejich délky se pohybují v rozmezí osmi až deseti aminokyselin. Kromě toho byly u všech popsány posttranslačně modifikované konce (pyroglutamátový zbytek na N-konci a karboxyamid na C-konci), dvě aromatické aminokyseliny na čtvrté a osmé pozici a velmi i často asparagin na sedmé pozici (Gäde, 2009).

Značná strukturní podobnost s AKH byla zjištěna také u dalších peptidů, včetně corazoninu (CRZ) (Obr. 1) a AKH/CRZ příbuzného peptidu (ACP), se kterými AKH zřejmě sdílí společný původ (Hansen et al., 2010).

Drome-AKH	pGlu-Leu-Thr-Phe ----- Ser-Pro-Asp-TrpNH₂
Drome-CRZ	pGlu ----- Thr-Phe-Gln-Tyr-Ser-Arg-Gly-Trp-Thr-AsnNH₂

Obr. 1: Sekvence peptidů Drome-AKH a Drome-CRZ má pět společných aminokyselin.

1.5. Corazonin

Corazonin je jedenáctiaminokyselinový neuropeptid, produkováný v dorsolaterálních neuronech *pars cerebralis* (Choi et al., 2005). Veenstra (1989) poprvé identifikoval tento peptid u *P. americana*, později byl identický nebo velmi podobný peptid popsán u zástupců rodu *Orthoptera* (Hua et al., 2000), *Lepidoptera*, *Hymenoptera* a *Diptera* (Nassel, 2002).

CRZ je u hmyzu velmi rozšířený a má vysoce konzervovanou strukturu. Jediné rozdíly v aminokyselinové sekvenci lze identifikovat na sedmé pozici, kde se vyskytuje buď Thr, nebo Gln. Některé druhy hmyzu vzácně vykazují i jiné rozdíly, např. *A. mellifera* – Thr⁴ a His⁷ (Roller et al., 2006), čeled' *Mantophasmatidae* – His⁴ a Gln⁷ (Predel et al., 2007).

I přes vysoce konzervovanou strukturu CRZ peptidu bylo u různých druhů hmyzu popsáno velmi odlišné fyziologické působení – kardiostimulace u *P. americana* (Veenstra, 1989), indukce kutikulární pigmentace u *L. migratoria* (Tawfik et al., 1999) či regulace délky larválního vývoje u *B. mori* (Tanaka et al., 2002). U *D. melanogaster* byl zjištěn vliv CRZ na spermatogenezi a sexuální chování (Zer-Krispil et al., 2018) a podíl na řízení stresové odpovědi a metabolismu (Kapan et al., 2012; Sha et al., 2013; Kubrak et al., 2016).

Metabolické působení CRZ bylo zkoumáno především u *D. melanogaster*. Sha et al. (2013) vytvořili mouchy s nulovou mutací v *CrzR*, u nichž zjistili výrazně změněný metabolismus etanolu vlivem zvýšené akumulace acetaldehydu. Kapan et al. (2012) použitím RNA interference umlčeli *Crz* geny v CRZ produkujících neuronech a poté u těchto much pozorovali značné zvýšení rezistence vůči hladovění. Kubrak et al. (2016) se podrobněji zaměřili na metabolismus sacharidů po umlčení genu *CrzR* v tukovém tělese. Kromě zvýšené rezistence vůči hladovění zjistili, že během hladovění dochází u těchto much k pomalejšímu vyčerpávání zásobních sacharidů a lipidů. Navzdory nižšímu příjmu potravy měly tyto mouchy vyšší tělesnou hmotnost a vyšší glykogenové zásoby. Výsledky těchto prací ukazují na velmi podobné metabolické účinky CRZ a AKH.

1.6. Receptory pro AKH a CRZ

AKHR a CRZR patří mezi receptory spřažené s G-proteiny (GPCR). Všechny GPCR mají podobnou topografickou strukturu, která byla evolucí dobře konzervována (Caers et al., 2012). Procházejí sedmkrát cytoplazmatickou membránou a jednotlivé transmembránové domény jsou spojeny třemi intracelulárními smyčkami a třemi extracelulárními smyčkami. Dále mají extracelulární N-konec, který obsahuje několik glykosylačních míst a intracelulární C-konec s fosforylačními místy.

AKHR a CRZR patří do rodiny receptorů podobných rhodopsinu, největší podrodiny GPCR. Vyznačují se DRY motivem na okraji cytoplazmatického konce třetí transmembránové domény a NSxxNPxxY motivem v sedmé doméně (Oldham a Hamm, 2008). Bylo zjištěno, že tyto motivy jsou důležité pro aktivaci GPCR (Ballesteros et al., 2001).

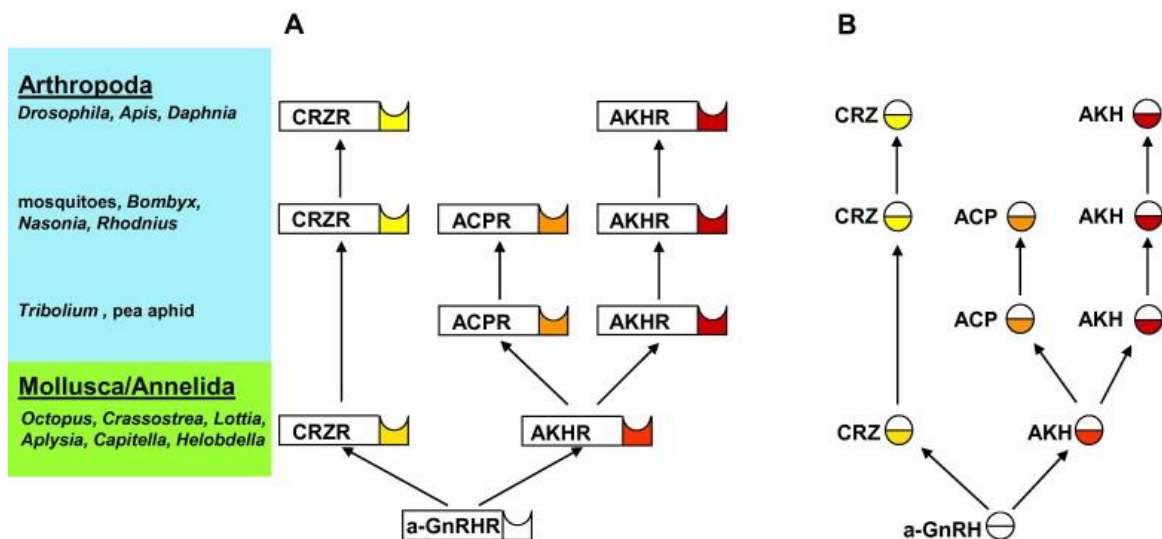
Některé výzkumy naznačují, že AKHR aktivují dvě dráhy takzvaných „druhých posílů“ a působí přes cAMP prostřednictvím G α s proteinu a také tak i Ca $^{2+}$ pomocí proteinu (Vroemen et al., 1998; Yang et al., 2013). G α q proteiny působí na enzym fosfolipázu C štěpící fosfatidylinositolbisfosfát za vzniku inositoltrifosfátu. Inositoltrifosfát uvolňuje vápenaté ionty z endoplasmatického retikula a způsobuje příliv extracelulárních vápenatých iontů, jež

spouští kalcium-kalmodulinovou kaskádu (Berridge et al., 1995). Vazbou s vápenatými ionty změni kalmodulin svou konformaci a tím spustí aktivaci kalmodulin-dependentních proteinkináz, např. glykogen fosforylázu (Gäde et al., 1991). V druhém případě aktivace proteinu *Gas* stimuluje aktivitu adenylátcyklázy štěpící ATP na cAMP. Vzrůstající koncentrace cAMP aktivuje cAMP dependentní proteinkinázy, např. proteinkinázu A, které fosforylují cílové enzymy, např. glykogen fosforylázu (Van Marrewijk et al., 1993).

1.7. Koevoluce AKH/AKHR, CRZ/CRZR, ACP/ACPR

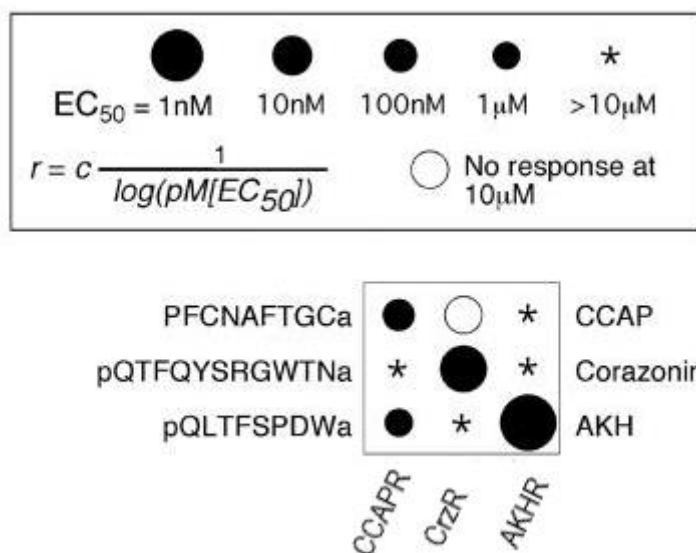
Další zajímavé podobnosti odhalil výzkum genomických dat receptorů gonadoliberinů (GnRH) u obratlovců a receptorů AKH, ACP a CRZ u členovců. Na základě sekvenování a srovnávání sekvencí se podařilo získat podklady pro navrzení hypotézy o koevoluci těchto receptorů i jejich ligandů, která předpokládá, že tyto proteiny jsou blízce příbuzné a mají společný původ (Hansen et al., 2014).

V době zhruba před 700 miliony lety došlo u prvoústých k duplikaci genu ancestrálního GnRH a jeho receptoru. Tato duplikace měla za následek u měkkýšů a kroužkoců vznik genu *Crz* a jeho receptoru a genu pro peptid podobný AKH a jeho receptoru (Hauser a Grimmelikhuijzen, 2014). U genu pro peptid podobný AKH a jeho receptoru následně proběhla další duplikace, která vedla ke vzniku *Akh/AkhR* a *Acp/AcpR* u hmyzí linie a umožnila vznik nezávislých hormonálních signalizací AKH, ACP a CRZ (Roch et al., 2014).



Obr. 2: Navržený model koevoluce AKHR, CRZR, ACPR a jejich ligandů (Hansen et al., 2014).

Park et al. (2003) klonoval různé GPCR *D. melanogaster* do oocytů *X. laevis* za účelem sledování specificity vazby ligand-receptor. Zjistil, že mezi AKH/AKHR, CRZ/CRZR a kardioaktivním peptidem korýšů (CCAP) a jeho receptorem existuje zkřížená reaktivita, tzn., že tyto receptory mohou být aktivovány i jinými ligandy. Toto zjištění podporuje hypotézu o koevoluci, protože je pravděpodobné, že i receptory reagují na peptidy, které jsou k jejich ligandům příbuzné.



Obr. 3: Přehled specificity vazby ligand-receptor pro AKHR, CRZR, CCAPR. Je patrné, že receptory nejlépe reagují na svůj specifický ligand, kdy k aktivaci AKHR stačí 0,3 nM AKH, CRZR reaguje na CRZ peptid o koncentraci 1 nM. Při zvýšení koncentrace peptidů nad 10 μM dochází k aktivaci AKHR oběma příbuznými ligandy, CRZR je aktivován CRZ a AKH, na CCAP nereaguje (Park et al., 2013).

Přestože CRZ a AKH jsou pravděpodobně blízce příbuzné a mají podobné účinky na metabolismus *D. melanogaster*, jejich vzájemný vztah v organismu zatím ještě nebyl objasněn. Z toho důvodu jsme se rozhodli vytvořit dvojného nulového mutanta v drahách AKH a CRZ a ověřit, zda existuje vzájemný účinek těchto drah v mobilizaci sacharidových a lipidových zásob a ve vztahu vůči k inzulínové signalizaci.

2. Cíle práce

Pro udržení metabolické rovnováhy je klíčová součinnost akumulace a mobilizace energetických zásob, která je u *D. melanogaster* zajišťována antagonistickým působením signalizací inzulínů a AKH. Zdá se však, že na regulaci mobilizace energetických zásob se kromě AKH podílejí i jiné neuropeptidy, např. CRZ. Protože vzájemný vztah mezi účinky signalizací AKH a CRZ není jasný, pro jejich studium navrhujeme použít genetickou analýzu příslušných mutantů.

Tato práce měla následující cíle:

1. Ověření existujících mutantů v *CrzR*.
2. Prověření některých vzájemných vztahů mezi signalizacemi AKH a CRZ.
3. Účinky mutací v *Akh* a *CrzR* na hladinu cirkulujících sacharidů a lipidů.
4. Vztah *Akh* a *CrzR* k inzulínové signalizaci.

3. Materiál a metody

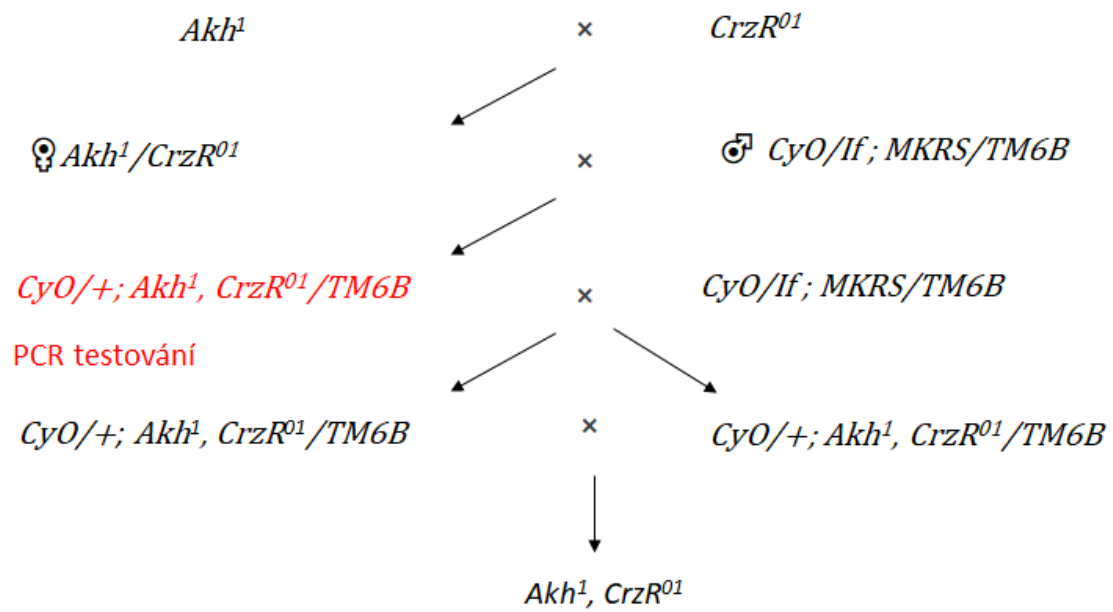
3.1. Chov octomilek

Pro chov octomilek se v naší laboratoři používají skleněné vialky s vatovou zátkou. Vialky obsahují zhruba 5 ml standardního média (8 % kukuřičná mouka, 5 % cukr, 1 % agar a 4 % kvasnice), které slouží jako potrava pro larvy i dospělé. Do jedné skleněné vialky dáváme přibližně 40 much a 14 dní uchováváme v termostatu (25 °C, 70% vlhkost vzduchu, světelná perioda 12 hod světlo/12 hod tma). Po této době jsou mouchy přemístěny do vialek s čerstvým médiem. Genotypy chovaných octomilek jsou uvedeny v Tabulce 1.

3.2. Příprava dvojného mutanta

Pro získání dvojného mutanta s nefunkční AKH a CRZ signální dráhou byly kříženy mouchy *Akh¹* a *CrzR⁰¹*. Oba studované geny (*Akh* a *CrzR*) se nachází na 3. chromozomu, z toho důvodu bylo nutné křížit mouchy tak, aby se homologní rekombinací chromozomů dostaly obě mutace na jeden chromozom zároveň. Mutanti *Akh¹* a *CrzR⁰¹* byli zkříženi a jejich heterozygotní potomstvo bylo spáreno s mouchami s balancovaným třetím chromozomem (*w¹⁸⁸⁸*; *Cyo/If*; *MKRS/TM6B*). Mezi potomky těchto much byli přítomni dvojní mutanti, ale mutace nebyly opatřeny žádným markerem. Z toho důvodu byli virginelní samičky a samečkové této generace odděleni po jednotlivcích a spáreni s mouchami s balancovaným třetím chromozomem (*w¹⁸⁸⁸*; *Cyo/If*; *MKRS/TM6B*).

Po naklazení dostatečného počtu vajíček byli potenciální dvojní mutanti usmrceni a testováni pomocí specifických primerů a polymerázové řetězové reakce (PCR). Potomci ověřených dvojných mutantů byli kříženi mezi sebou, z čehož jsme obdrželi dvojné mutanty v homozygotním stavu (Obr. 6). Sjedení genetického pozadí jsme z časových důvodů neprováděli, proto je u dvojného mutanta neznámé. Jako kontrolní genotypy jsme u dvojného mutanta *Akh¹*, *CrzR⁰¹* používali *w* a *yw*.



Obr. 4: Schéma křížení dvojného mutantu $Akh^1, CrzR^{01}$.

Tabulka 1: Charakteristika octomilek použitých v této práci.

