

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vliv paralytického jedu lumčíka, *Habrobracon hebetor*,
na svalovou tkáň zavíječe, *Ephesia kuehniella*
a octomilky, *Drosophila melanogaster***

Diplomová práce

Bc. Šárka Podlahová

Školitelka: Mgr. Hana Sehadová, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.

České Budějovice 2022

Podlahová, Š., 2022: Vliv paralytického jedu lumčika, *Habrobracon hebetor*, na svalovou tkáň zavíječe, *Ephestia kuehniella* a octomilky, *Drosophila melanogaster* [Effect of the venom of *Habrobracon hebetor* on *Ephestia kuehniella* and *Drosophila melanogaster* muscles. Mgr. Thesis, in Czech] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

The ectoparasitoid wasp *Habrobracon hebetor* uses its effective venom for inducing neuromuscular paralysis to ensure the proper development of its progeny in the host attacked. However, the associated mechanism of the paralysis is not known yet. The action of the venom was studied in the muscle tissue of its host larvae *Ephestia kuehniella* and in the model organism *Drosophila melanogaster* using transmission electron microscopy (TEM). Preparation of the samples for TEM was optimized to protect tissue integrity and to minimize artefacts. The results revealed that the wasp venom affected neither the organization of muscle fibres nor the structure of mitochondria. Furthermore, potential *D. melanogaster* mutants of glutamate receptor subunits GluRIIA and GluRIIB were analyzed, and the role of glutamate receptors in regulation of paralysis was discussed.

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

V Českých Budějovicích, dne 13. 4. 2022

Bc. Šárka Podlahová

Poděkování

Ráda bych poděkovala mé školitelce Mgr. Haně Sehadové, Ph.D. za pečlivé vedení, vstřícnost, ochotu a čas, který mi věnovala. Za spolupráci a odborné rady patří moje poděkování i prof. RNDr. Daliboru Kodríkovi, CSc. a prof. RNDr. Ivu Šaumanovi, Ph.D. Dále chci poděkovat MSc. Houdě Ouns Maaroufi za rady a pomoc při získávání zkušeností s molekulárně genetickými metodami a RNDr. Anně Žaloudíkové za asistenci s injikacemi. Děkuji také zaměstnancům Laboratoře elektronové mikroskopie Parazitologického ústavu Biologického centra Akademie věd ČR za poskytnutí vybavení a cenných rad. A v neposlední řadě děkuji celému kolektivu Laboratoře mikroskopie a histologie Entomologického ústavu Biologického centra Akademie věd ČR za nadstandardně přátelské a vstřícné zázemí, jmenovitě Jitce Pfliegerové, Bc. Lucii Pauchové a Bc. Jakubu Opelkovi.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Parazitoidní hmyz.....	1
1.2	Parazitoidní vosička <i>Habrobracon hebetor</i>	3
1.3	Glutamatergní nervosvalová ploténka.....	5
2	Cíle práce.....	8
3	Materiál a metody.....	9
3.1	Laboratorní zvířata.....	9
3.2	Testování možnosti přirozené paralýzy larev <i>D. melanogaster</i>	10
3.3	Injikace vosičkového jedu do <i>D. melanogaster</i>	10
3.3.1	Měření nástupu paralýzy <i>D. melanogaster</i>	11
3.4	Přirozená paralýza <i>E. kuehniella</i> vosičkou <i>H. hebetor</i>	11
3.5	Zpracování vzorků pro TEM.....	12
3.6	Křížení linií <i>D. melanogaster</i> pro mRNA analýzu.....	14
3.6.1	Izolace celkové RNA.....	15
3.6.2	Reverzní transkripce.....	15
3.6.3	Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce (RT-PCR).....	16
3.6.4	Kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR).....	17
3.6.5	Primery pro RT-PCR a qRT-PCR.....	18
4	Výsledky.....	19
4.1	Účinek jedu lumčíka <i>H. hebetor</i> na thorakální tkáň octomilky <i>D. melanogaster</i>	19
4.1.1	Testování médií pro ředění jedu a fixačních činidel.....	19
4.1.2	Injikace vosičkového jedu do thoraxu <i>D. melanogaster</i>	20
4.2	Účinek jedu lumčíka <i>H. hebetor</i> na svalovou tkáň thorakálních segmentů larvy <i>E. kuehniella</i>	23
4.3	Role glutamátových receptorů při působení jedu <i>H. hebetor</i>	25
4.3.1	Identifikace linií <i>D. melanogaster</i> s mutací v GluRIIA a GluRIIB.....	25

4.3.2	Měření nástupu paralýzy u linií s downregulací exprese <i>GluRIIA</i>	27
5	Diskuze.....	28
6	Závěr.....	30
7	Seznam použitých zkratk.....	31
8	Seznam použité literatury	32
9	Příloha 1	38

1 Úvod

1.1 Parazitoidní hmyz

Parazitismus je životní strategie některých organismů, při které parazit využívá živin zpravidla většího hostitele, jenž soužitím strádá. Přežití parazita ale závisí na přežití hostitele, proto není úmyslem jeho zabití. Jedním z druhů parazitismu je parazitoidismus. Parazitoidi jsou považováni za vysoce specializované predátory, kteří svého hostitele využijí jako živou kořist k vývoji svých larev. Parazitoidi proto na rozdíl od parazitů svého hostitele nevyhnutelně zabijí.

Parazitoidický životní styl se nejrozmanitěji vyvinul u blanokřídlého hmyzu (řád Hymenoptera). Jeho zástupci se dělí do dvou podřádů zahrnujících hmyz s různým životním stylem: širopasí (Symphyta) a štíhlopasí (Apocrita), mezi které patří např. včely, vosy a mravenci. Z předků širopasého hmyzu živícího se dřevem (např. pilatka) se vyvinul štíhlopasý ektoparazitoidní hmyz a z něho vzešel endoparazitoidní hmyz, zástupce nejsofistikovanějšího způsobu parazitoidismu. Hlavní rozdíl mezi těmito skupinami spočívá v tom, že zatímco ektoparazitoidní druhy kladou svá vajíčka na povrch těla hostitele, endoparazitoidi pronikají svým kladélkem do vnitřních tkání, kde se následně vyvíjí jejich larvy. Po dostatečném vykrmení se larvy prokousají na povrch hostitele, kde se zakuklí a dokončí přeměnu v dospělé parazitoidní vosy. Jako hostitele využívají Hymenoptera prakticky každý hmyzí řád včetně pavoukoců, což je jejich významná výhoda a důvod, proč jsou parazitoidní vosy tak úspěšné (Dowton a Austin 1998). Mezi parazitoidními zástupci existuje obrovská druhová a morfologická diverzita, proto je i velká rozmanitost ve strategiích k úspěšnému parazitismu.

Pro zajištění optimálních podmínek vývoje svého potomstva si blanokřídlí parazitoidi vyvinuli schopnost intoxikovat hostitele pomocí velmi účinného jedu. K tomuto parazitickému způsobu života mají kladélko uzpůsobené tak, že slouží nejen pro kladení vajíček, ale i pro vstříknutí jedu do hostitele. Jed endo- i ektoparazitoidů je komplexní koktejl chemikálií obsahující peptidy s vlastnostmi toxinů, což svědčí o jejich společném předchůdci (Dowton a Austin 1994). Přestože jsou některé složky jedu společné oběma skupinám, slouží k různým účelům. Ektoparazitoidi si podrobují svého hostitele krátkodobou či dlouhodobou paralýzou a pomocí vývojových blokátorů obsažených v jedu přeprogramují vývoj hostitele, aby např. během jeho svlékání nedošlo k předčasnému odstranění

parazitoidních larev z povrchu. Zásahem do metabolismu také zajistí dostatečné množství živin v hemolymfě, kterou larvy sají přes kutikulu (Beckage a Gelman 2004).