Genotyp	Mutovaný chromozom	Původní publikace	Označení	Popis	Původ
$w^{1118}; Akh^l$	III.	Sajwan et al., 2015	Akh^l	Delece 3 nt (lysin) v genu <i>Akh</i> , která má za následek tvorbu nefunkčního peptidu.	M. Žurovec
$w^{1118}; Akh^{AP}$	III.	Gáliková et al., 2015	Akh^{AP}	Delece genu <i>Akh</i> , vlivem posunutí čtecího rámce také nefunkční sousední gen pro <i>Apr</i> .	R. Kühlein
$w^{1118}; AkhR^{G6244}$	II.	Grönke et al., 2007	$AkhR^l$	Inzerce P elementu v 5' UTR genu <i>AkhR</i> , která způsobuje nulovou mutaci genu.	R. Kühlein
$y^l w^{67c23}; CrzR^{MB00838}$	III.	Nagarkar-Jaiswal et al., 2015	$CrzR^{Minos}$	Inzerce elementu <i>Minos</i> ve 3. intronu genu <i>CrzR</i> .	BDSC
$y^l w^*; CrzR^{MI03082}$	III.	Bellen et al., 2011	$CrzR^{MiMIC}$	Inzerce kazety <i>MiMIC</i> v posledním intronu genu <i>CrzR</i> .	BDSC
$y^l w^{67c23}; CrzR^{01}$	III.	Sha et al., 2014	$CrzR^{01}$	Delece 8 kb úseku v genu <i>CrzR</i> .	J.H. Park
$Akh^l, CrzR^{01}$	III.	Tato práce	$Akh^l, CrzR^{01}$	Delece 3 nt v genu <i>Akh</i> , tvorba nefunkčního peptidu + delece 8 kb úseku v genu <i>CrzR</i> .	M. Žurovec
$w^{1118}; If/CyO; MKRS/TM6B$	II., III.	-		Balancovaný 2. a 3. chromozom.	BDSC
$w^{1118} (1.)$			$w (1)$	Referenční genotyp pro mutantu Akh^l a dvojného mutantu $Akh^l, CrzR^{01}$.	BDSC
$w^{1118} (2.)$		Gáliková et al., 2015	$w (2)$	Referenční genotyp pro mutanty Akh^{AP} a $AkhR^l$.	R. Kühlein
$y^l w^*$		-	yw	Referenční genotyp pro $CrzR^{Minos}$, $CrzR^{MiMIC}$, $CrzR^{01}$ a dvojného mutantu $Akh^l, CrzR^{01}$.	BDSC

3.3. Ověření dvojného mutantu

3.3.1. Izolace DNA

Testovaná moucha byla homogenizována ve směsi 50 µl 50 × „squishing“ pufru (10 mM Tris-Cl pH 8.2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl) a 1,25 µg proteinázy K (Promega). Směs byla 1 hod. zahřívána při 56 °C v blokovém termostatu a pro inaktivaci enzymu byla teplota následně zvýšena na 94 °C po dobu 10 min. Takto připravený vzorek byl protřepán, krátce odstředěn a použit jako templát pro PCR.

3.3.2. PCR – polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce je založena na cyklicky se opakujícím kopírování určitých úseků DNA, které jsou vymezeny uměle vytvořenými oligonukleotidy, tzv. primery. Reakce se účastní enzym polymeráza, který za přítomnosti nukleotidů syntetizuje nová vlákna po vzoru obou původních vláken, koncentrace nových kopií tak exponenciálně vzrůstá. Pravidelnými změnami definovaných teplot dochází ke střídání fází PCR reakce (Mullis, 1990).

Reakční směs (pro 1 reakci) měla celkový objem 10 µl a obsahovala 1× DreamTag Green PCR Master Mix (ThermoFisher), 0,25 µM 5' primeru, 0,25 µM 3' primeru a 1 µl z izolace DNA „squishing“ pufrům. Tato směs byla napipetována do PCR zkumavky a vložena do termocykléru (ProGene). Použité primery jsou popsány v Tabulce 2, program PCR reakce je uveden v Tabulce 3.

Tabulka 2: Primery použité pro ověření dvojného mutantu *Akh^l*, *CrzR^{0l}*.

Testovaný gen:	5' - 3' primer:	Teplota:	Produkt:
<i>CrzR^{0l}</i>	CATACCAATGCATTTTCGTCTCA	62 °C	~ 2,5 kb
	CCGGAAGAGTAGGGTATTGG		
<i>Akh^l</i>	CTCATTTTATTTTCCTCTATATAGACC	56 °C	~ 150 pb
	ATTGTTGAGAAAGGAGTGTTTC		
<i>Akh^{wt}</i>	CTCATTTTATTTTCCTCTATATAGTTGA	54 °C	~ 150 pb
	ATTGTTGAGAAAGGAGTGTTTC		

Tabulka 3: Program PCR použitý pro ověření dvojného mutantu *Akh¹*, *CrzR⁰¹*.

Opakování:	Krok reakce:	Teplota:	Čas:
1 ×	Predenaturace	94 °C	2 min.
	Denaturace	94 °C	30 sek.
35 ×	Nasedání primerů (Ta)	dle primerů	30 sek.
	Prodlužování	72 °C	30 sek.
1 ×	Finální prodlužování	72 °C	1 min.

3.3.3. Gelová elektroforéza

Tato metoda je založena na oddělení fragmentů nukleových kyselin o rozdílné velikosti. K oddělování různě dlouhých fragmentů dochází díky migraci záporně nabitých molekul nukleových kyselin směrem ke kladně nabitě elektrodě, migrační rychlost fragmentů se však liší v závislosti na jejich velikosti (Kirkpatrick, 1991).

Nejprve byl připraven 1% agarový gel v 1× TAE pufru (40 mM Tris; 20 mM kyselina octová; 1 mM EDTA) s přídatkem 0,01 µg etidium bromidu. Po ztuhnutí byl gel v elektroforetické vaničce zalit 1× TAE a do připravených jamek bylo napipetováno 10 µl PCR produktu. Pro kontrolu velikostí separovaných fragmentů bylo na gel napipetováno také 5 µl velikostního markeru (100 bp DNA Ladder Ready to Load, Solis Biodyne). Elektroforetická separace DNA fragmentů probíhala 40 min. při elektrickém napětí 100 V. Velikosti oddělených PCR produktů byly následně vyhodnoceny pod UV zářičem (Ultraviolet Transluminator, UVP).

3.3.4. Měření genové exprese

Tento test byl proveden pro kvantifikaci transkriptů požadovaných genů. Nejdříve byla izolována celková RNA, po jejímž vzoru byla enzymem reverzní transkriptáza vytvořena cDNA. Relativní genová exprese byla dále zjišťována pomocí kvantitativní RT PCR.

Pro měření exprese *CrzR* bylo použito 30 dospělých sameček much *CrzR⁰¹*, *CrzR^{Minos}*, *CrzR^{MiMIC}* o stáří 3 dnů. Jako kontrolu jsme použili 30 dospělých sameček *yw* stejného stáří.

Dále jsme měřili expresi genů *Bmm* a *Thor* 20 larev ve 3. instaru mutantů *Akh¹*, *CrzR⁰¹*, dvojného mutantu *Akh¹*, *CrzR⁰¹*. Jako kontroly bylo použito 20 larev ve 3. instaru genotypu *yw* a *w*.

3.3.5. Izolace RNA

Pro izolaci RNA byla použita metoda izolace nukleových kyselin směsí fenolu a chloroformu. Princip této metody spočívá v oddělení nukleových kyselin a proteinů na základě rozdílné polarit. Zatímco nukleové kyseliny se ochotně rozpouští v polárním vodném roztoku fenolu, který má mnohem menší polaritu, k rozpuštění nukleových kyselin téměř nedochází. Polarita proteinů je dána jednotlivými aminokyselinami, a proto se proteiny koncentrují na rozhraní vodní a fenolové fáze. Odebráním vodní fáze a opakovaným oddělováním jednotlivých fází je možné izolovat velké množství nukleových kyselin (Sambrook et al., 2006).

Při izolaci RNA jsme postupovali následujícím způsobem:

1. Vzorek byl homogenizován teflonovým homogenizérem v 1 ml izolačního média TriReagent (firma MRC) a ponechán 10 min. v pokojové teplotě.
2. Do směsi bylo přidáno 200 μ l chloroformu, směs byla důkladně promíchána, ponechána 2 min. při pokojové teplotě a odstředěna (12 000 \times g, 15 min., 4 °C).
3. Zhruba 80 % vzniklé vodní fáze s obsahem nukleových kyselin bylo přemístěno do nové zkumavky. Zbýlých 20 % vodní fáze i s interfází a trochou fenolové fáze bylo také přemístěno do nové zkumavky, odstředěno (12 000 \times g, 5 min., 4 °C) a 80 % nově oddělené vodní fáze bylo přidáno k již odebrané vodní fázi.
4. Nukleové kyseliny byly vysráženy přidávkem 500 μ l izopropanolu, vzorek byl ponechán 10 min. při pokojové teplotě a odstředěn (12 000 \times g, 10 min., 4 °C).
5. Oddělená tekutina byla opatrně odstraněna, k sedimentu byl přidán 1 ml 75% etanolu a vzorek byl odstředěn (7 500 \times g, 5 min., 4 °C).
6. Etanol byl odstraněn a sediment byl vysušen vystavením vzduchu v otevřené zkumavce po dobu 5 min.
7. Sediment byl rozpuštěn ve 100 μ l destilované vody bez RNáz.

Takto izolovaná RNA byla následně přečištěna pomocí Nucleospin RNA II izolačního kitu (MACHEREY-NAGEL) podle následujícího postupu:

1. 100 μ l izolované RNA bylo smícháno s 300 μ l pufru RA 1 a 300 μ l absolutního etanolu.
1. 700 μ l připravené směsi bylo nanášeno na Nucleospin RNA II izolační kolonku a odstředěno (11 000 \times g, 30 sek., 25 °C).
2. Kolonka byla přemístěna do nové sběrné nádoby.

3. Pro odstranění solí na membráně bylo na kolonku naneseo 350 μ l pufru MDB a kolonka byla odstředěna (11 000 \times g, 1 min., 25 $^{\circ}$ C).
4. Pro odstranění DNA bylo na kolonku aplikováno 95 μ l roztoku rDNázy (poměr rDNázy a reakčního pufru byl 1:9), vzorek byl 15 min. ponechán při pokojové teplotě.
5. Následně byla rDNáza deaktivována přidáním 200 μ l pufru RAW 2, kolonka byla odstředěna (11 000 \times g, 30 sek., 25 $^{\circ}$ C) a přemístěna do nové sběrné nádoby.
6. Na kolonku bylo naneseo 600 μ l pufru RA 3, kolonka byla odstředěna (11 000 \times g, 30 sek., 25 $^{\circ}$ C) a tekutina odstraněna.
7. Poté bylo na kolonku naneseo 250 μ l pufru RA 3, vzorek byl odstředěn (11 000 \times g, 2 min., 25 $^{\circ}$ C) a kolonka byla přemístěna do 1,5 ml zkumavky bez obsahu RNáz.
8. Nakonec byla RNA navázaná na kolonku uvolněna do 60 μ l vody (bez obsahu RNáz) finálním odstředěním (11 000 \times g, 1 min., 25 $^{\circ}$ C).
9. Pro zvýšení koncentrace byl roztok RNA znovu přemístěn na kolonku a odstředěn (11 000 \times g, 1 min., 25 $^{\circ}$ C).
10. Koncentrace a kvalita RNA ve vodném roztoku byla zjištěna použitím přístroje Nanodrop.

Izolovaná RNA byla následně použita pro tvorbu cDNA pomocí reverzní transkripce.

3.3.6. Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces, při kterém dochází k přepisu informace z RNA na cDNA. Tato reakce je katalyzována enzymem reverzní transkriptáza, který se v přírodě uplatňuje např. při začlenění retroviru do genomu hostitele. Laboratorní použití toho enzymu se ukázalo být velmi užitečné při zjišťování genové exprese.

Reverzní transkripce izolované RNA byla provedena pomocí kitu RevertAid H Minus First Strand cDNA synthesis (Thermoscientific) podle návodu od výrobce: reakční směs (pro 1 reakci) měla celkový objem 20 μ l a obsahovala 200 U reverzní transkriptázy, 20 U inhibitoru RNáz (Ribolock), 10 mM nukleotidů (dNTPs), 100 μ M OligoDT, 5 \times reakční pufr a 1 μ g celkové RNA. Směs byla vložena do termocykléru (ProGene), kde probíhala reakce při programu: 42 $^{\circ}$ C: 1 hod. \rightarrow 70 $^{\circ}$ C: 5 min. \rightarrow 16 $^{\circ}$ C: neomezeno.

3.3.7. Kvantitativní PCR v reálném čase (q RT PCR)

Tato metoda vychází z klasické PCR, kdy dochází k cyklickému kopírování úseku templátové DNA, jenž je vymezen syntetickými oligonukleotidy, tzv. primery. Rozdílné množství templátové DNA se v reakci promítne ve množství vznikajícího produktu a tento

rozdíl je možné monitorovat pomocí fluorescentní interkalační barvy. Z počtu cyklů, kdy dojde k překročení prahové hodnoty (Ct hodnoty) lze zjistit relativní rozdíl mezi templáty.

Získané Ct hodnoty jsme analyzovali metodou Δ Ct. Naše experimenty byly vykonány ve dvou biologických replikacích, každá z nich se skládala ze třech technických replikací. Hladina exprese každého genu byla normalizována na hladinu exprese genu pro receptor protein kinázy C (*Rack1*) a průměry těchto normalizací byly použity pro výpočet změn genové exprese. Tímto způsobem jsme vyhodnotili expresi genu pro *CrzR*, *Thor*, *Bmm*.

Reakční směs (pro 1 reakci) měla celkový objem 20 μ l a obsahovala: 1 \times HOT FIRE Pol Solis Green qPCR Mix (firma Solis Biodyne), 0,25 μ M 5' primer, 0,25 μ M 3' primer (Tabulka 4). Mix pro reakční směs byl připraven ve větším objemu pro všechny reakce a byla rozpipetována po 15 μ l do 48 jamkové qPCR destičky. Následně bylo do každé reakce přimícháno 5 μ l 5 \times zředěné cDNA. Pro zamezení odparu reakce během analýzy byla qPCR destička přelepena speciální krycí folií. Poté byla qPCR destička vložena do termocykléru (Eco, Ilumina), kde probíhala RT PCR na nastavený program (Tabulka 5). Použité primery jsou popsány v Tabulce 4.

Tabulka 4: Primery použité pro kvantifikaci exprese genů *CrzR*, *Bmm* a *Thor* pomocí kvantitativní RT PCR.

Testovaný gen:	5' primer:	3' primer:
<i>CrzR</i>	CCTTTGATCGTCTGCCAGT	CACAAGTCGCGTGAAGTTGG
<i>Bmm</i>	ATTAAGCTGCTTCCCTACC	AAGTCCTCCACCATTACTCT
<i>Thor</i>	CCAGGAAGGTTGTCATCTC	CGTAGATAAGTTTGGTGCCT

Tabulka 5: Program kvantitativní RT PCR použitý při kvantifikaci genů *CrzR*, *Bmm* a *Thor*.

Opakování:	Krok reakce:	Teplota:	Čas:
1 \times	Predenaturace	94 °C	10 min.
	Denaturace	94 °C	10 sek.
40 \times	Nasedání primerů	60 °C	20 sek.
	Prodlužování	72 °C	20 sek.
1 \times	Křivka teplot tání produktů	55 °C	15 sek.
		95 °C	15 sek.

3.4. Stanovení hladin sacharidů a lipidů

3.4.1. Příprava testovaných larev vyvíjejících se na definovaném médiu

Zhruba 100 much bylo na 24 hod. umístěno do klíček s médiem z ovocného džusu (25 % ovocného džusu, 2,5 % cukru, 2,3 % agaru, 0,12 % metylparaben). Druhý den bylo vyměněno médium z ovocného džusu s malým přídavkem pasty z kvasnic, klíčky byly na 4 hod. umístěny v termostatu (25 °C). Poté byla miska s médiem s nakladenými vajíčky na 24 hod. uložena v termostatu (25 °C). Larvy v 1. instaru byly na 72 hod. přemístěny po 30 jedincích do vialek s 5 ml definovaného média (10 % cukru, 5 % kvasnic, 1,2 % agaru, 0,3 % metylparabenu). Dospělci a larvy ve 3. instaru tak byli připraveni pro testy, u nichž je nezbytné, aby larvy během vývoje konzumovaly potravu s definovaným obsahem živin, vlhkosti a stářím.

3.4.2. Odběry hemolymfy z larev

Larvy ve 3. instaru, které se živily definovaným médiem, byly vyplaveny 3% cukerným roztokem, omyty ve vodě – etanolu – vodě – 50% savu – vodě a usušeny na papírovém ubrousku. Poté bylo vždy 5 larev přemístěno na mikroskopické sklo a opatrně, bez porušení tukového tělesa, natrženo pomocí pitevních pinzet. Ze vzniklých ran vytekla hemolymfa, která byla odebrána pipetou (1 µl) a použita buď ke stanovení cirkulujících sacharidů, nebo cirkulujících lipidů.

3.4.3. Stanovení hladiny cirkulujících sacharidů u larev pomocí anthronového činidla

Tato metoda využívá rozkladu redukujících i neredukujících sacharidů v silně kyselém prostředí – koncentrovaná kyselina sírová dehydratuje sacharidy a vzniklé deriváty kondenzují s anthronovým činidlem za vzniku barevných komplexů. Pomocí spektrofotometrických metod pak lze určit absorbanci vzorku a z té pomoci kalibrační křivky následně vyhodnotit množství sacharidů ve vzorku (Laurentin a Edwards, 2003).

Pro stanovení obsahu cirkulujících sacharidů (glukóza + trehalóza) byly odebrány 2 µl hemolymfy, ze kterých byl vytvořen 1% vodný roztok. Pro odstranění buněk z hemolymfy byl vzorek odstředěn (10 000 × g, 10 min., 4 °C) a přepipetován do nové zkumavky. Z každého vzorku bylo odpipetováno 40 µl do tří zkumavek, ke kterým bylo do každé zkumavky přidáno 230 µl anthronového činidla (72% H₂SO₄, 50 mg/ml anthronu). Pro vytvoření kalibrační řady byly spolu se vzorky připraveny standardy glukózy s dávkou 1,6 µg; 3,6 µg; 7,2 µg; 14,4 µg; 28,8 µg; 57,6 µg a sterilní vodou jako „blank“. Vzorky byly následně inkubovány 8 min. při

100 °C v blokovém termostatu, ochlazený na ledu a důkladně protřepány. Poté bylo 200 µl roztoku napipetováno na mikrotitrační destičku a následovalo měření absorbance pomocí ELISA čtečky (Spectra Max 340 PC, Molecular Devices) při vlnové délce 620 nm. Pomocí kalibrační křivky byla následně zjištěna koncentrace sacharidů ve vzorku.

3.5. Měření efektu injikovaného CRZ na obsah celkových sacharidů v těle dospělce

Dospělí 3 dny staří samečkové *CrzR⁰¹ a yw*, kteří byli chováni po 20 jedincích od 1. larválního instaru na obyčejném médiu (8 % kukuřičné mouky, 5 % cukru, 1 % agaru a 4 % kvasnic), byli uspáni na CO₂ destičce. Poté jim bylo intrathorakálně (mezi pteropleuru a mesopleuru) pomocí mikroinjekce (Nanoject II, Drumond Scientific Company) vpraveno 50 nl roztoku uměle syntetizovaného Drome-CRZ naředěného v Ringerově roztoku (0,13 M NaCl, 1,3 mM KCl, 6,8 mM CaCl₂ · 2H₂O, 2 mM MgCl₂ · 6 H₂O, 2 mM NaHCO₃) v koncentraci 1 · 10⁻⁵ M. Pro ujištění, že injekční aplikace roztoku proběhla správným způsobem, byl roztok Drome-CRZ obarven přidáním malého množství modrého barviva Brilliant Blue FCF (Sigma Aldrich).

Injikované mouchy byly co nejrychleji přemístěny po 10 jedincích do vialek s obyčejným médiem. Poté byly rozděleny do 2 skupin – první skupina byla usmrcena po 2 hod. od injekce roztoku Drome-CRZ a druhá po 6 hod. Po usmrcení byly mouchy po 10 jedincích homogenizovány jehlovým sonikátorem v 1 ml 70% etanolu. Vzorek byl odstředěn, tekutina odebrána do nové zkumavky a sediment vyluhován stejným způsobem. Oba extrakty byly spojeny v jedné zkumavce a odpařeny ve vakuové odstředivce (SpeedVacJouan RC 10.22). Vzniklý sediment byl rozpuštěn ve 100 µl destilované vody. Z toho byly odpipetovány 2 µl do 198 µl destilované vody a tento roztok byl použit pro stanovení sacharidů pomocí anthronového činidla (viz výše). Jako kontrolní mouchy byly použity také *CrzR⁰¹ a yw*, kterým však byl injekčně vpraven Ringerův roztok s malou příměsí modrého potravinářského barviva. Tyto mouchy byly usmrceny po 6 hod. od injekce a zpracovány stejným způsobem jako mouchy injikované Drome-CRZ.

3.6. Stanovení obsahu cirkulujících lipidů u larev pomocí sulfofosfovanilínového testu

Tento test zahrnuje 2 reakce – během 1. reakce reagují nenasycené mastné kyseliny s kyselinou sírovou za vzniku karbonylových iontů. Během 2. reakce reaguje vanilín

s kyselinou fosforečnou, z čehož vzniká ester kyseliny fosforečné, který reaguje s karbonylovými ionty z předešlé reakce. Tato reakce pak dává vzniknout barevnému komplexu, díky kterému lze následně spektrofotometricky určit absorbanci vzorku a z té, pomocí kalibrační křivky, vyhodnotit množství nenasycených mastných kyselin ve vzorku. (Knight et al., 1972).

Pro stanovení obsahu cirkulujících lipidů byl larvám ve 3. instaru, které se vyvíjely na definovaném médiu, odebrán 1 μ l hemolymfy. Ten byl následně smíchán se 100 μ l koncentrované kyseliny sírové. Vzorek byl 10 min. vařen ve vodní lázni a poté prudce ochlazen na led. Po ochlazení byl přidán 1 ml vanilínového činidla (2 mg/ml vanilínu, 67% H_3PO_4), vzorek byl důkladně promíchán pomocí třepačky a na 15 min. ponechán při pokojové teplotě. Poté byl vzorek nanesen na mikrotitrační destičku a následně byla změřena absorbance vzorků pomocí ELISA čtečky (Spectra Max 340 PC, Molecular Devices) při vlnové délce 546 nm. Množství nenasycených mastných kyselin ve vzorku bylo stanoveno pomocí již připravené kalibrační řady kyseliny olejové s dávkou 0,282 μ g, 0,565 μ g, 1,412 μ g, 2,825 μ g, 5,64 μ g, 14,125 μ g, 28,25 μ g, 56,5 μ g a sterilní vodou jako „blank“.

3.7. Vážení larev

Larvy ve 3. instaru, které se živily definovaným médiem, byly vyplaveny 3% cukerným roztokem, omyty ve vodě – etanolu – vodě – 50% savu – vodě a usušeny na papírovém ubrousku. Poté bylo vždy 10 larev od každého genotypu přemístěno do předvážené váhové misky a následně zváženo na analytických vahách (BOECO Germany).

3.8. Rezistence vůči hladovění

Test odolnosti vůči hladovění byl proveden podle postupu popsáném v práci Kubrak et al. (2016). Pro každou replikaci bylo z much, které se vyvíjely na definovaném médiu, první den po vykuklení vybráno 15 samečků, kteří byli 3 dny umístěni do termostatu (25 °C) ve vialkách s definovaným médiem. Poté byli 3 dny staří samečkové přemístěni do vialek se 2 ml 0,5% agaru a uchováni v termostatu (25 °C). Počet uhynulých jedinců byl zaznamenáván každé 4 hodiny.

3.9. Imunodetekce ILP2 a ILP3

Pro imunodetekci ILP2 a ILP3 v IPC v mozku byly použity 96 hodin staré larvy, které se vyvíjely na definovaném médiu. Testovány byly mutanti *Akh¹* a *CrzR⁰¹*, dvojný mutant *Akh¹, CrzR⁰¹* a jako kontroly byly použity larvy *w* a *yw*.

Larvální mozky byly vypitvány v 0,01 M fosfátovém pufru (PB), pH 7,4 a fixovány 4% roztokem paraformaldehydu ve fosfátovém pufru a 0,5% Tritonu X-100 (PBT) 2 hod. při pokojové teplotě. Následně byly třikrát promývány po dobu 15 min. v PB. Pro minimalizaci nescifických vazeb primárních protilátek byly vypitvané mozky 2 hod. inkubovány v 5 % normálním kozím séru v PBT (blokační sérum) při pokojové teplotě.

Použité primární králičí anti-ILP2 a anti-ILP3 protilátky (obdrženy jako dar z laboratoře J. A. Veenstry) byly naředěny v blokačním séru v poměru 1:2000. V takto připravených roztocích primárních protilátek byly vypitvané a fixované mozky inkubovány po dobu 3 dní při 4 °C. Poté byly mozky šestkrát promývány po dobu 10 min. v PBT.

Následovala inkubace se sekundárními protilátkami. Pro naše experimenty byla použita anti-králičí sekundární protilátka (Alexa fluor 488 Goat anti-rabbit IgG, Life Technologies, Invitrogen), která byla naředěna v roztoku PBT v poměru 1:200. V tomto roztoku byly promyté mozky inkubovány přes noc ve 4 °C. Po inkubaci byly mozky šestkrát promývány po dobu 10 min. v PBT a přeneseny do kapky zalévacího média Vectashield (Sigma) aplikované na mikroskopickém podložním sklíčku (Mezel-Glässer 50). Vzorek byl nakonec přiklopen krycím sklíčkem, které bylo po obvodu zafixováno průhledným lakem.

Vizualizace pozitivního signálu ILP2 a ILP3 byla provedena pomocí konfokálního mikroskopu FluoroView 1000 (Olympus) a objektivu UPLSAPO 40xO (Universal Plan Super Apochromatic). Pořízené série snímků, které byly různě proostřené v ose Z, byly složeny do výsledného 3D zobrazení použitím programu Imaris 6.3.1. (Bitplane).

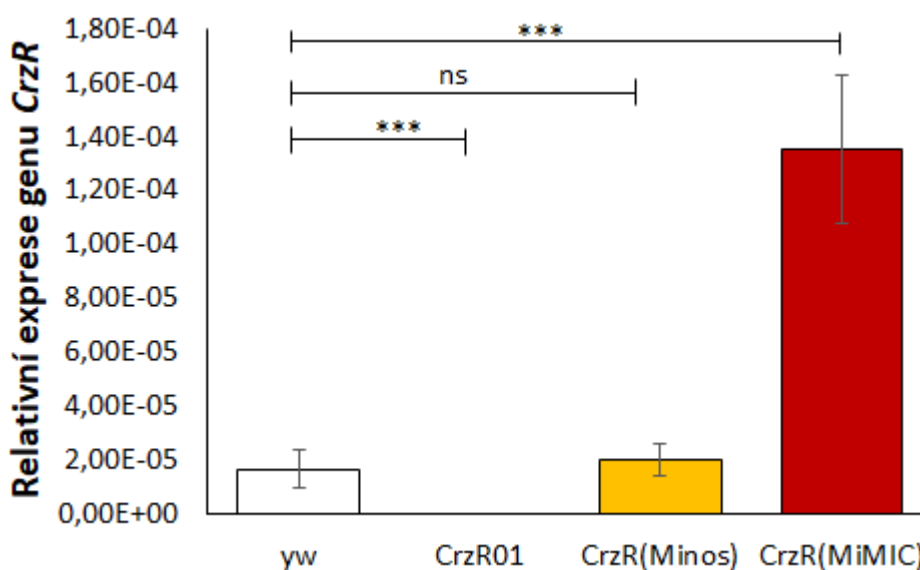
Finální grafické úpravy 3D fotografií byly provedeny v programu Adobe Photoshop (Adobe Systems). Kvantifikace intenzity fluorescentního signálu byla provedena v programu ImageJ postupem popsáným Burgess et al. (2010).

4. Výsledky

4.1. Ověření mutantů v *CrzR*

Výhodou genetického výzkumu *D. melanogaster* je možnost získat potenciální mutantní linie octomilek z několika chovných center. Tímto způsobem jsme získali celkem tři linie, *CrzR⁰¹*, *CrzR^{MiMIC}*, *CrzR^{Minos}*, u nichž byla potřeba ověřit poškození genu *CrzR* a míru jeho exprese. Proto jsme použili kvantitativní RT PCR a pomocí ní jsme určovali hladinu exprese genu pro *CrzR* u much *CrzR⁰¹*, *CrzR^{MiMIC}*, *CrzR^{Minos}*. Jako kontroly byly použity mouchy *yw*.

Naše měření ukázalo, že míra exprese *CrzR* se mezi jednotlivými genotypy výrazně liší (Obr. 5). Zatímco u much *CrzR⁰¹* nedochází k expresi *CrzR*, čímž se potvrdila nulová mutace v důsledku rozsáhlé delecce genu, u much *CrzR^{MiMIC}* jsme naopak detekovali 8,2× zvýšenou transkripční aktivitu genu *CrzR* vlivem inserce elementu *MiMIC*. Třetí a poslední testovaná linie much *CrzR^{Minos}* vykazovala stejnou mírou exprese *CrzR* jako kontrolní mouchy, z čehož je patrné, že inserce elementu *Minos* neovlivnila expresi genu *CrzR*. Naše výsledky ukazují, že jsme získali nejen ztrátovou mutaci, ale i hypermorfu genu *CrzR*.

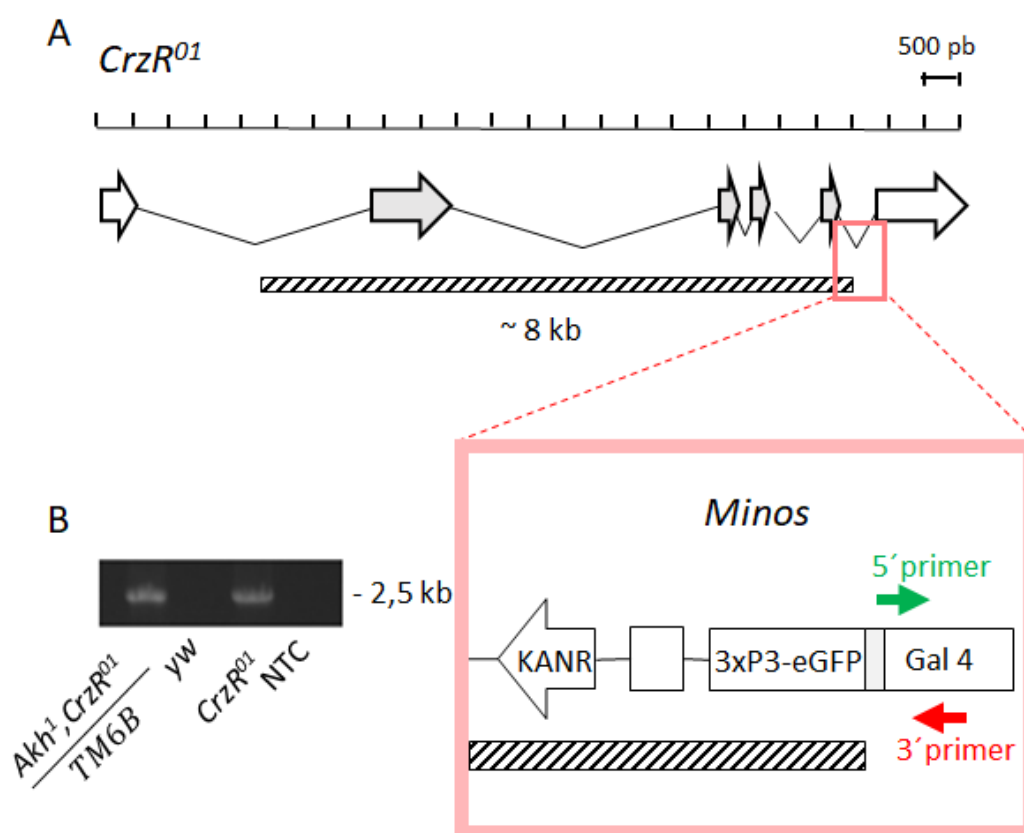


Obr. 5: Míra exprese *CrzR* mRNA se liší mezi mouchami s insercemi mobilních elementů a delecí v *CrzR*. U much *CrzR⁰¹* nebyla detekována exprese *CrzR*, u much *CrzR^{Minos}* jsme nezaznamenali změnu exprese *CrzR* oproti kontrolám ($p = 0,638$). Mouchy *CrzR^{MiMIC}* naopak vykazovaly vyšší míru exprese *CrzR* v porovnání s kontrolami ($p < 0,001$). Data v tomto grafu jsou prezentována jako \pm SEM, $n = 2$ nezávislé replikace s 15 mouchami v každé replikaci.

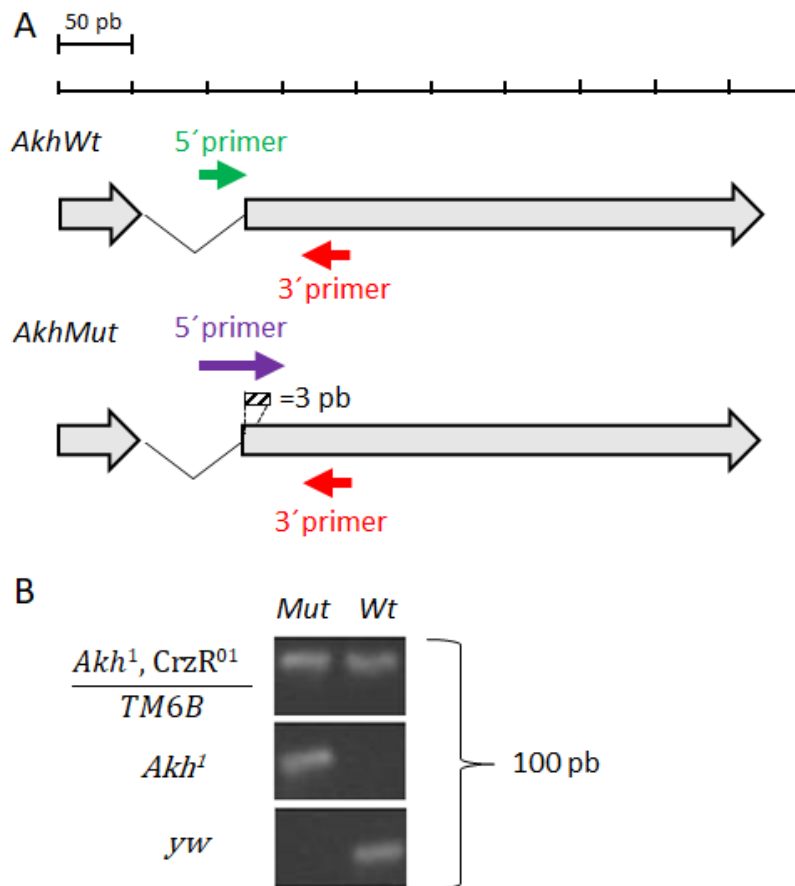
Pro statistické vyhodnocení byl použit Studentův dvouvýběrový t-test, $p > 0,05$ ns, $p < 0,001$ ***.

4.2. Konstrukce dvojného nulového mutanta v *Akh* a *CrzR*

Dvojný nulový mutant v AKH a CRZ signálních drahách byl vytvořen podle schéma křížení uvedeného v kapitole 3. Materiál a metody. Přítomnost obou mutací v heterozygotech much *Akh¹*, *CrzR⁰¹/TM6B* byla ověřena použitím specifických primerů a metody PCR (Obr. 6 a Obr. 7) a poté byla vytvořena homozygotní linie much *Akh¹*, *CrzR⁰¹*.