Naopak endoparazitoidi zřídka způsobují paralýzu a pokud ano, tak se hostitel vzpamatuje do 1 h a jeho vývoj může pokračovat. Místo toho si vyvinuli mechanismy na ochranu svých vajíček a larev uvnitř těla hostitele před jeho humorální a buněčnou imunitní reakcí. Endoparazitoid manipuluje hostitelem prostřednictvím symbiotických polydnavirů (PDV) integrovaných v jeho genomu, maternálními faktory a teratocyty. PDV se replikují ve specializované oblasti vaječnicků zvané „calyx“ a jsou vstříknuty do hostitele během kladení vajíček. Pozměněná fyziologie a utlumená imunitní odpověď umožňuje prosperitu vosím larvám. Tento sofistikovaný systém endoparazitoidů je jediným známým případem, kdy se virus replikuje v jednom hmyzím druhu, ale účinek má v druhu jiném (Dowton a Austin 1994). Jed endoparazitoidů rodu *Microgaster* obsahuje složky jako maternální faktory produkované vaječnicí nebo ve vaječnicích replikované polydnaviry. Zatímco maternální faktory napodobují hostitelské molekuly a chrání tak vlastní vajíčka nebo larvy před imunitní odpovědí hostitele, polydnaviry imunitní systém tlumí. Další složkou jedu endoparazitoidních vosiček jsou teratocyty pocházející ze serózní membrány, která obklopuje vyvíjející se embryo parazitoida. Funkce teratocytů není kompletně objasněna, ale primárně nejspíše slouží jako pomocné buňky zajišťující larvám přísun živin, tím pádem jim usnadňují růst (Beckage a Gelman 2004). Teratocyty endoparazitoidních larev *Perilitus coccinellae* několikanásobně zvětšují svůj objem tím, že absorbují živiny z hemolymfy pro vyvíjející se larvy, které teratocyty pozřou (Sluss 1968). Studie na *Telenomus heliothidis* ukázala, že teratocyty přispívají ke krmení larev rozkladem tkání hostitele na stravitelné živiny, které rozptylují v blízkosti larev a tím zajišťují jejich prosperitu (Strand et al. 1988).

Napadení parazitoidem spouští u hostitele obranné imunitní reakce. Buněčnou imunitní odpovědí proti parazitoidům je enkapsulace, to je zapouzdření vajíčka nebo larvy vetřelce do vrstev diferencovaných přilnavých hemocytů – lamelocytů s jejich následnou melanizací. Pro melanizaci jsou důležité profenoloxidázy produkované dalšími hemocyty – krystalickými buňkami. Melanizace je výsledkem fenoloxidázové kaskády, jejíž fenolové meziproducty neenzymaticky polymerizují na melanin, který se ukládá v lamelocytech obalujících cizí útvar v těle (Lemaitre a Hoffmann 2007; Kryukova et al. 2011). Dále se hostitel brání produkcí volných kyslíkových radikálů, které mohou být pro larvy toxické a koagulací hemolymfy. Agregace hemocytů s následnou trombózou ztěžuje krmení parazitoidním larvám (Beckage a Gelman 2004).

Také u ektoparazitoidů vede paralýza ke snížení imunitní odpovědi hostitele, převážně k útlumu fagocytózy a schopnosti enkapsulace. Částečné zachování imunity umožňuje hostiteli chránit se před oportunními infekcemi, které by mohly ovlivňovat jeho životaschopnost, která je zásadní pro vývoj ektoparazitoida (Kryukova et al. 2011). Navzdory tomu, že je známo tisíce ektoparazitoidních druhů, je identifikován pouze omezený počet složek jedu, a to jen u malého počtu ektoparazitoidů. Mechanismus paralýzy je dosud prostudován pouze částečně (Moreau a Asgari 2015). Pokusy na vosičce *Philanthus triangulum* ukazují, že filantotoxiny obsažené v jedu působí přes centrální a periferní nervový systém, kde blokují presynaptické a postsynaptické spoje na nervosvalové ploténce. Konkrétně brání uvolnění glutamátu a zároveň blokují postsynaptické glutamátové receptory (Eldefrawi et al. 1988). Jed *Eupelmus orientalis* způsobuje trvalou paralýzu a zastavuje vývoj hostitele. V jedu jsou přítomné hyaluronidázy a fosfolipázy, které zvyšují jeho účinek (Periquet et al. 1997). *Ampulex compressa* paralyzuje svou kořist (různé druhy švábů) dvěma po sobě jdoucími bodnutími. První bodnutí do hrudníku způsobuje paralýzu předních nohou hostitele v důsledku postsynaptické blokace cholinergní signální dráhy. Druhé bodnutí přímo do podjícnového ganglia vyvolá letargii indukovanou dopaminem. Vzhledem k tomu, že jed obsahuje inhibiční neurotransmitter GABA, jeho agonistu (β -alanin) a taurin, který narušuje reabsorpci GABA ze synaptické štěrbin, působí presynapticky i postsynapticky na GABA-řízené chloridové kanály (Moore et al. 2006). *Liris niger* injikuje jed do nervového systému krtonožek, kde blokuje příliv sodíkových iontů a synaptický přenos signálu (Ferber et al. 2001). Jed u *Nasonia vitripennis* způsobuje změnu v genové expresi v hemocytech hostitele, jedná se o geny ovlivňující metabolismus, buněčnou smrt, imunitu, regulaci transkripce a translace a odpověď na stres (Qian et al. 2013). Předmětem mnoha studií byl i účinek jedu *Habrobracon hebetor*, o kterém bude detailně pojednáno v další kapitole.

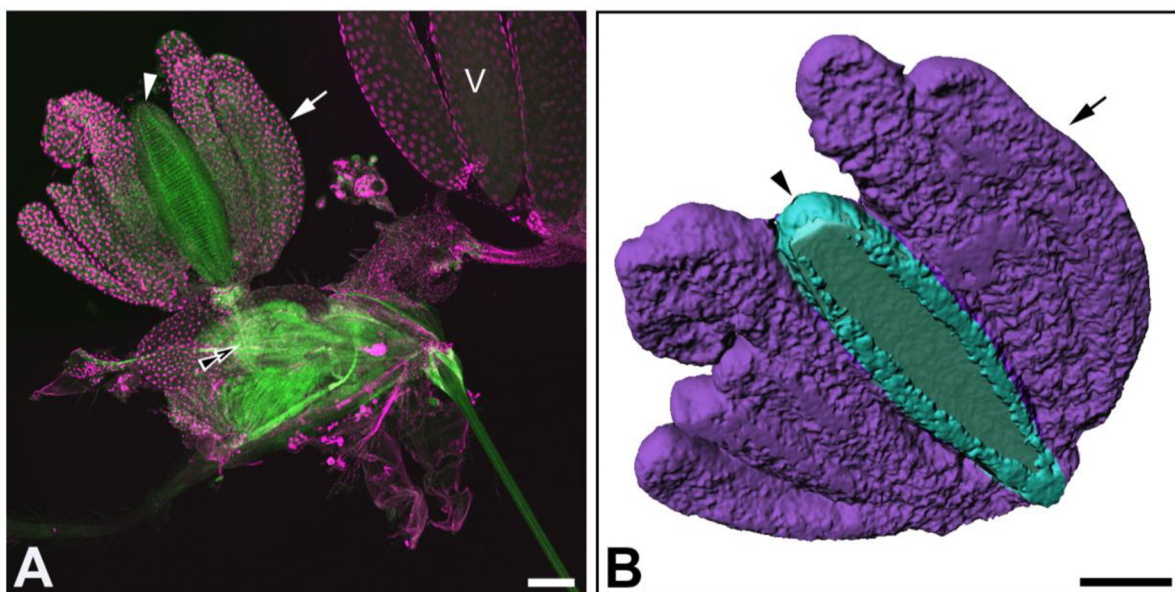
1.2 Parazitoidní vosička *Habrobracon hebetor*