Obr. 6: Detekce nulové mutace v *CrzR* byla provedena použitím specifických primerů a metodou PCR. (A) Primery byly navrženy do pozůstatku *Gal4*, jenž se v genu nachází vlivem odštěpení od mobilního elementu *Minos*, který byl mobilizován za vzniku delece 8 kb úseku genu. 5' primer (znázorněn zeleně) je navržen do repetice, která se nachází před kódující oblastí *Gal4*, zatímco 3' primer (znázorněn červeně) je komplementární s kódující oblastí *Gal4*. Schéma bylo převzato a upraveno podle Sha et al. (2014). (B) PCR produkty vytvořené prostřednictvím specifických primerů. Zatímco mutant *CrzR⁰¹* a dvojný mutant *Akh¹*, *CrzR⁰¹* produkovali PCR fragment o očekávané velikosti 2,5 kb, u *yw* k tomu nedocházelo.



Obr. 7: Odlišení normálního a poškozeného genu *Akh* bylo provedeno použitím dvou párů specifických primerů. (A) Pro detekci normální i mutované alely jsme použili stejný 3' primer (znázorněn červeně), na normální gen *Akh* (*AkhWt*) pak nasedal 5' primer, který byl navržen z velké části do intronu a třemi nukleotidy zasahoval do exonu (znázorněn zeleně). Pro mutovanou alelu (*AkhMut*) byl 5' primer (znázorněn fialově) lokalizovaný v intronu na stejném místě jako primer pro nezměněnou alelu, konec primeru však neobsahoval první tři nukleotidy komplementární se začátkem exonu (na tomto místě je 3 nt delece), nýbrž s nukleotidy, které bezprostředně následují po deleci. (B) PCR s použitím DNA z dvojného mutantu v heterozygotním stavu produkovala fragmenty o očekávané velikosti (100 pb) v obou reakcích. Jako pozitivní kontrola pro primery navržené pro detekci mutované alely byla použita DNA z mutantu *Akh¹*, pro pozitivní kontrolu primerů detekujících nezměněný gen *Akh* byla použita DNA z *yw*.

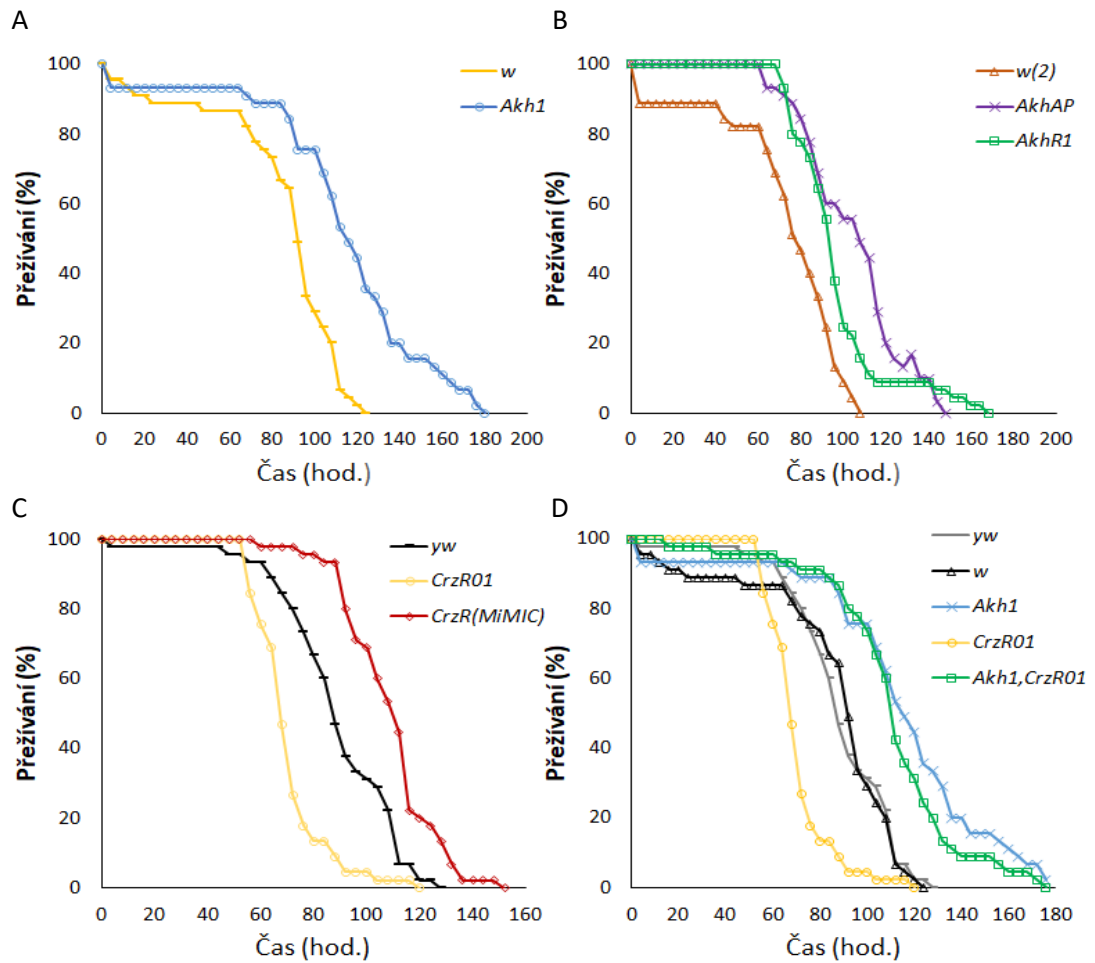
4.3. Rezistence vůči hladovění

Dřívější výzkumy ukázaly, že působení AKH a CRZ signalizace má významný vliv na přežívání much během hladovění (Sajwan et al., 2015; Gálíková et al., 2015; Kubrak et al., 2016). Z toho důvodu jsme chtěli zjistit, jaký vliv na rezistenci vůči hladovění má absence obou AKH i CRZ signálních drah ve dvojném nulovém mutantovi a jak se tento efekt liší od vlivu jednotlivých mutací v *Akh* a *CrzR*.

Test na rezistenci vůči hladovění byl proveden ve 3 opakováních po 15 jedincích každého genotypu. Pro srovnání účinků mutací jednotlivých drah s účinkem mutací obou AKH i CRZ dráhy zároveň byly testovány mouchy *Akh^l* a *CrzR⁰¹* a dvojný mutant *Akh^l, CrzR⁰¹*. Pro zjištění vlivu CRZ dráhy byl spolu s nulovým mutantem v *CrzR* testován také hypermorfní mutant *CrzR^{MiMIC}*. Do testování jsme zahrnuli také mutanty *Akh^{AP}* a *AkhR^l*, protože jsme chtěli ověřit, zda se i v našem experimentu projeví fenotypy, které byly u těchto mutantů již popsány (Gálíková et al., 2015).

Naše experimenty ukázaly, že mutanti *Akh^{AP}*, *Akh^l* a *AkhR^l* vykazovali výrazně zvýšenou rezistenci vůči hladovění (Obr. 8 A+B), což podporuje tvrzení, že AKH signalizace zvyšuje citlivost vůči nutričnímu stresu (Grönke et al., 2012; Sajwan et al., 2015; Gálíková et al., 2015).

V souladu s výsledky snížené CRZ signalizace (Kapan et al., 2012; Kubrak et al., 2016) jsme očekávali stejný fenotyp také u nulového mutantu *CrzR*. Naše očekávání se však nenaplnilo, protože nulový mutant *CrzR⁰¹* měl významně sníženou rezistenci vůči hladovění, zatímco hypermorfa *CrzR^{MiMIC}* vykazovala naopak výrazně zvýšenou rezistenci vůči hladovění (Obr. 7 C). U dvojného nulového mutantu *Akh^l, CrzR⁰¹* jsme pozorovali zvýšení rezistence vůči hladovění, a to ve stejné míře jako mouchy *Akh^l* (Obr. 7 D). Tento výsledek naznačuje, že fenotyp zvýšené rezistence vůči hladovění u much *Akh^l* převažuje nad fenotypem snížené rezistence u *CrzR⁰¹*.



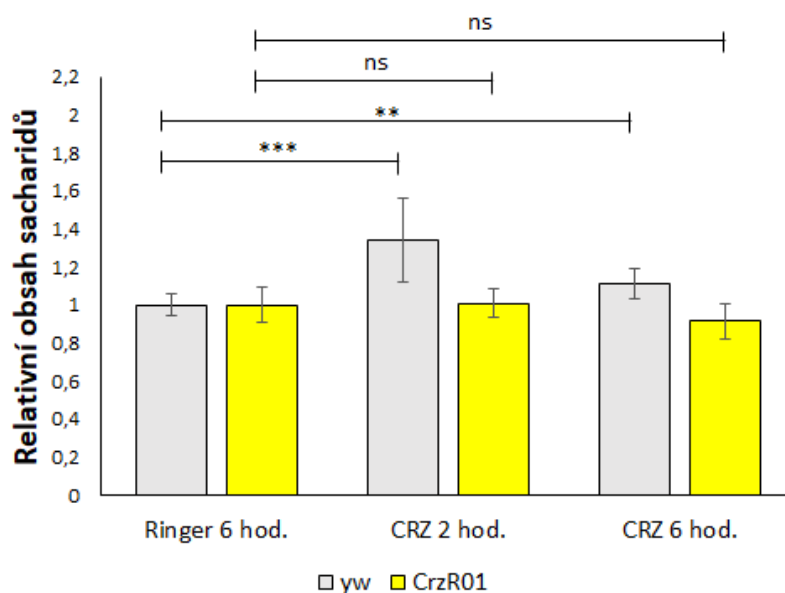
Obr.: 8: Mutace v AKH a CRZ dráze ovlivňují rezistenci vůči hladovění u dospělců. (A+B) U všech testovaných mutantů v AKH signální dráze jsme pozorovali signifikantní nárůst rezistence vůči hladovění ($p < 0,001$). (C) Nulový mutant $CrzR^{01}$ přežívali výrazně kratší dobu ($p < 0,001$), hypermorfni inzerční mutant $CrzR^{MiMIC}$ naopak přežíval déle ($p < 0,001$). (D) Dvojný nulový mutant Akh^1 , $CrzR^{01}$ má výrazně zvýšenou dobu přežívání oproti kontrolám i mutantovi $CrzR^{01}$ ($p < 0,001$), avšak neliší se od mutantu Akh^1 ($p = 0,1207$). Pro tento test jsme použili 3 dny staré samečky ($n = 3$ nezávislé replikace s 15 mouchami v každé replikaci). Všechny výsledky byly analyzovány pomocí online nástroje OASIS 2 long-rank test (Han Kyu et al., 2016), výsledky mutantních genotypů byly porovnávány vůči odpovídající kontrole.

4.4. Efekt injekčně podaného roztoku CRZ na metabolismus sacharidů dospělců

Protože se naše výsledky s vlivem CRZ signalizace na hladovění lišily od výsledků publikovaných Dr. Kubrak (Kubrak et al., 2016), v další části této práce jsme se věnovali ověření efektu CRZ signalizace na metabolismus sacharidů u *D. melanogaster*. Nejprve jsme testovali účinek CRZ peptidu a mobilizaci uložených zásob u dospělých much a to tím, že jsme měřili hladinu celkových jednoduchých sacharidů v těle much po injekci syntetického Drome-CRZ. Pro tento experiment jsme použili mouchy *yw* a *CrzR⁰¹*. Injekcí much *CrzR⁰¹* jsme ověřovali, jestli syntetický Drome-CRZ aktivuje pouze CRZR. Jako kontrolu jsme použili mouchy *yw* a *CrzR⁰¹*, do kterých byl injekčně vpraven Ringerův roztok, a po 6 hod. byly změřeny hladiny jejich celkových sacharidů.

U much *yw* jsme po 2 hod. od podání syntetického Drome-CRZ detekovali významně zvýšenou hladinu celkových sacharidů (glukóza + trehalóza) v celém těle much oproti kontrolním *yw*, ošetřeným samotným Ringerovým roztokem. Po 6 hod. od podání Drome-CRZ jsme též zaznamenali signifikantně zvýšenou hladinu celkových sacharidů, která však byla nižší než po 2 hod. (Obr. 9).

Naše výsledky potvrdily, že injikovaný CRZ funguje podobně jako AKH (Kučerová, nepublikovaná data) a zvyšuje hladinu celkových jednoduchých sacharidů v celém těle dospělců.



Obr. 9: Injekčně podaný Drome-CRZ způsobil zvýšení hladiny celkových sacharidů (glukóza + trehalóza) v těle much *yw*. Po 2 hod. od podání syntetického Drome-CRZ jsme u much *yw* pozorovali signifikantní nárůst hladiny celkových sacharidů ($p < 0,001$), kdežto u much *CrzR⁰¹* se hladina celkových sacharidů nezměnila ($p = 1$). Po 6 hod. od podání syntetického Drome-CRZ jsme také pozorovali signifikantní nárůst hladiny celkových sacharidů, efekt však nebyl tak výrazný jako po 2 hod. od podání ($p < 0,01$), hladina celkových sacharidů u much *CrzR⁰¹* opět nelišila ($p = 0,982$). Data v tomto grafu jsou prezentována jako \pm SEM, $n = 4$ nezávislé replikace s 10 mouchami v každé replikaci, pro vyhodnocení byla použita jednocestná ANOVA následovaná Tukeyho post-hoc testem, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

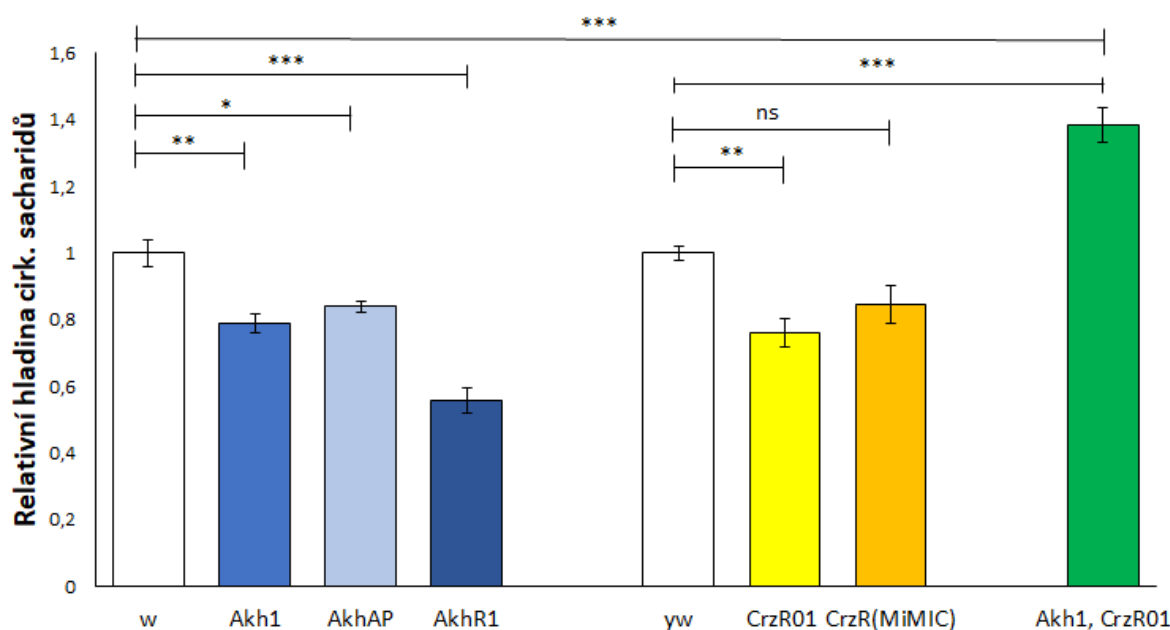
4.5. Účinky mutací v *Akh* a *CrzR* na hladinu cirkulujících sacharidů u larev

Hypertrehalozemický účinek AKH signalizace je již dobře prozkoumaným jevem, který dokládá celá řada studií nejen s ablacemi AKH produkujících buněk (Lee a Park, 2004; Isabel et al., 2005), ale také například se ztrátovými mutacemi v AKH dráze (Bharucha et al., 2008; Gálíková et al., 2015) u larev i dospělců. Protože jsme podobný účinek pozorovali také po injekčním podání syntetického Drome-CRZ u dospělců, zajímalo nás, jestli signalizace CRZ a AKH fungují podobně také v metabolismu sacharidů u larev.

V sérii pokusů zabývajících se metabolismem sacharidů u larev jsme nejprve pomocí anthronového činidla stanovili hladinu cirkulujících sacharidů (glukóza + trehalóza) v hemolymfě larev 3. instaru mutantů *Akh^l*, *Akh^{AP}*, *AkhR^l*, *CrzR^{MiMIC}*, *CrzR⁰¹* a dvojného mutantu *Akh^l*, *CrzR⁰¹*. Jako kontroly byly použity larvy *w* a *yw*.

Stanovením hladiny cirkulujících sacharidů jsme zjistili, že jednotlivé nefunkční dráhy AKH a CRZ mají stejný účinek, který se však liší od účinku absence obou drah zároveň. U všech testovaných mutantů v AKH dráze jsme zjistili významně nižší hladinu cirkulujících sacharidů (glukóza + trehalóza) v porovnání s kontrolami. Larvy mutantů *Akh^l* a *Akh^{AP}* mají sníženou hladinu cirkulujících sacharidů zhruba o 20 %. U larev mutantů *AkhR^l* bylo pozorováno dokonce přibližně 45% snížení hladiny cirkulujících sacharidů. Nižší hladina cirkulujících sacharidů v hemolymfě byla pozorována také u nulového mutantu *CrzR⁰¹* a to o 25 % oproti kontrole. Oproti tomu hypermorfa *CrzR^{MiMIC}* nevykazovala změnu v hladině cirkulujících sacharidů. Velmi překvapivé bylo zjištění, že dvojný nulový mutant v *Akh* a *CrzR* vykazoval o 40 % vyšší hladinu cirkulujících sacharidů v porovnání s kontrolami (Obr. 10).

Tento výsledek nás vedl k myšlence, že u dvojných nulových mutantů možná dochází ke snížení inzulinové signalizace.



Obr. 10: Relativní hladina cirkulujících sacharidů (trehalóza + glukóza) u larev mutantů v *Akh*, *CrzR* a dvojného mutantu měřená pomocí anthronového činidla. U všech testovaných mutantů v *AKH* signalizaci byla detekována signifikantně nižší hladina cirkulujících sacharidů v porovnání s kontrolami (Akh^1 : $p < 0,01$, Akh^{AP} : $p < 0,05$, $AkhR^1$: $p < 0,001$). Nižší hladina cirkulujících sacharidů oproti kontrolním larvám byla zaznamenána také u larev mutantu $CrzR^{01}$ ($p < 0,01$). U larev hypermorfy $CrzR^{MiMIC}$ byla hladina cirkulujících sacharidů oproti kontrolám nezměněna ($p = 0,0978$). Larvy dvojného mutantu $Akh^1, CrzR^{01}$ vykazovaly významně vyšší hladinu cirkulujících sacharidů v porovnání s kontrolami ($p < 0,001$). Data v tomto grafu jsou prezentována jako \pm SEM, $n = 3$ nezávislé replikace s 10 larvami v každé replikaci, pro vyhodnocení použita jednocestná ANOVA následovaná Tukeyho post-hoc testem, $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

4.6. Účinek mutací v *Akh* a *CrzR* na inzulinovou signalizaci

Zvýšená hladina cirkulujících sacharidů u larev dvojných mutantů $Akh^1, CrzR^{01}$ může znamenat, že u těchto larev dochází k poškození inzulinové signalizace. Inzulinová signalizace je však regulována na mnoha úrovních, včetně transkripce a sekrece ILP. Navíc hladina ILP nemusí vždy korelovat s aktivitou inzulinové signalizace (Flatt et al., 2008). Z toho důvodu jsme pomocí fluorescentně značených specifických protilátek kvantifikovali

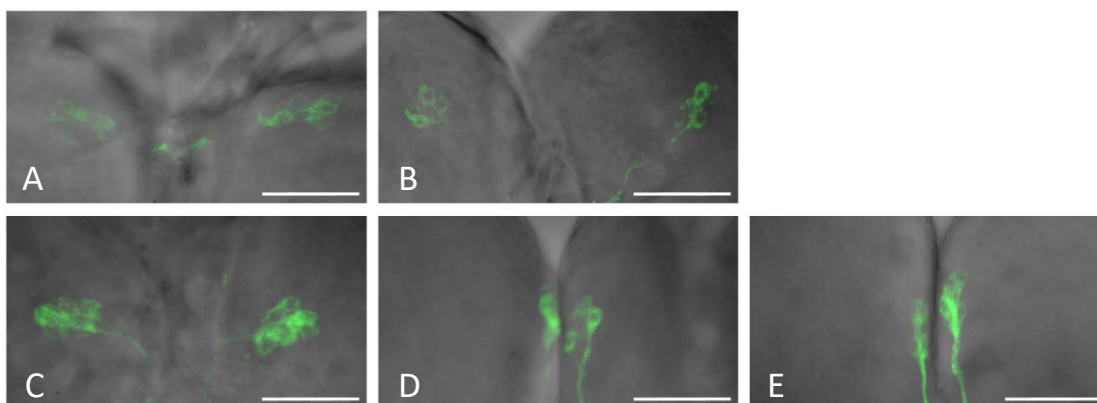
množství ILP2 a ILP3 v IPC a použitím kvantifikační RT PCR zjišťovali transkripční aktivitu genu *Thor*, která je negativně regulována aktivní inzulínovou signalizací.

4.6.1. Imunodetekce ILP2 a ILP3

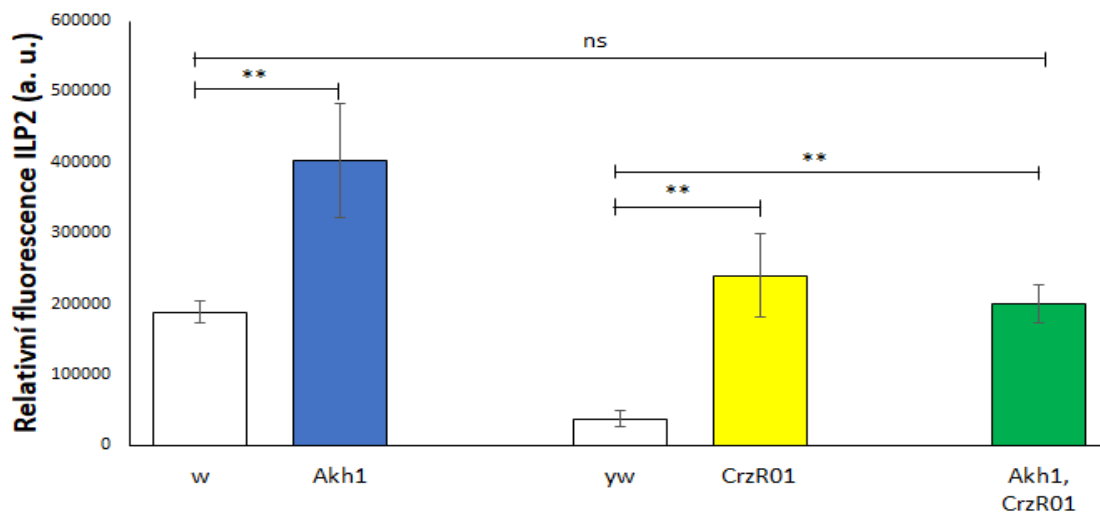
Jako hlavní adepty, jejichž poškozená produkce mohla vyvolat tento fenotyp, jsme určili ILP2, jehož ztrátová mutace měla za následek zvýšení trehalózy přibližně o 60 % (Grönke et al., 2010) a ILP3, u kterého byla popsána regulace hladiny trehalózy ve spolupráci s AKH signalizací (Kim a Neufeld, 2015). Proto jsme provedli imunodetekci ILP2 a ILP3 v inzulín produkujících buňkách (IPC) v mozcích larev a následně kvantifikovali intenzitu pozitivního signálu těchto peptidů. Pro tento experiment jsme použili larvy 3. instaru mutantů *Akh¹* a *CrzR⁰¹* a dvojného mutantu *Akh¹, CrzR⁰¹*. Jako kontroly byly použity larvy *w* a *yw*.

U všech testovaných larev byl zřetelný pozitivní signál ILP2 a ILP3 (Obr. 11 a 13). Protilátky proti oběma peptidům značily dva klastry celkem čtrnácti buněk v oblasti *pars intercerebralis* obou hemisfér mozku. Kvantifikací pozitivního signálu ILP2 jsme u larev mutantů *Akh¹* a *CrzR⁰¹* detekovali zvýšenou koncentraci tohoto peptidu v IPC. U dvojného mutantu *Akh¹, CrzR⁰¹* jsme pozorovali silnější pozitivní signál ILP2 v porovnání s larvami *yw*, oproti kontrolním larvám *w* jsme nezaznamenali rozdíl, a proto tento výsledek uvádíme jako statisticky nevýznamný (Obr. 12). Kvantifikace pozitivního signálu ILP3 ukázala signifikantně zvýšenou koncentraci ILP3 v IPC u mutantů *Akh¹* a *CrzR⁰¹* a dvojného mutantu *Akh¹, CrzR⁰¹* oproti kontrolám (Obr. 14).

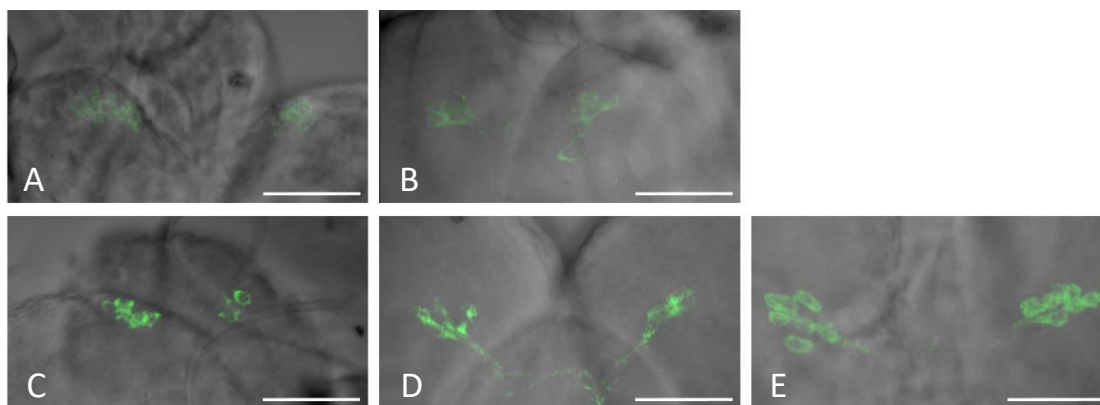
Tento výsledek ukazuje, že mutace v *Akh* a *CrzR* zvyšují koncentraci ILP2 a ILP3 v IPC v mozcích larev ve 3. instaru.



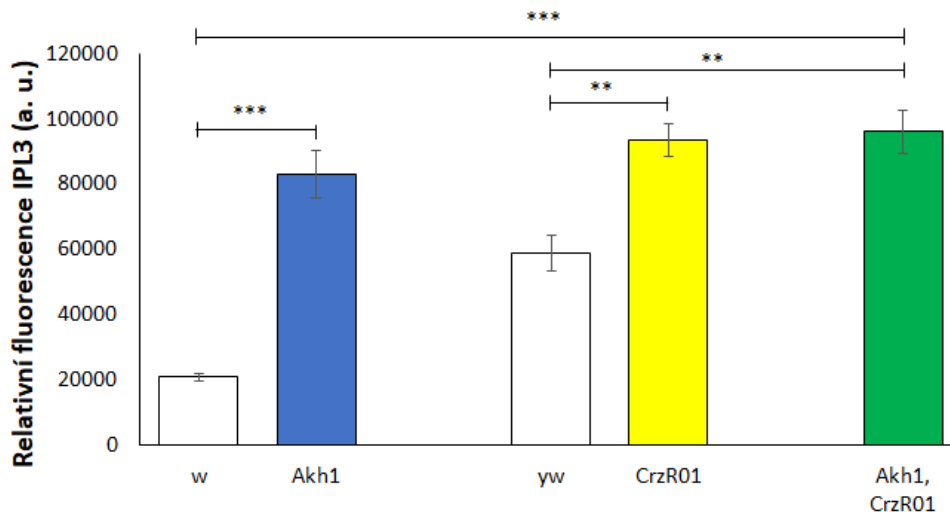
Obr. 11: Detekce pozitivního signálu ILP2 v IPC larev genotypů (A) *w* (B) *yw* (C) *Akh¹* (D) *CrzR⁰¹* (E) *Akh¹, CrzR⁰¹*. U všech genotypů jsou viditelné 2 skupiny neurosekretorických buněk. Měřítka je 50 μ m.



Obr. 12: Kvantifikace pozitivního signálu ILP2 v IPC v mozcích larev mutantů Akh^1 , $CrzR^{01}$ a dvojného mutantu Akh^1 , $CrzR^{01}$. U mutantu Akh^1 jsme zaznamenali signifikantně zvýšený signál ILP2 v IPC v mozku oproti kontrole ($p < 0,01$). Mutant $CrzR^{01}$ taktéž vykazoval zvýšený signál ILP2 v IPC mozku oproti kontrole ($p < 0,01$). U dvojného mutantu Akh^1 , $CrzR^{01}$ jsme detekovali zvýšený signál ILP2 v IPC mozku pouze oproti larvám yw ($p < 0,01$), oproti larvám w však nebyl signifikantní rozdíl ($p = 0,1508$). Data v tomto grafu jsou prezentována jako \pm SEM, $n = 5$ mozků larev od každého genotypu, pro vyhodnocení byl použit Studentův dvouvýběrový t -test, $p > 0,05$ ns, $p < 0,01$ **.



Obr. 13: Detekce pozitivního signálu ILP3 v IPC larev genotypů (A) w (B) yw (C) Akh^1 (D) $CrzR^{01}$ (E) Akh^1 , $CrzR^{01}$. Měřítka je $50 \mu m$.



Obr. 14: Kvantifikace pozitivního signálu ILP3 v IPC v mozcích larev mutantů *Akh¹* a *CrzR⁰¹* a dvojného mutantu *Akh¹, CrzR⁰¹*. U mutantu *Akh¹* jsme zaznamenali signifikantně zvýšený signál ILP3 v IPC v mozku oproti kontrole ($p < 0,01$). Mutant *CrzR⁰¹* taktéž vykazoval zvýšený signál ILP3 v IPC mozku oproti kontrole ($p < 0,01$). U dvojného mutantu *Akh¹, CrzR⁰¹* jsme detekovali zvýšený signál ILP3 v IPC mozku oproti larvám *yw* ($p < 0,01$) i oproti larvám *w* ($p < 0,001$). Data v tomto grafu jsou prezentována jako \pm SEM, $n = 5$ mozků larev od každého genotypu, pro vyhodnocení byl použit Studentův dvouvýběrový *t*-test, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

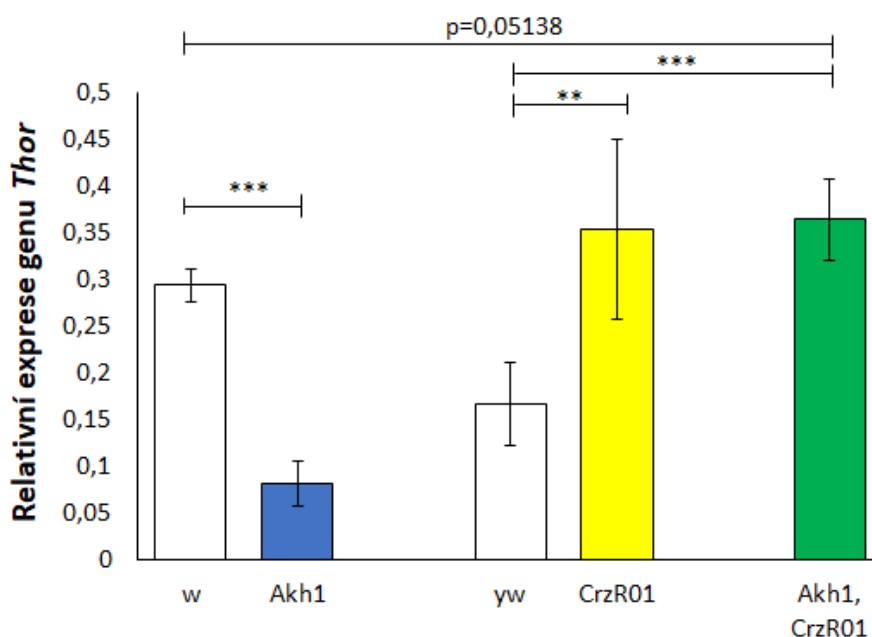
4.6.2. Kvantifikace exprese genu *Thor*

Kvantifikací pozitivního signálu ILP v IPC v mozku lze odvodit koncentraci těchto peptidů v produkujících buňkách. Nedokážeme však určit, zda za zvýšenou koncentrací ILP stojí zvýšená produkce těchto peptidů, nebo jejich akumulace v buňkách vlivem nemožnosti sekrece do hemolymfy. Proto jsme ověřovali aktivitu inzulínové signalizace pomocí kvantifikace mRNA genu *Thor*.

Transkripce genu *Thor* bývá používána jako ukazatel aktivity periferní inzulínové signalizace (Hentze et al., 2015; Gálíková et al., 2017). Tento gen je jedním z přímých cílů transkripčního faktoru FOXO, jenž je negativně regulován aktivní inzulínovou signalizací. Jeho transkripce je proto potlačována aktivní inzulínovou signalizací (Buch et al., 2008) a dá se očekávat, že zvýšená sekrece ILP2 a ILP3 bude mít negativní účinek na expresi tohoto genu (Gálíková et al., 2017).

Kvantifikace exprese genu *Thor* byla provedena pomocí kvantitativní RT PCR u larev 3. instaru mutantů *Akh¹* a *CrzR⁰¹* a dvojného nulového mutantu *Akh¹, CrzR⁰¹*. Jako kontroly byly použity larvy *w* a *yw*.

Naše měření ukázalo signifikantně nižší transkripci genu *Thor* u larev mutantů *Akh¹*, kdežto u larev mutantů *CrzR⁰¹* jsme detekovali signifikantně vyšší expresi tohoto genu. U dvojného mutantu jsme pozorovali trend zvýšené transkripční aktivity, který však nebyl významný vůči oběma kontrolám, a proto ho uvádíme jako statisticky nevýznamný (Obr. 15). Tyto výsledky naznačují, že mutace v *Akh* pravděpodobně způsobuje zvýšení aktivity inzulínové dráhy, zvýšená exprese *Thor* u mutantu *CrzR⁰¹* naopak indikuje pravděpodobně nižší inzulínovou signalizaci.