Lumčík skladištní, *H. hebetor*, je parazitoidní vosička z řádu blanokřídlých (Hymenoptera, čeleď Braconidae). Tento ektoparazitoidní druh trvale paralyzuje hostitelskou larvu za účelem naklazení 3 až 20 vajíček na povrch jejího těla. Přírozeným hostitelem lumčíka jsou nejčastěji larvy motýlů rodu *Ephestia*, *Plodia* a *Galleria* (Beard 1952). Životní cyklus lumčíka trvá 2 týdny. Z nakladených vajíček se za 2 dny vylíhnou larvy, které 5 dní sají živiny z prokousané kutikuly hostitele, poté se zakuklí a za dalších 7 dní se přemění v dospěléce. Strategický životní styl lumčíkovitých se využívá jako

biologická ochrana v potravinových skladech, kde se vyskytují larvy škůdců z řádu Lepidoptera (Borzoui et al. 2016).

Parazitismus lumčíka byl detailně studován již v roce 1952 na larvě *Galleria mellonella* (Beard 1952), kdy Beard pozoroval, že lumčík nebodal do speciálního místa, tudíž transport jedu na místo působení musel zajistit až tok hemolymfy. Vzhledem k tomu, že paralýza ovlivňovala funkci svaloviny, označil místem působení jedu nervosvalovou ploténku. Efekt jedu byl podobný působení jedu kurare u obratlovců, kdy blokáci nervosvalového přenosu způsobuje kurare paralýzu kosterní svaloviny (Beard 1952, Maurya et al. 2013).

Ze studia morfologie jedové žlázy *H. hebetor* vyplývá, že je tvořena 10 jedovými váčky trubicovitého tvaru ústícími do anteriorní části primárního jedového kanálku. V centru jedových váček se nachází velký svalnatý orgán, který rovněž ústí do primárního kanálku a pravděpodobně slouží k vytlačování jedu dále do vejcovodu a až ke kladélku, které slouží také jako žihadlo (Obr. 1, Pauchová 2019).



Obr. 1: Morfologie jedové žlázy lumčíka *H. hebetor*. (A) Celkový pohled na jedovou žlázu zachycený konfokálním mikroskopem: *fialově* – buněčná jádra značená DAPI; *zeleně* – autofluorescence (Pauchová 2019). (B) 3D model jedové žlázy zhotoven v programu Imaris (Bitplane, Oxford Instruments) funkcí Surpass – Surface, pomocí které byl stanoven i celkový objem váček jedové žlázy na 12 nl. *šipky* – trubicovité váčky jedové žlázy; *hlavy šipek* – svalnatý orgán; *dvojitá hlava šipky* – primární jedový kanálek; V, vaječníky; měřítko 100 μm

S uvážením morfologie jedového aparátu se nabízí myšlenka, že maximální objem injikovaného jedu v jednom okamžiku je objem jedového reservoáru (cca 12 nl). Jelikož se vosička v bodací pozici nezdrží dlouho, musí být jed vypuštěn naráz (není zde prostor

pro pumpování jedu do oběti). Vzhledem k tomu, že vosička může vpichovat jed opakovaně v krátkých intervalech, je nepravděpodobné, že by se vždy vyprázdnil celý rezervoár, tedy pokud není sekrece do rezervoáru velmi rychlá (Beard 1952).

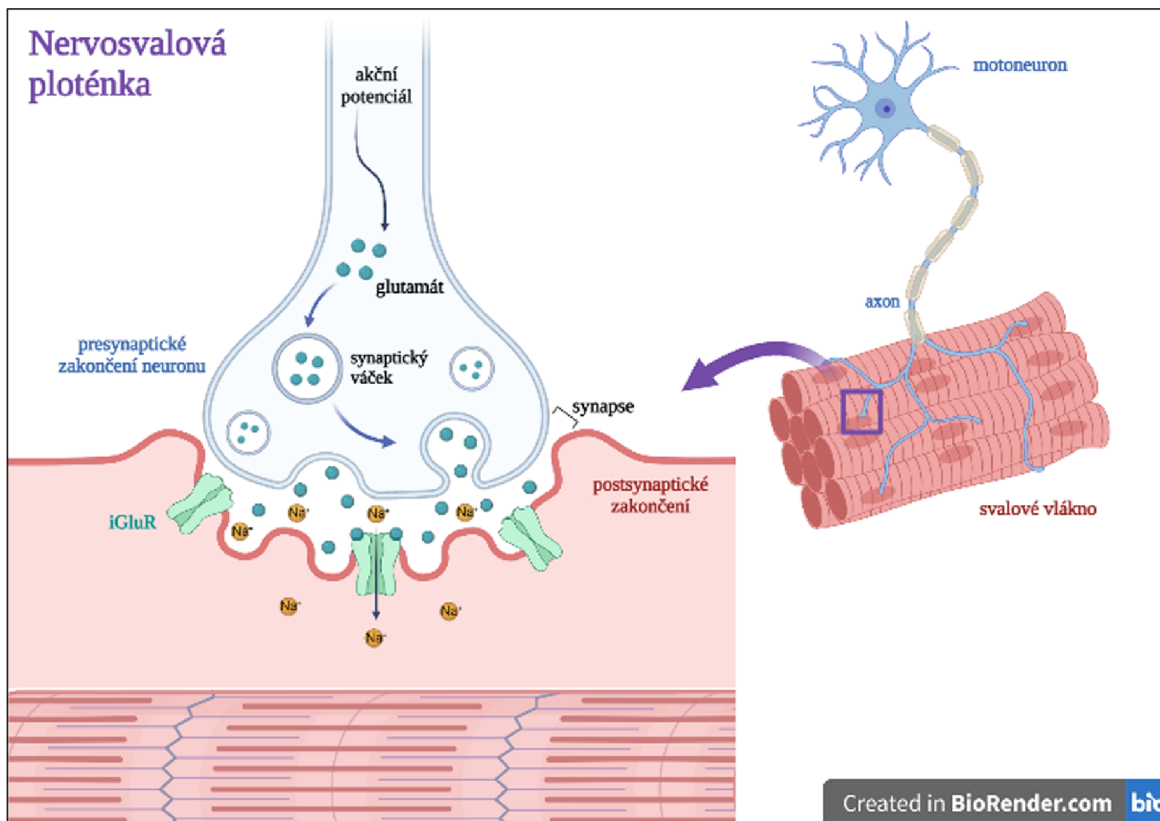
Jed *H. hebetor* je velmi účinný, 0,065 nl stačí na trvalou paralýzu *G. mellonella* (Beard 1952). Dosud byly identifikovány 3 toxické proteiny jedu s molekulovou hmotností kolem 73 kDa. Dva z nich Brh-I a Brh-II byly popsány jako insekticidní, přičemž Brh-I byl shledán velice toxickým u larev *Heliothis virescens* (Quistad et al. 1994). Analýza buněčné a humorální imunitní reakce v hemolymfě larvy *G. mellonella* paralyzované jedem *H. hebetor* odhalila silný pokles v buněčné a humorální imunitě zahrnující snížení produkce volných kyslíkových radikálů a potlačení aktivity fenoloxidázové kaskády (Kryukova et al. 2011). Paralýza nastává do 1 min po aplikaci jedu, kdy larva přestává reagovat na hmatové a elektrické podráždění. Po nastolení celkové paralýzy dochází k nepravidelným svalovým fibrilacím, které po čase ustávají. Funkční zůstává pouze střevo a srdce, jehož tep zpomaluje v důsledku znehybnění těla (Beard 1952). Mechanismus paralytické aktivity není zcela objasněn. Identifikované proteiny pravděpodobně blokují nervosvalový přenos na presynaptické membráně a tím inhibují exocytózu glutamátu z presynaptických váček. Jed je nejspíše specificky afinitní ke glutamatergní synapsi (Walther a Rathmayer 1974, Pennacchio a Strand 2006).

1.3 Glutamatergní nervosvalová ploténka

L-glutamát je hlavní excitační neurotransmitter u hmyzu přenášející vzruch v centrálním nervovém systému a na nervosvalové ploténce (NMJ), která spojuje motoneurony se svalovými vlákny (Jan a Jan 1976, Johansen et al. 1989). Funkce NMJ i glutamátových receptorů byly studovány zejména u *D. melanogaster* vzhledem k širokým možnostem zásahů do genomu tohoto modelového živočicha (Schuster et al. 1991, DiAntonio et al. 1999, Marrus et al. 2004, Featherstone et al. 2005).

NMJ u *D. melanogaster* (Obr. 2) je excitační glutamatergní synapse nacházející se v axonálním zakončení motoneuronu, vyznačující se dynamickou funkční plasticitou a rychlým přenosem signálu prostřednictvím iontů. Odpovídá tak centrálním synapsím v centrální nervové soustavě savců (Collins a DiAntonio 2007). NMJ obsahuje postsynaptické receptory homologní s receptory α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionové kyseliny (AMPA) a kainátovými receptory obratlovců (Mays et al. 2009). Avšak farmakologický profil těchto ionotropních glutamátových receptorů (iGluR) je odlišný. Neodpovídají na AMPA ani na kainát. Tyto iGluR patří do skupiny ne-N-methyl-D-

aspartátových receptorů (ne-NMDA) a formují se do postsynaptických heterotetramerů složených ze čtyř podjednotek GluRIIC, GluRIID, GluRIIE a hlavní podjednotky GluRIIA nebo GluRIIB. Podle přítomnosti hlavní podjednotky se dělí na GluR typu A nebo typu B (Featherstone et al. 2005).



Obr. 2: Glutamatergní nervosvalová ploténka. Akční potenciál putuje axonem motoneuronu do presynaptického zakončení, kde se neurotransmitter glutamát shlukuje do synaptických váčků, ve kterých je dopraven na presynaptickou membránu. Exocytózou dojde k vypuštění glutamátu do synapse, glutamát se na postsynaptické membráně naváže na glutamátové receptory (iGluR), které se otevírají pro průchod kationtů, což vyvolá svalovou kontrakci. Vytvořeno v BioRender.com.

iGluR jsou kationtové kanály propustné pro monovalentní Na^+ , K^+ a bivalentní Mg^{2+} a Ca^{2+} kationty, naopak nepropustné jsou pro chloridové anionty (Chang et al. 1994). Změny v hladinách vápenatých kationtů v postsynaptické membráně mohou být zodpovědné za iniciaci zpětnovazebného signálu, který je regulován postsynaptickou aktivitou calcium/calmodulin dependentní protein kinázy II (CaMKII). Snížením aktivity CaMKII ve svalech dojde k zesílení signálu a následnému uvolnění glutamátu, zatímco stálá aktivace CaMKII inhibuje signál a snižuje hladinu glutamátu (Haghighi et al. 2003). Tento poznatek konkrétněji doplňuje studie ukazující regulační vliv CaMKII na umístění podjednotek GluR na synapsi. Inhibice CaMKII zvyšuje množství GluRIIA, která umožňuje příliv vápenatých iontů. Na druhou stranu neustálá postsynaptická exprese CaMKII způsobuje redukci

GluRIIA a zároveň zvýšení GluRIIB, což snižuje množství vápníku. Nízká aktivita CaMKII a snížená hladina vápníku je kompenzována zvýšením GluRIIA (Morimoto et al. 2010).

Prvním identifikovaným receptorem (podjednotkou) na NMJ byl GluRIIA (Schuster et al. 1991), dříve označován jen jako GluRII až do identifikace druhého svalově specifického receptoru (podjednotky) GluRIIB (Petersen et al. 1997). Tyto dvě podjednotky sdílí podobnou strukturu exonů a intronů, leží přilehle v genomu a jsou svalově specifické. Absence jedné z podjednotek neovlivňuje životaschopnost jedince, avšak delece obou je letální. Studium delečních mutantů dále odhalilo, že pokles počtu postsynaptických GluRIIA podjednotek vyvolá zvýšené uvolnění presynaptického neurotransmiteru a naopak, nezávisle na přítomnosti GluRIIB (DiAntonio et al. 1999).

Podjednotky GluRIIA a GluRIIB se navzájem kompenzují a soutěží o přístup k podjednotce GluRIIC (někdy označovaná jako GluRIII), která je pro životaschopnost jedince nezbytná. Jednotky vzájemně ovlivňují svoje umístění v receptoru, kdy GluRIIC ovlivňuje umístění GluRIIA a GluRIIB a ty naopak ovlivňují pozici GluRIIC (Marrus et al. 2004). iGluR jsou během myogeneze syntetizovány a exprimovány velmi brzy. GluRIIA a GluRIIB byly detekovány zejména v larválních svalech a GluRIIA i v srdci dospělého (FlyBase, https://flybase.org/reports/FBgn0004620.html#expression_sub; [cit. 2021-12-08]). GluRIID je esenciální podjednotkou pro seskupení glutamátových receptorů na periferní NMJ a zároveň je nezbytná pro správnou funkci motorických neuronů v centrální nervové soustavě (Featherstone et al. 2005). Podjednotka GluRIIE také tvoří životně důležitou součást receptoru stejně jako GluRIIC a GluRIID (Qin et al. 2005).

Diplomová práce studuje vliv paralytického jedu *H. hebetor* na ultrastrukturu svalové tkáně přirozeného hostitele *E. kuehniella* a modelového organismu *D. melanogaster* pomocí transmisní elektronové mikroskopie (TEM). Práce navazuje na bakalářskou práci Šárky Podlahové, ve které byl zkoumán efekt adipokinetického hormonu (AKH) na působení jedu *H. hebetor* v thorakální svalové tkáni *D. melanogaster* (Podlahová 2019). Zatímco v původní práci byly pro aplikaci jedu a AKH použity podmínky *in vitro*, v této práci je jed aplikován *in vivo* ať už za použití přirozeného hostitele nebo za přímé injekce jedu do modelového organismu. Zpracování tkáně bylo optimalizováno tak, aby se minimalizoval vznik možných artefaktů. Dále byly testovány linie *D. melanogaster* s potenciální mutací v podjednotkách glutamátových receptorů GluRIIA a GluRIIB. A bylo prodiskutováno zapojení těchto receptorů v mechanismu paralýzy vosičkovým jedem.