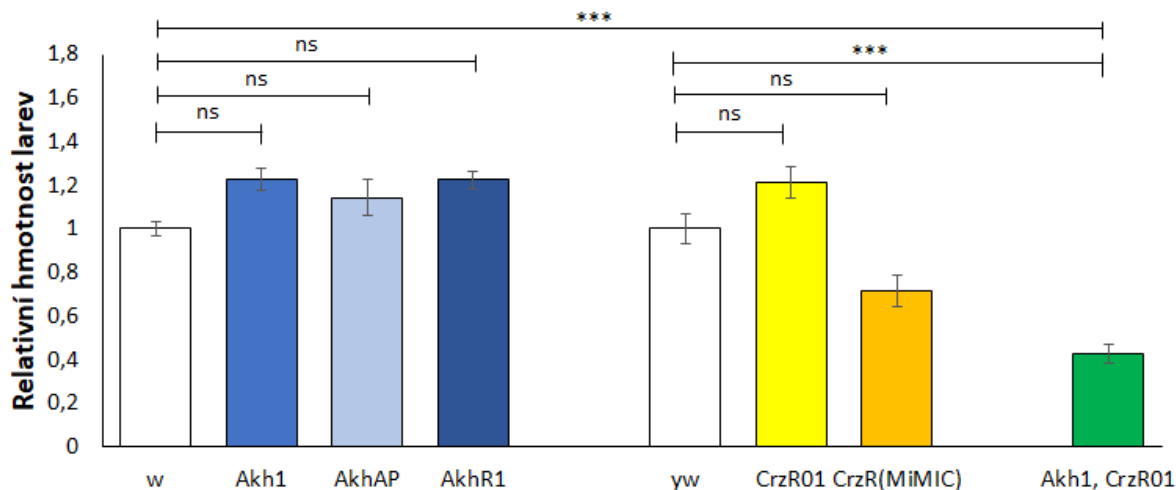


Obr. 15: Expresa genu *Thor* je nižší u mutantu *Akh¹* ($p < 0,001$), u mutantů v *CrzR* byla detekována naopak vyšší exprese genu *Thor* oproti kontrole ($p < 0,01$). U dvojných mutantů byla zjištěna významně zvýšená exprese genu *Thor* v porovnání s larvami *yw* ($p < 0,001$) oproti kontrolním larvám *w* však exprese nebyla signifikantně změněna, ale pohybovala se na hladině významnosti ($p = 0,0513$), proto je tento trend zvýšené transkripční aktivity genu *Thor* referován jako statisticky nevýznamný. Data v tomto grafu jsou prezentována jako \pm SEM, $n = 2$ nezávislé replikace se 30 larvami v každé replikaci, pro vyhodnocení byl použit Studentův dvouvýběrový *t*-test, $p > 0,05$ ns, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***.

4.6.3. Hmotnost larev

Jedním z důsledků změn v inzulínové signalizaci je také změna v tělesné hmotnosti (Murillo-Maldonado et al., 2011). Proto jsme očekávali, že u larev mutantů v signalizaci AKH a CRZ budou patrné rozdíly v hmotnosti. Naše očekávání se však nenaplnilo, všichni jednotliví testovaní mutantů v AKH a CRZ dráze měli porovnatelnou váhu jako kontroly. Avšak u

dvojného mutantu *Akh^l*, *CrzR⁰¹* jsme pozorovali zhruba poloviční hmotnost než u larev *w* a *yw* (Obr. 16). Tento fenotyp je v souladu s popsányými projevy snížené inzulinové signalizace (Zhang et al., 2010).



Obr. 16: Hmotnost larev mutantů v AKH a CRZ signalizaci. U žádného z testovaných mutantů v AKH dráze jsme nezaznamenali rozdíl oproti kontrole (*Akh^l*: $p = 0,1765$; *Akh^{AP}*: $p = 0,6652$; *AkhR^l*: $p = 0,1907$). Ani mutantů v *CrzR* nevykazovali změněnou hmotnost v porovnání s kontrolou (*CrzR⁰¹*: $p = 0,231$; *CrzR^{MiMIC}*: $p = 0,05089$). U dvojného mutantu *Akh^l*, *CrzR⁰¹* jsme zjistili signifikantně sníženou hmotnost proti larvám *w* ($p < 0,001$) i proti larvám *yw* ($p < 0,001$). Data v tomto grafu jsou prezentována jako \pm SEM, $n = 3$ nezávislé replikace s 20 larvami v každé replikaci, pro vyhodnocení byl použit Studentův dvouvýběrový *t*-test, $p > 0,05$ ns, $p < 0,001$ ***.

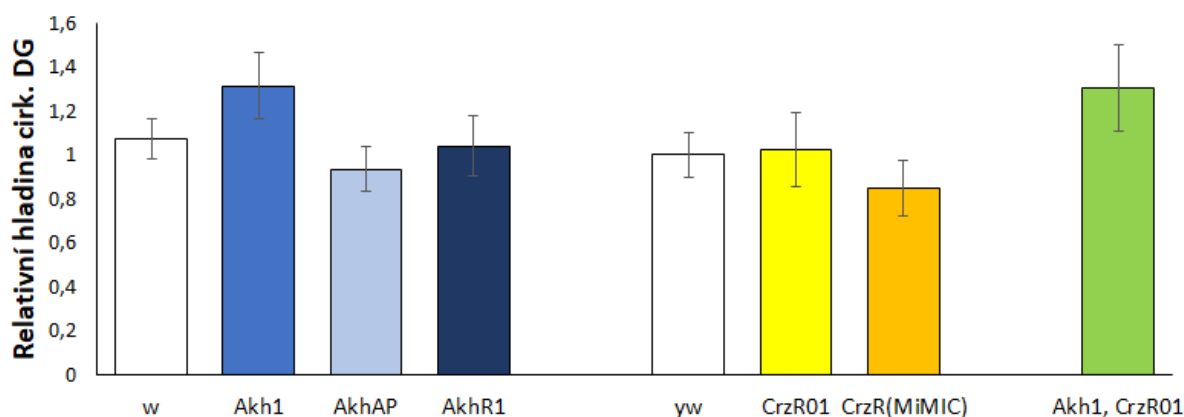
4.7. Účinek mutací v *Akh* a *CrzR* na hladinu cirkulujících lipidů

Jedním z hlavních účinků dráhy AKH je mobilizace zásobních lipidů v odpovědi na akutní nedostatek energie např. při letu či běhu. U larev hmyzu s dokonalou proměnou je mobilizace lipidů důležitá pravděpodobně pro pokrytí energetického výdeje spojeného se svlékáním a metamorfózou (Arrese a Soulages, 2010). Proto jsme se v další části této práce věnovali objasněním účinku mutace v AKH a CRZ dráze na hladinu cirkulujících lipidů u larev.

Testovali jsme mutanty *Akh^l*, *Akh^{AP}*, *AkhR^l*, *CrzR^{MiMIC}*, *CrzR⁰¹* a dvojně mutanty *Akh^l*, *CrzR⁰¹* ve 3. larválním instaru. Jako kontroly byly použity larvy *w* a *yw*.

Stanovením hladiny cirkulujících lipidů pomocí sulfo-fosfovanilínového testu jsme mezi všemi testovanými genotypy v porovnání s kontrolami nezjistili žádný významný rozdíl

(Obr. 11). Tento výsledek naznačuje, že absence AKH a také CRZ signalizace neovlivňuje hladinu lipidových zásob u larev ve 3. instaru.



Obr. 17: Hladina cirkulujících DG se larev všech testovaných mutantů v *Akh* a *CrzR* a dvojného mutantu *Akh¹, CrzR⁰¹* neliší od kontrol ($p = 0,238$). Data v tomto grafu jsou prezentována jako \pm SEM, $n = 2$ nezávislé replikace s 15 larvami v každé replikaci, pro vyhodnocení byla použita jednocestná ANOVA.

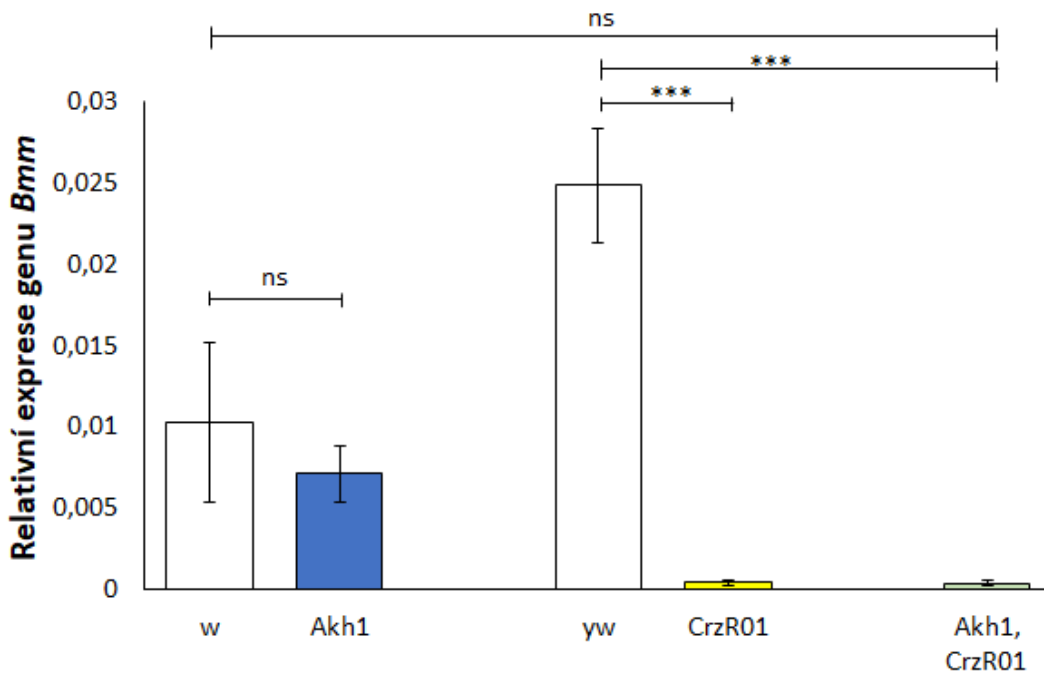
4.8. Kvantifikace exprese genu *Bmm*

Studie provedená Grönke et al. (2007) ukázala, že kromě AKH signalizace se na regulaci lipolýzy u *D. melanogaster* podílí také další signální dráha, která zahrnuje lipázu Brummer a na AKH signalizaci není závislá. Proto jsme chtěli zjistit, zda vlivem této signalizace došlo ke kompenzaci fenotypu mutantů v *Akh* a *CrzR*.

Pro zjištění vlivu mutace v *Akh* a *CrzR* a obou mutací dohromady na signalizaci zahrnující lipázu Brummer jsme u larev mutantů ve 3. instaru stanovili míru exprese genu *Bmm* pomocí kvantitativní RT PCR. Testovali jsme mutanty *Akh¹*, *CrzR⁰¹* a dvojného nulového mutantu *Akh¹, CrzR⁰¹*. Jako kontroly byly použity larvy *w* a *yw*.

Kvantifikací genové exprese genu *Bmm* jsme detekovali rozdílné hladiny mezi testovanými mutanty. U mutantu *CrzR⁰¹* jsme zjistili výrazně sníženou hladinu exprese *Bmm*. Oproti tomu u mutantu *Akh¹* jsme zjistili marginální, statisticky nevýznamné zvýšení exprese *Bmm*. Dvojný mutant naopak vykazoval trend nižší genové exprese *Bmm*, který však nebyl statisticky významný v porovnání s oběma kontrolami (Obr. 17).

Tyto výsledky indikují, že mezi CRZ signální dráhou a lipázou Brummer pravděpodobně existuje vztah pozitivní regulace. Kompenzaci fenotypu mutantů *Akh¹* a *CrzR⁰¹* a dvojného mutantu *Akh¹, CrzR⁰¹* jsme však neprokázali.



Obr. 18: Relativní genová exprese genu *Bmm* stanovená pomocí kvantitativní RT PCR. Zatímco u mutantu *CrzR⁰¹* byla zjištěna nižší transkripce *Bmm* ($p < 0,001$) u mutantu *Akh¹* nebyla zjištěna změna oproti kontrole ($p = 0,5191$). U dvojného mutantu *Akh¹, CrzR⁰¹* byl zjištěn signifikantní pokles transkripce *Bmm* oproti kontrole *yw* ($p < 0,001$), avšak oproti kontrole *w* nebyl tento rozdíl statisticky významný ($p = 0,0602$); výsledek proto uvádíme jako statisticky nevýznamný. Data v tomto grafu jsou prezentována jako \pm SEM, $n = 2$ nezávislé replikace s 30 larvami v každé replikaci, pro vyhodnocení byl použit Studentův dvouvýběrový *t*-test.

5. Diskuze

Signalizace AKH je zodpovědná za mobilizaci energetických zásob, čímž se stává významným regulátorem metabolismu sacharidů a lipidů (Arrese a Sougales, 2010). Sekvenováním několika hmyzích genomů se zjistilo, že podobných peptidů může být více. Na základě srovnání sekvencí genů *Akh/Crz* a *AkhR/CrzR* byla vyslovena hypotéza, že tyto geny vznikly subfunkcionalizací ancestrálního společného genu (Hansen et al., 2013). Dosavadní studie CRZ signalizace i řada studií signalizace AKH jsou založeny na datech získaných pomocí lokálního (RNAi) umlčení exprese *Crz* a *CrzR*, případně z ablaci buněk produkujících CRZ. V naší studii jsme se věnovali srovnání účinků signalizace AKH a CRZ u *D. melanogaster* pomocí genetických metod. Pro širší pochopení této problematiky jsme křížením much s nefunkční AKH a CRZ signalizací získali dvojného nulového mutantu v drahách AKH a CRZ a snažili se objasnit vzájemné zapojení těchto signalizací v regulaci metabolismu sacharidů a lipidů u larev a v rezistenci vůči hladovění u dospělců. Ověřili jsme rovněž účinky injikace CRZ na hladinu cirkulujících sacharidů a testovali jsme i vliv mutací v *Akh* a *CrzR* na inzulínovou signalizaci.

5.1. Vliv *Akh* a *CrzR* na hladinu DG a transkripci *Bmm*

AKH signalizace je jeden z hlavních regulátorů metabolismu tuků u celé řady hmyzu (Canavoso et al., 2001), včetně *D. melanogaster*. Mouchy s nulovými mutacemi v AKH dráze mají vyšší tělesnou hmotnost a větší zásoby TG (Gáliková et al., 2015; Bednářová et al., 2018), což naznačuje sníženou schopnost mobilizace tukových zásob. Avšak zdá se, že u larev funguje tato regulace odlišně. V našich pokusech na larvách 3. instaru jsme u mutantů v AKH pozorovali nezměněné hladiny cirkulujících DG (Obr. 17). Podobnou absenci účinku AKH na hladinu TG popsali Gáliková et al. (2015).

Vliv CRZ signalizace na metabolismus lipidů není příliš prozkoumaný. Podle literatury ablace CRZ produkujících neuronů a umlčení exprese *CrzR* v tukovém tělese dospělců neukázaly během normálních krmných podmínek žádné účinky na hladinu lipidů, avšak během hladovění se snížení CRZ signalizace projevilo znatelně pomalejším štěpením TG (Kapan et al., 2012; Kubrak et al., 2016). Naše výsledky u larev ukázaly, že za normálních krmných podmínek nemá CRZ signalizace vliv na hladinu cirkulujících DG (Obr. 16).

Pokud by dráhy AKH a CRZ fungovaly nezávisle a měly každý na metabolismus lipidů u larev pouze malý účinek, tento účinek by mohl být aditivní. Prověřili jsme tedy možnost spolupůsobení obou signálů na hladinu cirkulujících lipidů. Dvojný mutant *Akh¹, CrzR⁰¹* však

také nevykazoval žádné rozdíly ve hladině cirkulujících DG oproti kontrole (Obr. 17). Naše výsledky nenaznačují spolupůsobení AKH a CRZ signalizace v regulaci uvolňování lipidů u larev.

Podle výsledků laboratoře profesora Kühnleina podléhá kontrola homeostázy lipidů působení ještě dalších faktorů, například je kontrolována množstvím lipázy Brummer (Grönke et al., 2012). Proto jsme testovali, jak se *Bmm* chová u larev s nefunkční signalizací AKH a CRZ. U mutanta v AKH dráze nebyla transkripční aktivita genu *Bmm* změněna (Obr. 18). Je však zajímavé, že deficit CRZ signalizace u larev mutanta *CrzR⁰¹* způsobil silné snížení exprese genu *Bmm*. Marginální trend snížené exprese *Bmm* jsme pozorovali u dvojného mutanta *Akh¹, CrzR⁰¹*.

Naše pozorování podporují tvrzení, že lipolytická dráha zahrnující lipázu Brummer funguje nezávisle na AKH signalizaci (Grönke et al., 2012). Zároveň přináší nový výsledek, že mezi CRZ signalizací a dráhou zahrnující lipázu Brummer pravděpodobně existuje pozitivní regulace. Protože hladina cirkulujících DG nebyla u žádného z testovaných mutantů změněna, je pravděpodobné že pokud k lipolýze u larev dochází, tohoto mechanismu se nejspíš účastní jiné mechanismy.

5.2. Vliv *Akh* a *CrzR* na metabolismus sacharidů

Metabolismus cukrů v periferních tkáních hmyzu řídí systém inzulín/AKK, jenž funguje podobně jako systém inzulín/glukagon u savců. Podle některých studií se signalizace AKH a také CRZ podílejí na regulaci inzulínové signalizace (Kapan et al., 2012; Neufeld a Kim, 2015).

Neufeld a Kim (2015) uvádějí, že buňky *corpora cardiaca* snímají hladinu trehalózy a prostřednictvím AKH signalizace vysílají IPC signál pro sekreci ILP3. Regulace inzulínové signalizace prostřednictvím CRZ dráhy není dosud zcela prozkoumána. Kapan et al. (2012) ale popsali axonová spojení IPC a CRZ produkujících buněk. Protože buňky produkující CRZ také exprimují chuťové receptory pro fruktózu (Miyamoto et al., 2013), je možné, že tyto receptory prostřednictvím CRZ signalizace předávají IPC informace o hladině sacharidů v potravě a tím ovlivňují produkci a sekreci ILP.

Naše výsledky potvrdily, že injikovaný CRZ funguje podobně jako AKH (Kučerová, nepublikovaná data), protože se po injikaci u dospělců zvyšuje hladinu celkových sacharidů (Obr. 9), a pozorovali jsme i trend snížené hladiny sacharidů v hemolymfě larev mutantů *CrzR⁰¹* (Obr. 10), který opět připomínal mutanty v signální dráze AKH.