2 Cíle práce

- 1) Studium účinku jedu lumčíka *Habrobracon hebetor* na thorakální tkáň octomilky *Drosophila melanogaster*.
- 2) Sledování účinku jedu *H. hebetor* na svalovou tkáň přirozeného hostitele, tj. larvy zavíječe *Ephestia kuehniella*.
- 3) Studium role glutamátových receptorů při působení jedu *H. hebetor* s využitím linií *D. melanogaster*, které mohou vykazovat změnu v expresi genů *GluRIIA* a *GluRIIB*.

3 Materiál a metody

3.1 Laboratorní zvířata

Ephestia kuehniella

V laboratorním chovu byli zavíječi drženi ve skleněných nádobách na potravě složené z pšeničného šrotu a pivovarských kvasnic v termostatu s teplotou 21–22 °C a pravidelným střídáním světla a tmy 12:12 h (LD 12:12). V těchto podmínkách trval jejich vývoj 2 měsíce. Pro experimenty zkoumající účinek přirozené paralýzy byly použity housenky 5. instaru.

Habrobracon hebetor

Vosičky byly chovány při pokojové teplotě (PT) na kukuřičném šrotu obsahujícím larvy *E. kuehniella* 5. instaru. Nově vylíhnuté vosičky byly přikrmeny ředěným medem. Část populace tvořila nový chov, část byla použita na experimenty a některé vosičky byly zmrazeny v celých kusech v -80 °C pro pozdější izolaci jedových žláz. Takto jejich životní cyklus s fotoperiodou LD 12:12 trval 2 týdny.

Drosophila melanogaster

Všechny experimentální linie byly chované ve skleněných zkumavkách se standardní kukuřičnou dietou při 25 °C v termostatu s fotoperiodou LD 12:12. Jejich životní cyklus trval 8–10 dní. Podrobný popis tohoto modelového organismu byl popsán v bakalářské práci (Podlahová 2019).

Jak pro transmisní elektronovou mikroskopii (TEM), tak pro izolaci RNA byli použiti pětidenní dospělí samci. Výběr samců proběhl v anestezii oxidem uhličitým (CO₂) pod stereomikroskopem. Jako kontrolní linie byly použity **w¹¹¹⁸**, **yw** a **yv;+;luc-RNAi**, získané z chovů Entomologického ústavu Biologického centra Akademie věd ČR v Českých Budějovicích. Linie **w¹¹¹⁸** byla použita i pro TEM. Pro studium role podjednotek glutamátových receptorů *GluRIIA* a *GluRIIB* byly v Databázi *Drosophila* genů a genomů FlyBase vytipovány linie, které byly následně obdrženy z genomových bank The Bloomington *Drosophila* Stock Centre (BDSC; NIH P40OD018537) a Kyoto Stock Centre (Kyoto DGRC). Bližší specifikace použitých linií následuje. Driverová linie použita pro downregulaci *GluRIIA* a *GluRIIB* byla **w;act-gal4/CyO,GFP;+** (Entomologický ústav Biologického centra Akademie věd ČR v Českých Budějovicích).

Kandidátní linie s možnou změnou exprese genu *GluRIIA*:

yv;+;GluRIIA-RNAi (#27497 BDSC)

RNA interferenční (RNAi) linie, umožňující tkáňově specifické utišení genu, generována projektem „Transgenic RNAi Project“ (TRiP; Perkins et al. 2015).

w;GluRIIA⁻;+ (#19218, CG14017, BDSC)

Transgenní linie s transposonem (P-elementem) před promotorovou oblastí *GluRIIA*, který by mohl zablokovat transkripci genu (Thibault et al. 2004).

Kandidátní linie s možnou změnou exprese genu *GluRIIB*:

yv;+;GluRIIB-RNAi (#28718 BDSC)

RNAi linie, umožňující tkáňově specifické utišení genu, generována TRiP (Perkins et al. 2015).

yw;GluRIIB⁻;+ (#140428, CG7234, Kyoto DGRC)

Linie s inzercí transposonu (pBac) ve třetím intronu genu *GluRIIB* blokující vznik funkčního genu (původní zdroj: Liquan Luo, Stanford University; Schuldiner et al. 2008).

3.2 Testování možnosti přirozené paralýzy larev *D. melanogaster*

Přirozená paralýza larev 3. instaru *D. melanogaster* lumčíkem *H. hebetor* byla testována ve třech opakováních, kdy 10 jedinců bylo vystaveno čtyřem parazitickým vosičkám. Chování jedinců bylo průběžně pozorováno po dobu několika dní, avšak paralýza do nepřirozeného hostitele se nezdařila.

3.3 Injikace vosičkového jedu do *D. melanogaster*

Vzhledem k tomu, že paralýza larev octomilek samotnou vosičkou se nezdařila, bylo přistoupeno na metodu injikace *in vivo*, kdy byl extrakt jedu injikován do thoraxu dospělých octomilek.

Extrakt jedu byl získán vypitváním jedových žláz z dospělců *H. hebetor* a jejich zhomogenizováním v Ringerově roztoku ve výsledné koncentraci 1 žláza (gl)/10 μ l Ringerova roztoku. Pevné části byly odseparovány centrifugací za mírných otáček 3 000 RPM. Následně byl jedový extrakt sonikován a zfiltrován (0,22 μ M filtr). Před injikací byl extrakt jedu obarven několika krystalky „Erioglaucine disodium salt“ (Thermo Fisher Scientific), který sloužil jako indikátor úspěšné aplikace jedu. Koncentrace vosičkového jedu

byla zvolena na základě předchozích prací (Shaik et al. 2017 a Podlahová 2019) tak, aby paralýza jedinců proběhla do 1 h.

Injikace byla provedena pod anestezií CO₂ za použití injikátoru NANOJECT II (Drummond Scientific) se skleněnou kapilárou. Do oblasti thoraxu mezi křídlo a halteru bylo injikováno 50 nl vosičkového jedu na dospělé s rychlostí 10 jedinců za minutu, tudíž anestezie trvala jen po nezbytně dlouhou dobu. Doba nástupu paralýzy byla přesně zaznamenána a v intervalech 1, 2 a 5 h bylo vždy pět jedinců zpracováno pro účely TEM. Jako kontrola bylo injikováno 50 nl Ringerova roztoku (128 mM NaCl, 1,3 mM KCl, 1,4 mM CaCl₂ · 2 H₂O, 2,4 mM NaHCO₃ v 1 l H₂O; pH 7,4). Doba působení kontrolního roztoku se vždy shodovala s dobou působení jedu. Pro kontrolu vlivu použitých chemikálií během zpracování vzorků bylo injikováno také 50 nl draselného pufru (1,4 M KCl, 80 mM K₂HPO₄, 20 mM KH₂PO₄) a rovněž byli zpracováni i jedinci bez jakéhokoli ošetření. Thorax byl odebrán pod stereomikroskopem, kdy od něj byla oddělena hlava, abdomen, křídla a končetiny.

3.3.1 Měření nástupu paralýzy *D. melanogaster*

Cílem experimentu bylo přesné určení nástupu paralýzy od doby aplikace jedu a vyhodnocení reverzibility paralýzy u linií *D. melanogaster*, kde byla prokázána změna v expresi glutamátových receptorů. Jed byl aplikován v anestezii CO₂ spolu s barvou Erioglaucine Disodium salt vždy do 10–20 jedinců. Kontrolní skupině byl injikován Ringerův roztok. Ošetření jedinci byli kontinuálně sledováni a byl zaznamenán čas probrání jedinců po anestezii a čas nástupu a trvání paralýzy. Data byla analyzována v programu Microsoft Excel. Statisticky významné rozdíly byly vyhodnoceny použitím dvouvýběrového t-testu v programu Prism verze 8.0 (GraphPad Software).