Je však překvapivé, že u dvojného mutantu *Akh¹, CrzR⁰¹* naopak dochází ke zvýšení hladiny sacharidů v hemolymfě. Tento výsledek by mohl naznačovat změny v inzulínové signalizaci. Úzkou souvislost mezi aktivitou AKH a uvolňováním ILP3 do hemolymfy nedávno popsali Kim a Neufeld (2015). Také se ukazuje, že při vysokých hladinách glukózy v hemolymfě tytéž neurony v hmyzím mozku zřejmě udržují jak homeostázu glukózy podporou sekrece ILP2, tak zároveň potlačují i uvolňování AKH (Oh et al., 2019).

5.3. Vztah AKH, CRZR a inzulínové signalizace

Jedním z možných vysvětlení zvýšené hladiny sacharidů v hemolymfě dvojného mutantu *Akh¹, CrzR⁰¹* tedy mohlo být poškození inzulínové signalizace. Naše experimenty s imunodetekcí obsahu ILP2 a ILP3 v IPC v mozku larev ukázaly zvýšenou koncentraci těchto peptidů u mutantů *Akh¹, CrzR⁰¹* a dvojného mutantu, což tuto hypotézu nepodporovalo (Obr. 11–14). Je však možné, že u těchto mutantů dochází ke změnám v sekreci ILP do hemolymfy. Kvůli vysoké podobnosti jednotlivých ILP a jejich nízké koncentraci je detekce těchto peptidů v hemolymfě značně obtížná, a proto jsme se zaměřili na zjištění změn celkové inzulínové signalizace pomocí kvantifikace exprese genu *Thor*, jehož transkripční aktivita je negativně regulována aktivní inzulínovou signalizací (Puig et al., 2003).

Naše měření ukázalo, že u nulových mutantů v *Akh* dochází ke značně nižší expresi *Thor* (Obr. 10), což naznačuje zvýšenou aktivitu inzulínové signalizace. Tento výsledek odpovídá fenotypu snížené hladiny cirkulujících sacharidů a nevýznamně zvýšené hmotnosti larev. Zvýšená koncentrace ILP2 a ILP3 v IPC pak může být interpretována rozdílnými způsoby. Jednou z možností je, že akumulace ILP2 a ILP3 v IPC kvůli nemožnosti vyplavení těchto peptidů do hemolymfy způsobuje zvýšení sekrece jiných ILP, které způsobují zvýšení inzulínové signalizace. Existuje ale také možnost, že ke zvýšení inzulínové signalizace došlo v důsledku zvýšené produkce a také sekrece ILP2 a/nebo ILP3 do hemolymfy.

U nulového mutantu v *CrzR* jsme detekovali zvýšenou koncentraci ILP2 a ILP3 v IPC, což současně se sníženou inzulínovou signalizací v podobě nižší exprese *Thor* (Obr. 10), může ukazovat na nemožnost uvolnění těchto peptidů do hemolymfy. Snížení inzulínové signalizace je v souladu se studií (Kapan et al., 2012) ukazující, že u much s (RNAi) umlčenou expresí *CrzR* v IPC došlo ke snížení inzulínové signalizace za zvýšení hladiny glukózy v těle much. Přestože je inzulínová signalizace u larev nulových mutantů v *CrzR* snížená, naše měření v rozporu s výsledky zmíněného umlčení *CrzR* v IPC ukázalo nižší hladinu cirkulujících sacharidů. Avšak je potřeba podotknout, že nulový mutant v *CrzR* má plně nefunkční CRZ

signalizaci, kdežto RNA interference umlčuje expresi *CrzR* pouze lokálně a s omezenou efektivitou. Navíc práce provedená Lee et al. (2008) ukázala, že ablace CRZ produkujících neuronů u larev způsobila významné snížení hladiny trehalózy.

Celkově z těchto výsledků vyvozujeme, že nulová mutace v *CrzR* pravděpodobně způsobila zvýšenou hladinu glukózy vlivem snížené inzulínové signalizace. Avšak tato změna se v hladině celkových cirkulujících sacharidů neprojevila, protože také pravděpodobně došlo k výraznému snížení hladiny trehalózy, která je v hemolymfě zastoupená přibližně v desetkrát větším množství. Je zajímavé, že fenotyp mutantů *CrzR⁰¹* (snížení cirkulujících sacharidů a nevýznamně zvýšené hmotnosti) se shoduje s fenotypem mutantů v *Akh*. Z testování dvojného mutantů *Akh¹, CrzR⁰¹* je zřejmé, že ve fenotypu mutantů *CrzR⁰¹* hraje AKH signalizace klíčovou roli. Larvy se současným deficitem AKH i CRZ signalizace totiž vykazují typické známky cukrovky zahrnující zvýšenou hladinu cirkulujících sacharidů, značně sníženou hmotnost a marginální trend snížené inzulínové signalizace.

Do budoucna by bylo dobré věnovat bližší pozornost vlivu mutace v *CrzR* na expresi a sekreci AKH, což by mohlo přispět k objasnění projevu nulové mutace v *CrzR*.

5.4. Vliv AKH a CRZR na rezistenci vůči hladovění u dospělců

Jedním z fenotypů, který jsme pozorovali u mutantních much v drahách AKH a CRZ byla změna v odolnosti vůči hladovění v porovnání s kontrolami (Obr. 8). U všech testovaných mutantů v AKH dráze byla patrná signifikantně zvýšená rezistence vůči hladovění. U much deficientních na AKH signalizaci totiž dochází ke zvýšení tukových zásob a k poklesu lokomoční aktivity (Gáliková et al., 2015). Mouchy tím pádem šetří energii, což dohromady s vyššími tukovými zásobami vede ke snížení citlivosti na hladovění. Toto tvrzení podporuje také pozorování naopak snížené rezistence vůči hladovění u much s ektopickou expresí AKH (Sajwan et al., 2015).

U mutantů v *CrzR* jsme pozorovali naprosto opačný účinek. Nulový mutant pro *CrzR* během přežívání výrazně kratší dobu než kontroly. Proto se domníváme, že CRZ signalizace zvyšuje odolnost vůči hladovění. Hypermorfa pro *CrzR* naopak přežívala delší dobu, což je v souladu s naší domněnkou. Toto pozorování se liší od efektu snížené CRZ signalizace (RNAi), kdy tyto mouchy přežívaly během hladovění déle než jejich kontroly (Kapan et al., 2012; Kubrak et al., 2016). Tyto výzkumy také zjistily, že mouchy se sníženou CRZ signalizací mají srovnatelné množství lipidových a glykogenových zásob jako kontrolní mouchy, ale během hladovění čerpají tyto zásoby pomaleji. Snížená CRZ signalizace navíc

způsobuje snížený příjem potravy (Kubrak et al., 2016), v čemž vidíme možnou příčinu vysoké citlivosti na hladovění u nulového mutantu v *CrzR*.

Domníváme se, že nulový mutant v *CrzR* možná nepřijímá dostatečné množství potravy pro ukládání zásobních lipidů a sacharidů. Zvýšená citlivost na hladovění pak může být důsledkem nedostatečného množství energetických zásob, které pravděpodobně nevyrovná ani jejich pomalejší čerpání. Do budoucna by bylo dobré podpořit tuto teorii kvantifikací TG a glykogenu.

U dvojného mutantu *Akh¹, CrzR⁰¹* je efekt mutace v *CrzR* zřejmě potlačen, protože tyto mouchy přeživaly během hladovění stejně dlouho jako mutanti *Akh¹*.

Závěrem bych ráda podotkla, že všechna naše testování proběhla na mutantech, kteří nemají sjednocené genetické pozadí. Tato data jsou proto pouze předběžná a mohou vyžadovat další upřesnění.

6. Závěr

1. Ověřili jsme existující mutanty v *CrzR* a zjistili jsme, že mutant *CrzR^l* je hypomorfa *CrzR^{MiMIC}*.
2. Vztah mezi *Akh* a *CrzR* se ukázal být komplexní – obě dráhy se nezdají být v přímém vztahu a zároveň vykazují značné vzájemné interakce i interakce s inzulínovou signalizací.
3. Zatímco *Akh* a *CrzR* mají prokazatelný vliv na hladinu cirkulujících sacharidů v larvách, vliv na hladinu cirkulujících lipidů jsme neprokázali.
4. Na základě našich výsledků s měřením transkripce genu *Thor* se zdá, že signalizace AKH ovlivňuje inzulínovou signalizaci negativně, zatímco signalizace CRZ naopak působí pozitivně.
5. Fenotyp dvojných mutantů *Akh* a *CrzR* připomíná projevy cukrovky u savců v tom, že přes vysokou hladinou cukru je signalizace inzulínu velmi nízká (larvy mají nízkou hmotnost).

7. Seznam použitých zkratek

ACP – peptid podobný adipokinetickému hormonu a corazoninu

ACPR – receptor peptidu podobného adipokinetickému hormonu a corazoninu

AKH – adipokinetický hormon

Akh – gen pro adipokinetický hormon

AkhR – gen pro receptor adipokinetického hormonu

AKHR – receptor adipokinetického hormonu

BDSC – „Bloomington Drosophila Stock Centre“

Bmm – gen pro Brummer

CCAP – „crustacean cardioactive peptide“ (kardioaktivní peptid korýšů)

CRZ – corazonin

Crz – gen pro corazonin

CrzR – gen pro corazoninový receptor

CRZR – receptor pro corazonin

DG – diglyceridy

DNTP – dioxynukleotid trifosfát

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

Gln – glutamin

GnRH – receptor gonádoliberinů

GPCR – „G protein coupled receptor“ (receptor spřažený s G proteinem)

His – histidin

ILP – „insulin like peptide“ (inzulínu podobný peptid)

IPC – „insulin producing cells“ (inzulín produkující buňky)

PB – fosfátový pufr

PBT – fosfátový pufr s tritonem

PCR – „polymerase chain reaction“ (polymerázová řetězová reakce)

PI3K – fosfatidylinositol 3-kináza

PIP2 – fosfatidylinositolbisfosfát

PIP3 – fosfatidylinositoltrisfosfát

PTEN – fosfatidylinositoltrisfosfát 3-fosfatáza

RNAi – RNA interference

RT PCR – „real time polymerase chain reaction“ (polymerázová řetězová reakce v reálném čase)

TG – triglyceridy

Thr – threonin

8. Seznam literatury

ARRESE, Estela L. a Jose L. SOULAGES. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*. 2010, **55**(1), 207-225. DOI: 10.1146/annurev-ento-112408-085356. ISSN 0066-4170.

BALLESTEROS, Juan A., Lei SHI a Jonathan A. JAVITCH. Structural Mimicry in G Protein-Coupled Receptors: Implications of the High-Resolution Structure of Rhodopsin for Structure-Function Analysis of Rhodopsin-Like Receptors. *Molecular Pharmacology*. 2001, **60**(1), 1-19. DOI: 10.1124/mol.60.1.1. ISSN 0026-895X.

BEDNÁŘOVÁ, Andrea, Aleš TOMČALA, Michaela MOCHANOVÁ, Dalibor KODRÍK a Natraj KRISHNAN. Disruption of Adipokinetic Hormone Mediated Energy Homeostasis Has Subtle Effects on Physiology, Behavior and Lipid Status During Aging in *Drosophila*. *Frontiers in Physiology*. 2018, **9**. DOI: 10.3389/fphys.2018.00949. ISSN 1664-042X.

BELLEN, Hugo J., Robert W. LEVIS, Yuchun HE, et al. The *Drosophila* Gene Disruption Project: Progress Using Transposons With Distinctive Site Specificities. *Genetics*. 2011, **188**(3), 731-743. DOI: 10.1534/genetics.111.126995. ISSN 0016-6731.

BERRIDGE, Michael J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 1993, **361**(6410), 315-325. DOI: 10.1038/361315a0. ISSN 0028-0836.

BHARUCHA, K. N., P. TARR a S. L. ZIPURSKY. A glucagon-like endocrine pathway in *Drosophila* modulates both lipid and carbohydrate homeostasis. *Journal of Experimental Biology*. 2008, **211**(19), 3103-3110. DOI: 10.1242/jeb.016451. ISSN 0022-0949.

BRINKMANN, Joep F.F., Nada A. ABUMRAD, Azeddine IBRAHIMI, Ger J. VANDERVUSSE a Jan F.C. GLATZ. New insights into long-chain fatty acid uptake by heart muscle: a crucial role for fatty acid translocase/CD36. *Biochemical Journal*. 2002, **367**(3), 561-570. DOI: 10.1042/bj20020747. ISSN 0264-6021.

BUCH, Susanne, Christoph MELCHER, Matthias BAUER, Joerg KATZENBERGER a Michael J. PANKRATZ. Opposing Effects of Dietary Protein and Sugar Regulate a Transcriptional Target of *Drosophila* Insulin-like Peptide Signaling. *Cell Metabolism*. 2008, **7**(4), 321-332. DOI: 10.1016/j.cmet.2008.02.012. ISSN 15504131.

BURGESS, Andrew, Suzanne VIGNERON, Estelle BRIOUDES, Jean-Claude LABBÉ, Thierry LORCA a Anna CASTRO. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010, **107**(28), 12564-12569. DOI: 10.1073/pnas.0914191107. ISSN 0027-8424.

CAERS, Jelle, Heleen VERLINDEN, Sven ZELS, Hans Peter VANDERSMISSEN, Kristel VUERINCKX a Liliane SCHOofs. More than two decades of research on insect neuropeptide GPCRs: an overview. *Frontiers in Endocrinology*. 2012, **3**. DOI: 10.3389/fendo.2012.00151. ISSN 1664-2392.

CANAVOSO, Lilián E, Zeina E JOUNI, K Joy KARNAS, James E PENNINGTON a Michael A WELLS. F AT M ETABOLISM IN I NSECTS. *Annual Review of Nutrition*. 2001, **21**(1), 23-46. DOI: 10.1146/annurev.nutr.21.1.23. ISSN 0199-9885.

CHINO, H. Insect hemolymph lipophorin: A mechanism of lipid transport in insects. *Advances in Biophysics*. 1982, **15**, 67-92. DOI: 10.1016/0065-227X(82)90005-3. ISSN 0065227X.

DIANGELO, Justin R. a Morris J. BIRNBAUM. Regulation of Fat Cell Mass by Insulin in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*. 2009, **29**(24), 6341-6352. DOI: 10.1128/MCB.00675-09. ISSN 0270-7306.

FLATT, T., K.-J. MIN, C. D'ALTERIO, E. VILLA-CUESTA, J. CUMBERS, R. LEHMANN, D. L. JONES a M. TATAR. *Drosophila* germ-line modulation of insulin signaling and lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008, **105**(17), 6368-6373. DOI: 10.1073/pnas.0709128105. ISSN 0027-8424.

GÄDE, Gerd. Peptides of the Adipokinetic Hormone/Red Pigment-Concentrating Hormone Family. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2009, **1163**(1), 125-136. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2008.03625.x. ISSN 00778923.

GÁLIKOVÁ, Martina, Max DIESNER, Peter KLEPSATEL, Philip HEHLERT, Yanjun XU, Iris BICKMEYER, Reinhard PREDEL a Ronald P. KÜHNLEIN. Energy Homeostasis Control in *Drosophila* Adipokinetic Hormone Mutants. *Genetics*. 2015, **201**(2), 665-683. DOI: 10.1534/genetics.115.178897. ISSN 0016-6731.

GÁLIKOVÁ, Martina, Peter KLEPSATEL, Yanjun XU a Ronald P. KÜHNLEIN. The obesity-related Adipokinetic hormone controls feeding and expression of neuropeptide regulators of *Drosophila* metabolism. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2017, **119**(3). DOI: 10.1002/ejlt.201600138. ISSN 14387697.

GRÖNKE, Sebastian, David-Francis CLARKE, Susan BROUGHTON, T. Daniel ANDREWS, Linda PARTRIDGE a Eric RULIFSON. Molecular Evolution and Functional Characterization of *Drosophila* Insulin-Like Peptides. *PLoS Genetics*. 2010, **6**(2). DOI: 10.1371/journal.pgen.1000857. ISSN 1553-7404.

GRÖNKE, Sebastian, Günter MÜLLER, Jochen HIRSCH, et al. Dual Lipolytic Control of Body Fat Storage and Mobilization in *Drosophila*. *PLoS Biology*. 2007, **5**(6). DOI: 10.1371/journal.pbio.0050137. ISSN 1545-7885.

GRUNTENKO, N.E. a I.Yu. RAUSCHENBACH. The role of insulin signalling in the endocrine stress response in *Drosophila melanogaster*: A mini-review. *General and Comparative Endocrinology*. 2018, **258**, 134-139. DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.05.019. ISSN 00166480.

HANSEN, Karina K., Elisabeth STAFFLINGER, Martina SCHNEIDER, et al. Discovery of a Novel Insect Neuropeptide Signaling System Closely Related to the Insect Adipokinetic Hormone and Corazonin Hormonal Systems. *Journal of Biological Chemistry*. 2010, **285**(14), 10736-10747. DOI: 10.1074/jbc.M109.045369. ISSN 0021-9258.

HARDIE, D. G. Organismal Carbohydrate and Lipid Homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2012, **4**(5), a006031-a006031. DOI: 10.1101/cshperspect.a006031. ISSN 1943-0264.

HAUSER, Frank a Cornelis J.P. GRIMMELIKHUIJZEN. Evolution of the AKH/corazonin/ACP/GnRH receptor superfamily and their ligands in the Protostomia. *General and Comparative Endocrinology*. 2014, **209**, 35-49. DOI: 10.1016/j.ygcen.2014.07.009. ISSN 00166480.

HOI, Youn J., Gyunghee LEE, Jeffrey C. HALL a Jae H. PARK. Comparative analysis of Corazonin-encoding genes (Crz's) in *Drosophila* species and functional insights into Crz-expressing neurons. *The Journal of Comparative Neurology*. 2005, **482**(4), 372-385. DOI: 10.1002/cne.20419. ISSN 0021-9967.

HUA, Yue-Jin, Jun ISHIBASHI, Hitoshi SAITO, et al. Identification of [Arg7] 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*. 2000, **46**(6), 853-860. DOI: 10.1016/S0022-1910(99)00173-0. ISSN 00221910.

ISABEL, Guillaume, Jean-René MARTIN, Saad CHIDAMI, Jan A. VEENSTRA a Philippe ROSAY. AKH-producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioral changes in *Drosophila*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2005, **288**(2), R531-R538. DOI: 10.1152/ajpregu.00158.2004. ISSN 0363-6119.

KAPAN, Neval, Oleh V. LUSHCHAK, Jiangnan LUO a Dick R. NÄSSEL. 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*. 2012, **69**(23), 4051-4066. DOI: 10.1007/s00018-012-1097-z. ISSN 1420-682X.

KIM, Jung a Thomas P. NEUFELD. Dietary sugar promotes systemic TOR activation in *Drosophila* through AKH-dependent selective secretion of Dilp3. *Nature Communications*. 2015, **6**(1). DOI: 10.1038/ncomms7846. ISSN 2041-1723.

KIM, Seung K. a Eric J. RULIFSON. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila corpora cardiaca* cells. *Nature*. 2004, **431**(7006), 316-320. DOI: 10.1038/nature02897. ISSN 0028-0836.

KNIGHT, Joseph A, Shauna ANDERSON a James M RAWLE. Chemical Basis of the Sulfo-phospho-vanillin Reaction for Estimating Total Serum Lipids. *Clinical Chemistry*. 1972, **18**(3), 199-202. DOI: 10.1093/clinchem/18.3.199. ISSN 0009-9147.

KUBRAK, Olga I., Oleh V. LUSHCHAK, Meet ZANDAWALA a Dick R. NÄSSEL. Systemic corazonin signalling modulates stress responses and metabolism in *Drosophila*. *Open Biology*. 2016, **6**(11). DOI: 10.1098/rsob.160152. ISSN 2046-2441.

LAURENTIN, Alexander a Christine A EDWARDS. A microtiter modification of the anthrone-sulfuric acid colorimetric assay for glucose-based carbohydrates. *Analytical Biochemistry*. 2003, **315**(1), 143-145. DOI: 10.1016/S0003-2697(02)00704-2. ISSN 00032697.

LEE, Gyunghee, Kyeong-Man KIM, Keiko KIKUNO, Zixing WANG, Youn-Jeong CHOI a Jae H. PARK. Developmental regulation and functions of the expression of the neuropeptide corazonin in *Drosophila melanogaster*. *Cell and Tissue Research*. 2008, **331**(3), 659-673. DOI: 10.1007/s00441-007-0549-5. ISSN 0302-766X.

LEE, Pei Yun, John COSTUMBRADO, Chih-Yuan HSU a Yong Hoon KIM. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (62). DOI: 10.3791/3923. ISSN 1940-087X.

LORENZ, M. W. a G. GADE. Hormonal regulation of energy metabolism in insects as a driving force for performance. *Integrative and Comparative Biology*. 2009, **49**(4), 380-392. DOI: 10.1093/icb/icp019. ISSN 1540-7063.

MATSUDA, H. YAMADA T., YOSHIDA M., NISHIMURA, T. Flies without Trehalose. *Journal of Biological Chemistry*. 2015, **290**(2), 1244-1255. DOI: 10.1074/jbc.M114.619411. ISSN 0021-9258.

MIYAMOTO, Tetsuya a Hubert AMREIN. Diverse roles for the *Drosophila* fructose sensor Gr43a. *Fly*. 2014, **8**(1), 19-25. DOI: 10.4161/fly.27241. ISSN 1933-6934.

MULLIS, K., F. FALOONA, S. SCHARF, R. SAIKI, G. HORN a H. ERLICH. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1986, **51**, 263-273. DOI: 10.1101/SQB.1986.051.01.032. ISSN 0091-7451.

MURILLO-MALDONADO, J. M., G. SANCHEZ-CHAVEZ, L. M. SALGADO, R. SALCEDA a J. R. RIESGO-ESCOVAR. *Drosophila* Insulin Pathway Mutants Affect Visual Physiology and Brain Function Besides Growth, Lipid, and Carbohydrate Metabolism. *Diabetes*. 2011, **60**(5), 1632-1636. DOI: 10.2337/db10-1288. ISSN 0012-1797.

NAGARKAR-JAISWAL, Sonal, Pei-Tseng LEE, Megan E CAMPBELL, et al. A library of MiMICs allows tagging of genes and reversible, spatial and temporal knockdown of proteins in *Drosophila*. *ELife*. 2015, **4**. DOI: 10.7554/eLife.05338. ISSN 2050-084X.

NÄSSEL, Dick R. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Progress in Neurobiology*. 2002, **68**(1), 1-84. DOI: 10.1016/S0301-0082(02)00057-6. ISSN 03010082.

NÄSSEL, Dick R., Olga I. KUBRAK, Yiting LIU, Jiangnan LUO a Oleh V. LUSHCHAK. Factors that regulate insulin producing cells and their output in *Drosophila*. *Frontiers in Physiology*. 2013, **4**. DOI: 10.3389/fphys.2013.00252. ISSN 1664-042X.

OH, Yangkyun, Jason Sih-Yu LAI, Holly J. MILLS, et al. A glucose-sensing neuron pair regulates insulin and glucagon in *Drosophila*. *Nature*. 2019, **574**(7779), 559-564. DOI: 10.1038/s41586-019-1675-4. ISSN 0028-0836.

OLDHAM, William M. a Heidi E. HAMM. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008, **9**(1), 60-71. DOI: 10.1038/nrm2299. ISSN 1471-0072.

PALANKER MUSSELMAN, L., J. L. FINK, K. NARZINSKI, P. V. RAMACHANDRAN, S. SUKUMAR HATHIRAMANI, R. L. CAGAN a T. J. BARANSKI. A high-sugar diet

produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Disease Models & Mechanisms*. 2011, **4**(6), 842-849. DOI: 10.1242/dmm.007948. ISSN 1754-8403.

PARK, Jae H. a Larry L. KEELEY. In Vitro Hormonal Regulation of Glycogen Phosphorylase Activity in Fat Body of the Tropical Cockroach, *Blaberus discoidalis*. *General and Comparative Endocrinology*. 1995, **98**(3), 234-243. DOI: 10.1006/gcen.1995.1065. ISSN 00166480.

PARK, Y., Y.-J. KIM a M. E. ADAMS. 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*. 2002, **99**(17), 11423-11428. DOI: 10.1073/pnas.162276199. ISSN 0027-8424.

PREDEL, Reinhard, Susanne NEUPERT, William K. RUSSELL, Olaf SCHEIBNER a Ronald J. NACHMAN. Corazonin in insects. *Peptides*. 2007, **28**(1), 3-10. DOI: 10.1016/j.peptides.2006.10.011. ISSN 01969781.

PUIG, O. Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes & Development*. 2003, **17**(16), 2006-2020. DOI: 10.1101/gad.1098703. ISSN 0890-9369.

ROACH, P. J. DEPAOLI-ROACH A. HURLEY T.D. TAGLIABRACCI. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochemical Journal*. 2012, **441**(3), 763-787. DOI: 10.1042/BJ20111416. ISSN 0264-6021.

GOLDSWORTHY, G.J., A.R. JUTSUM a N.L. ROBINSON. Substrate utilization and flight speed during tethered flight in the locust. *Journal of Insect Physiology*. 1979, **25**(2), 183-185. DOI: 10.1016/0022-1910(79)90097-0. ISSN 00221910.

ROCH, Graeme J., Javier A. TELLO a Nancy M. SHERWOOD. At the Transition from Invertebrates to Vertebrates, a Novel GnRH-Like Peptide Emerges in *Amphioxus*. *Molecular Biology and Evolution*. 2014, **31**(4), 765-778. DOI: 10.1093/molbev/mst269. ISSN 1537-1719.

ROLLER, Ladislav, Naoki YAMANAKA, Ken WATANABE, Ivana DAUBNEROVÁ, Dušan ŽITŇAN, Hiroshi KATAOKA a Yoshiaki TANAKA. The unique evolution of neuropeptide genes in the silkworm *Bombyx mori*☆. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2008, **38**(12), 1147-1157. DOI: 10.1016/j.ibmb.2008.04.009. ISSN 09651748.

ROLLER, Ladislav, Seiji TANAKA, Kiyoshi KIMURA, Honoo SATAKE a Yoshiaki TANAKA. Molecular cloning of [Thr⁴, His⁷]-corazonin (Apime-corazonin) and its distribution in the central nervous system of the honey bee *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Applied Entomology and Zoology*. 2006, **41**(2), 331-338. DOI: 10.1303/aez.2006.331. ISSN 0003-6862.

RULIFSON, E. J. Ablation of Insulin-Producing Neurons in Flies: Growth and Diabetic Phenotypes. *Science*. **296**(5570), 1118-1120. DOI: 10.1126/science.1070058. ISSN 00368075.

SAJWAN, Suresh, Roman SIDOROV, Tereza STAŠKOVÁ, Anna ŽALOUĐÍKOVÁ, Yoko TAKASU, Dalibor KODRÍK a Michal ZUROVEC. Targeted mutagenesis and functional

analysis of adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2015, **61**, 79-86. DOI: 10.1016/j.ibmb.2015.01.011. ISSN 09651748.

SAMBROOK, Joseph a David W. RUSSELL. Purification of Nucleic Acids by Extraction with Phenol: Chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2010, **2006**(1). DOI: 10.1101/pdb.prot4455. ISSN 1940-3402.

SHA, Kai, Seung-Hoon CHOI, Jeongdae IM, Gyunghye G. LEE, Frank LOEFFLER, Jae H. PARK a Erik C. JOHNSON. Regulation of Ethanol-Related Behavior and Ethanol Metabolism by the Corazonin Neurons and Corazonin Receptor in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*. 2014, **9**(1). DOI: 10.1371/journal.pone.0087062. ISSN 1932-6203.

TANAKA, Y, Y.-J HUA, L ROLLER a S TANAKA. Corazonin reduces the spinning rate in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*. 2002, **48**(7), 707-714. DOI: 10.1016/S0022-1910(02)00094-X. ISSN 00221910.

TAWFIK, A. I., S. TANAKA, A. DE LOOF, et al. Identification of the gregarization-associated dark-pigmentotropin in locusts through an albino mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999, **96**(12), 7083-7087. DOI: 10.1073/pnas.96.12.7083. ISSN 0027-8424.

TELEMAN, Aurelio A. Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochemical Journal*. 2010, **425**(1), 13-26. DOI: 10.1042/BJ20091181. ISSN 0264-6021.

VAN MARREWIJK, Wil J.A., Aloys Th.M. VAN DEN BROEK a Dick J. VAN DER HORST. Adipokinetic hormone-induced influx of extracellular calcium into insect fat body cells is mediated through depletion of intracellular calcium stores. *Cellular Signalling*. 1993, **5**(6), 753-761. DOI: 10.1016/0898-6568(93)90036-L. ISSN 08986568.

VEENSTRA, Jan A. Isolation and structure of corazonin, a cardioactive peptide from the American cockroach. *FEBS Letters*. 1989, **250**(2), 231-234. DOI: 10.1016/0014-5793(89)80727-6. ISSN 00145793.

VROEMEN, Simon F, Dick J VAN DER HORST a Wil J.A VAN MARREWIJK. New insights into adipokinetic hormone signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1998, **141**(1-2), 7-12. DOI: 10.1016/S0303-7207(98)00079-3. ISSN 03037207.

YANG, Huipeng, Xiaobai HE, Jingwen YANG, et al. Activation of cAMP-response element-binding protein is positively regulated by PKA and calcium-sensitive calcineurin and negatively by PKC in insect. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2013, **43**(11), 1028-1036. DOI: 10.1016/j.ibmb.2013.08.011. ISSN 09651748.

ZER-KRISPIL, Shir, Hila ZAK, Lisha SHAO, Shir BEN-SHAANAN, Lea TORDJMAN, Assa BENTZUR, Anat SHMUELI a Galit SHOHAT-OPHIR. Ejaculation Induced by the Activation of Crz Neurons Is Rewarding to *Drosophila* Males. *Current Biology*. 2018, **28**(9), 1445-1452.e3. DOI: 10.1016/j.cub.2018.03.039. ISSN 09609822.

ZHANG, H., J. LIU, C. R. LI, B. MOMEN, R. A. KOHANSKI a L. PICK. Deletion of *Drosophila* insulin-like peptides causes growth defects and metabolic abnormalities. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009, **106**(46), 19617-19622. DOI: 10.1073/pnas.0905083106. ISSN 0027-8424.

ZHOU, Guoli, James E. PENNINGTON a Michael A. WELLS. Utilization of pre-existing energy stores of female *Aedes aegypti* mosquitoes during the first gonotrophic cycle. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2004, **34**(9), 919-925. DOI: 10.1016/j.ibmb.2004.05.009. ISSN 09651748.

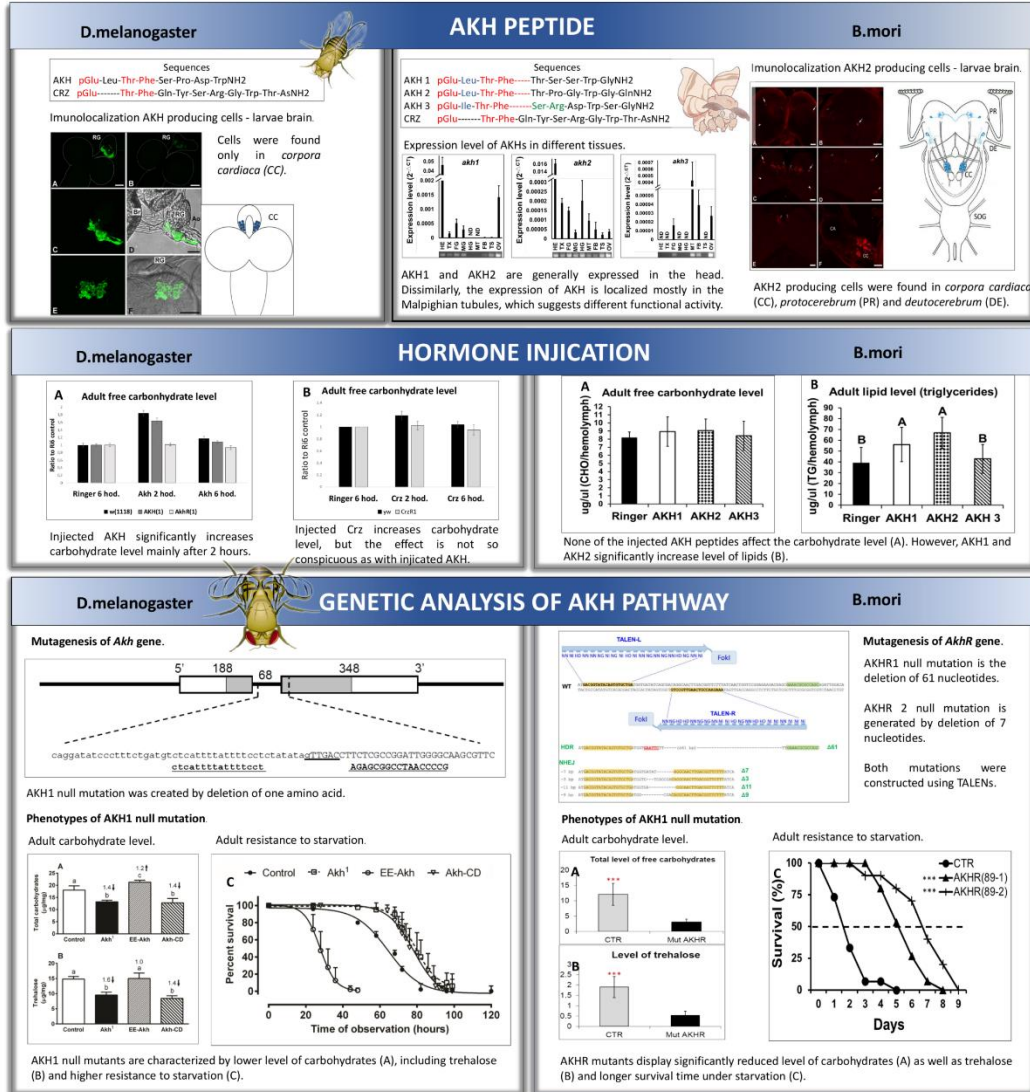
9. Příloha

Mobilization of energy stores in flies and moths

Svobodova K.^{1,2}, Tomkova S.^{1,2}, Zaloudikova A.¹, Kucerova L.¹, Konikova T.^{1,2}, Sehadova H.¹, Zurovec M.¹
¹Institute of Entomology, Biology Centre of CAS, Ceske Budejovice, CZ,
²University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Ceske Budejovice, CZ

Introduction

AKH is peptidic hormone reported in many species of insect. The function of AKH is related to mammal glucagon because of its crucial role in the regulation of metabolic homeostasis. This hormone is responsible mainly for the mobilization of lipid and carbohydrate stores to cope with energy demand. Interestingly, AKH peptides are not very conserved among insect species. Moreover, mobilization of energy store seems to be affected also by Crz, the related peptide of AKH. In order to understand mechanism of mobilization of energy stores we compared the phenotypes of mutations in AKH pathway as well as metabolic responses to injected hormones.



Conclusion

Here we show that AKH peptides in *D. melanogaster* and *B. mori* differ in many ways. Firstly, *D. melanogaster* has a single AKH peptide, which is produced in cardiac corpora. *B. mori* contains three AKHs, while AKH3 does not affect the mobilization of energy stores. Secondly, injection of AKH highly elevates carbohydrate level in *D. melanogaster*, but in *B. mori*, the level of carbohydrates is not affected. However, we observe a significant effect in lipid mobilization in *B. mori* after AKH injection. Finally, both null mutants of AKH and AKHR contain lower levels of carbohydrates and dispose with higher resistance to starvation.

Obř. 1: Plakát prezentovaný na mezinárodní konferenci „26th European Drosophila Research Conference“ – EDRC 2019 v Laussane (5. – 8. 9. 2019).