3.4 Přirozená paralýza *E. kuehniella* vosičkou *H. hebetor*

Na Petriho misky byly umístěny larvy *E. kuehniella* po 5–8 kusech spolu s 2 vosičkami. Bylo pozorováno, kdy a kterou larvu vosička nabodla. Bodnutá larva se chvíli bránila trhavými pohyby, ale do dvou minut ji jed ochromil. Paralyzovaná larva byla označena fixem na víko Petriho misky. Larvy byly ponechány působení paralýzy 1, 5 a 24 hodin a po těchto intervalech byly vypitvány a zpracovány pro TEM. Pro znehybnění neparalyzovaných kontrol byly larvy zchlazeny na ledu. Pitva probíhala na Petriho misce v kapce fixačního média, které bylo nutno také injikovat do těla vzhledem k jeho velikosti. Po 1 minutě, kdy bylo tělo fixací zpevněno, byly nařezány thorakální segmenty těla

a přemístěny do čerstvé fixáže, kde byly ponechány 7 dní při 4 °C. Čím menší vzorek se podařilo odebrat, tím se docílilo lepšího prosycení pryskyřicí.

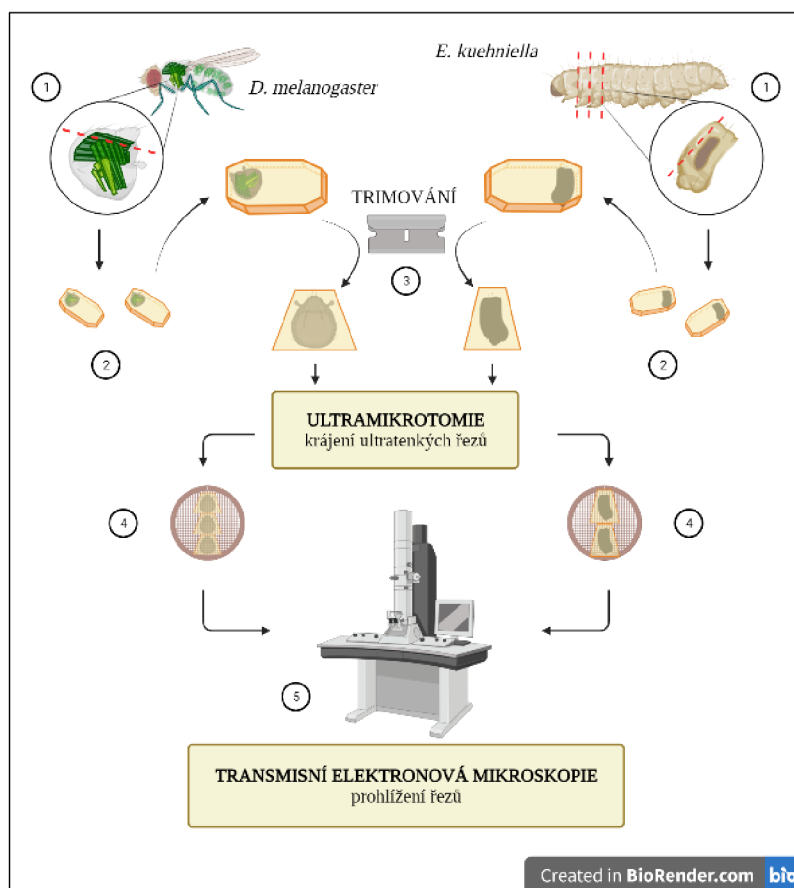
3.5 Zpracování vzorků pro TEM

Podrobný postup zpracování vzorků pro účely TEM včetně příprav roztoků a fotodokumentace je uveden v bakalářské práci Šárky Podlahové (Podlahová 2019). Vzhledem k tomu, že kromě vzorků z *D. melanogaster* byly zpracovávány i vzorky z *E. kuehniella*, která je výrazně větší, bylo nutné provést optimalizaci fixace a zalévání materiálu. Níže uvedený optimalizovaný postup byl použit pro zpracování obou organismů.

Standardní fixace 2,5% glutaraldehydem (GA) v 0,2M pufovaném fosfátovém roztoku (PBS) byla nahrazena Karnovského fixací: 2,5% GA s 2% paraformaldehydem (PA) v 0,1M pufovaném fosfátovém roztoku (PBS), ve které byly vzorky rovněž ponechány týden při teplotě 4 °C.

Pro vymytí primární fixace byl použit vypírací roztok složený z 0,1M pufru a 4% glukózy. Vzorky ve zkumavkách byly promývány 3x 20 min. Poté se vzorky na 3 h ponořily do roztoku vypíracího pufru a 4% OsO₄ v poměru 1:1 pro sekundární nafixování. Následovalo další promytí 3x 20 min. Dále byly vzorky odvodněny vzestupnou acetonovou řadou od 30% do 100% acetonu, každý po 20 min.

Dalším krokem bylo prosycování vzorků směsí pryskyřice EPON medium nebo SPURR (Electron Microscopy Sciences) a 100% acetonu v poměru 1:2, 1:1 a 2:1 vždy na 2 h. Poté byly vzorky již v čisté pryskyřici umístěny na 24 h do exsikátoru. Druhý den byly vzorky ještě přendány na 2 h do čisté pryskyřice, a poté byly pod binokulární lupou naorientovány do zalévacích silikonových forem (Obr. 3). Polymerizace pryskyřice proběhla při 62 °C v termostatu během 24 h. Správná orientace byla kritická pro získání řezů z identických svalových skupin thoraxu. Rozmístění hrudních svalů je ukázáno v Příloha 1.



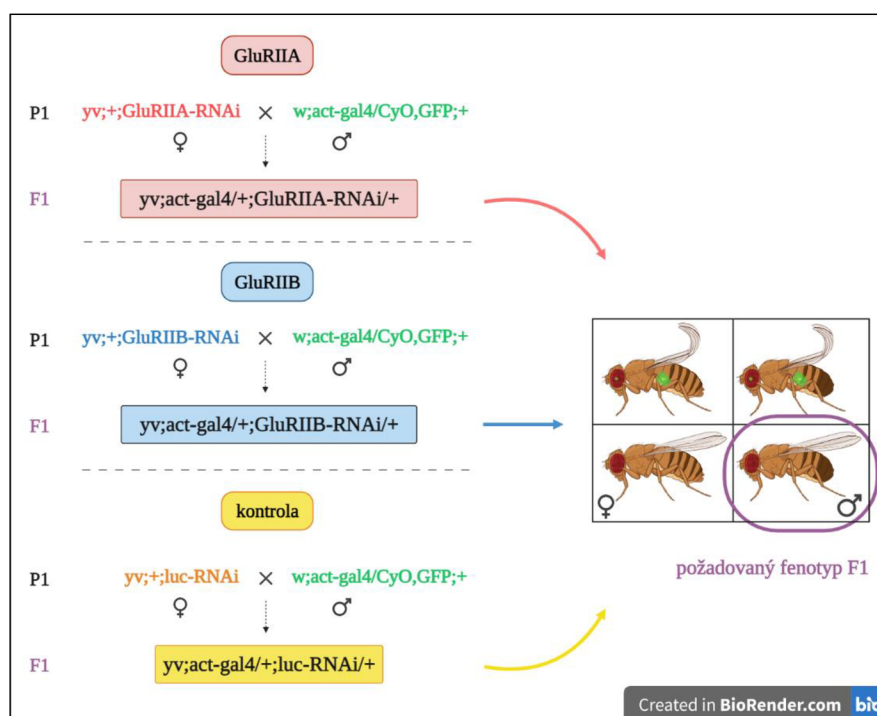
Obr. 3: Schéma orientace a krájení vzorků pro TEM. (1) Orientace thoraxu *D. melanogaster* nebo thorakálního segmentu larvy *E. kuehniella* podle požadovaného úhlu krájení; (2) odvodňování a zalévání vzorků do pryskyřicových bločků; (3) trimování = ořez pryskyřice kolem vzorku do tvaru lichoběžníku pro ultramikrotomii; (4) sítky s nabranými řezy, které jsou po kontrastování a pouhličkování připraveny k prohlížení (5). Vytvořeno v BioRender.com.

Ultratenké řezy o tloušťce 77 nm byly zhotoveny s použitím diamantového nože (Diatome MF1881) na ultramikrotomu Leica EM UC6. Po nakrájení byly ultratenké řezy ve vaničce nataženy parami chloroformu. Z vodní hladiny byly řezy nabírány na měděné sítky o průměru 3,05 mm (Electron Microscopy Sciences, 300 mesh). Sítky s řezy byly sušeny v Petriho misce na filtračním papíře. Ultratenké řezy byly kontrastovány uranyl acetátem a citrátem olova (Electron Microscopy Sciences). Po kontrastování se provedlo pouhličkování sítěk v napařovací aparatuře JEOL JEE 4C, jehož výsledkem bylo napaření 3–5 nm tenké vrstvy uhlíku na sítky.

Vzorky byly analyzovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu JEOL JEM-1010 při zvětšení 5 000–30 000x. Kontrast a jas snímků byl dále upraven v programu Adobe Photoshop (Adobe Systems).

3.6 Křížení linií *D. melanogaster* pro mRNA analýzu

S využitím UAS/GAL4 systému a driverové linie byli nakříženi jedinci za účelem aktivace RNAi příslušných genů (Obr. 4). Z responderových (testovaných) linií byly pod anestezií CO₂ vybrány neoplozené samice, které byly zkříženy se samci driverové linie a ponechány ve standardních podmínkách. Jako příslušná kontrola byla s driverovou linií nakřížena i kontrolní linie tvořící genetické pozadí linie responderové (Obr. 4). Driverová linie nesla promotor určující syntézu transkripčního faktoru GAL4 v buňkách obsahujících aktin. V úspěšném kříženci se GAL4 navázal na DNA v místě „Upstream activating sequence“ (UAS), což spustilo transkripci RNAi konstruktů, jehož přítomnost v buňce způsobila downregulaci cílového genu. První filiaální generace (F1) byla pravidelně sbírána do nových zkumavek pro zachování stejného stáří jedinců. Samci F1 nesoucí UAS/GAL4 alely byli rozpoznáni podle fenotypových znaků (Obr. 4). Jedinci s fenotypem „Curly of Oster“ (CyO) a „Green Fluorescence Protein“ (GFP) vyvolané balancerovým chromozomem driverové linie byli odstraněni, jelikož po rodičovské generaci (P1) nezdědili požadované alely.



Obr. 4: Křížení RNAi linií *D. melanogaster*. P1; parentální generace, F1; první filiaální generace. Vytvořeno v BioRender.com.

3.6.1 Izolace celkové RNA

Pětidenní samci jak mutantních linií, tak F1 kříženců byli vybráni do sterilních zkumavek po 10 kusech a zmrazení tekutým dusíkem. Zmražené vzorky byly uskladněny v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do izolace RNA. Pro pokusy byly připraveny tři biologické replikáty každé linie po 10 jedincích v každém replikátu.

Kvůli riziku degradace vzorků všudypřítomnými RNázami, byl dbán důraz na čistotu pracovní plochy, používání rukavic a laboratorního vybavení určeného výhradně pro práci s RNA. Pro izolaci RNA byl použit TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific). Vzorky byly zhomogenizovány v 1 ml TRIzol Reagent. Po 5 min inkubaci v PT bylo přidáno 200 μl chloroformu (PENTA), vzorky byly promíchány, inkubovány další 2 min v PT a poté byla RNA fáze vyseparována centrifugací (Mikro 220R, Hettich) při 11 300 RPM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 min. Horní RNA fáze byla přenesena do nové zkumavky a precipitována přidáním 500 μl isopropylalkoholu (PENTA) za 10 min inkubace při PT a centrifugace při 11 300 RPM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min. RNA precipitát byl odstředěn na dno zkumavky jako bílá gelovitá peleta. Mikropipetou byl odstraněn supernatant a peleta byla promyta v 1 ml 75% etanolu (PENTA). Krátce a jemně byl vzorek zvortexován a následně centrifugován při 8 880 RPM, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min. Mikropipetou byl odstraněn supernatant a RNA peleta byla vysušena na vzduchu přibližně za 5–10 min. Nakonec byla RNA rozpuštěna ve 30 μl nuclease-free H_2O při teplotě $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ v termobloku (SBH200D, Stuart).

Koncentrace a čistota vyizolované RNA byla změřena na přístroji NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) při ředění 20x v nuclease-free H_2O .

3.6.2 Reverzní transkripce

Vyizolovaná RNA byla použita pro syntézu 1. vlákna komplementární DNA (cDNA) pomocí kitu RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific). Reakce byla provedena podle protokolu od výrobce, příprava probíhala na ledu.

Na základě naměřených koncentrací RNA bylo sjednoceno množství templátu ve všech reakcích na 2 μg RNA. Vzorky byly předem 2x naředěny, aby se předešlo pipetovací chybě, jelikož v původní koncentraci by byl objem templátu pod 1 μl . Vypočítaný objem RNA byl doplněn nuclease-free H_2O do 10 μl . Dále byly přidány 2 μl Oligo dT primeru naředěného v poměru 1:1 nuclease-free H_2O . Celkové množství směsi RNA a primeru bylo 12 μl .

Směs byla zahřívána 5 min na $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ v termobloku a poté zchlazena na ledu. Mezitím byla podle počtu vzorků připravena reakční směs, jejíž složení je rozepsáno v tabulce

(Tab. I). Reakční směs byla rozpipetována po 8 μl k připravené směsi RNA a Oligo dT primeru. Celkový objem jedné reakce byl 20 μl .

Tab. I. Složení reakční směsi pro syntézu cDNA, objem odpovídá 1 reakci.

reagencie	objem
směs RNA s Oligo dT primerem	12 μl
5x Reaction Buffer	4 μl
RiboLock RNase Inhibitor (20U/ μl)	1 μl
10mM dNTP Mix	2 μl
RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200U/ μl)	1 μl

Reverzní transkripce probíhala 60 min při 42 °C a 5 min při 70 °C a poté byly vzorky přeneseny na led.

3.6.3 Reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)

Pro amplifikaci vzorků cDNA byl použit PPP Master Mix (Top-Bio). Jedna reakce obsahovala 30 μl PPP mixu, 1 μl forward a 1 μl reverse primeru (20 μM), 26 μl PCR H₂O a 2 μl templátu cDNA. Celkový objem jedné reakce byl 60 μl . Použité primery viz níže. RT-PCR byla provedena na přístroji Biometra TRIO (Analytik Jena) za podmínek shrnutých v následující tabulce (Tab. II).

Tab. II. Rozpis RT-PCR amplifikace.

krok	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	2 min	1
denaturace	95 °C	30 s	35
nasednutí primerů	55 °C	30 s	
extenze	72 °C	45 s	
finální extenze	72 °C	3 min	1

Produkty byly separovány na 1% agarózovém gelu v Tris-acetát-EDTA (TAE) pufru. Vzorky byly připraveny smícháním 2 μl 6x loading buffer (0,25% bromfenolová modř a 15% Ficoll), 8 μl diethylpyrokarbonát (DEPC) H₂O a 2 μl vzorku. Na gel bylo naneseno 5 μl velikostního markeru (100 bp Plus DNA Ladder, MBI-Fermentas) do první jamky a do ostatních 12 μl vzorku. Elektroforéza běžela v TAE pufru za konstantního napětí

130 V po dobu 45 min (Power Pac 200, Bio-Rad Laboratories). Pro vizualizaci produktů RT-PCR byl do gelu i TAE pufru přidán ethidium bromid (Thermo Fisher Scientific). Gel byl nasnímán zařízením White/UV Transilluminator (UVP) ovládaným softwarem Grab-it.

3.6.4 Kvantitativní RT-PCR (qRT-PCR)

Pro stanovení míry exprese mRNA *GluRIIA* a *GluRIIB* byla použita cDNA, jejíž koncentrace byla pro reakci 10x naředěna. Reakce byla provedena kitem HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (ROX) (Solis Biodyne). Postupovalo se podle protokolu od výrobce, příprava probíhala na ledu.

Pro příslušnou dvojici primerů byl připraven qRT-PCR reakční mix na počet vzorků s jednou reakcí navíc jako kontrolou bez templátu (NTC). Pro každý vzorek (biologický replikát) byla provedena tři opakování. Obecné složení reakčního mixu je znázorněno v tabulce (Tab. III). Do reakčních stripů bylo napipetováno 15 μ l příslušného reakčního mixu a 5 μ l templátu cDNA, takže celkový objem reakce byl 20 μ l.

Tab. III. Složení reakčního mixu pro qRT-PCR, objem odpovídá 1 reakci.

reagencie	objem
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (5x) *	4 μ l
forward primer (10 μ M)	0,5 μ l
reverse primer (10 μ M)	0,5 μ l
PCR H ₂ O	10 μ l
templát cDNA ředěný 10x	5 μ l

Reakce byla provedena v 72jamkovém kruhovém disku v přístroji Rotor-Gene Q (QIAGEN). Rozpis qRT-PCR kroků je shrnut v tabulce (Tab. IV).

Tab. IV. Rozpis kroků qRT-PCR amplifikace.

krok	teplota	čas	počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	12 min	1
denaturace	95 °C	15 s	40
nasednutí primerů	60 °C	20 s	
extenze	72 °C	20 s	

Data byla analyzována v programech Rotor-Gene Q Series Software a v Microsoft Excel. Hladina exprese byla vypočítána podle vzorce $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Hodnoty cyklu překročení tresholdu (ct) cílených genů byly normalizované k referenčnímu genu *rp49*. Statisticky významné rozdíly byly vyhodnoceny použitím dvouvýběrového t-testu.

3.6.5 Primery pro RT-PCR a qRT-PCR

Primery pro analýzy exprese genů *GluRIIA* a *GluRIIB* byly navrženy v programu Primer3 (dostupný zde: <https://primer3.ut.ee/>). Reverse primery zasahovaly do intronu, aby se eliminovala amplifikace genomové DNA (místo spojení exonů je v sekvenci reverse primeru označeno červenou pomlčkou). Syntéza byla provedena firmou Generi Biotech, stejně jako i primerů použitého referenčního genu *rp49* kódujícího ribozomální protein RP49.

Primery pro mRNA *GluRIIA* (produkt 220 bp):

Forward: 5' – CGTGCGTGGAACCAGATGAA – 3', pozice 2324–2343

Reverse: 5' – GGTAATCAGAGC–CCAGTGGC – 3', pozice 2543–2524

Primery pro mRNA *GluRIIB* (produkt 200 bp):

Forward: 5' – TTCAAGCCGGATGCCTTCAC – 3', pozice 2222–2241

Reverse: 5' – GACCGAAAGTCGGCGT–TCAA – 3', pozice 2421–2402

Primery pro referenční gen *rp49*:

Forward: 5' – CTTCATCCGCCACCAGTC – 3'

Reverse: 5' – GGCGACGCACTCTGTTGT – 3'

4 Výsledky

4.1 Účinek jedu lumčíka *H. hebetor* na thorakální tkáň octomilky *D. melanogaster*

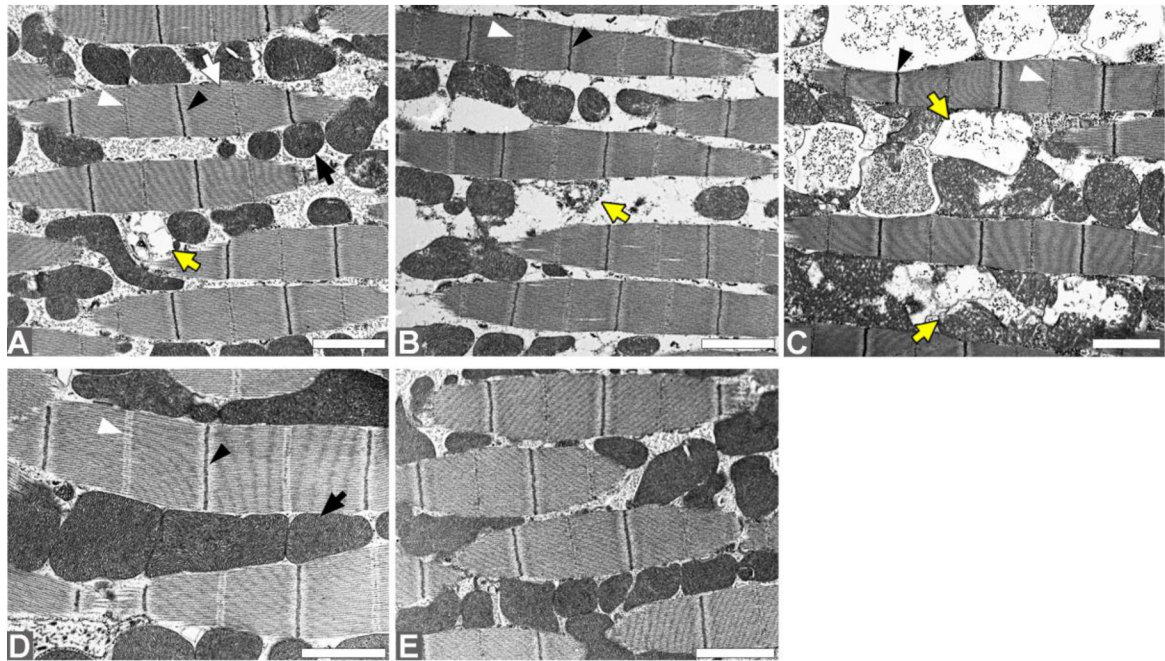
V předchozí studii (Podlahová 2019) byly po 1 h *in vitro* působení jedu lumčíka *H. hebetor* na svalovou tkáň thoraxu *D. melanogaster* w¹¹¹⁸ zaznamenány změny v její ultrastruktuře. Pro vyloučení možnosti, že tyto změny byly vyvolány složkami inkubačních roztoků nebo degradací tkáně v průběhu ošetření, byla snaha o provedení přirozené paralýzy larev octomilky jedem lumčíka. Nejedná se však o přirozeného hostitele, a tak i přes několik pokusů se octomilky lumčíkem paralyzovat nepodařilo. Proto bylo přistoupeno na *in vivo* aplikaci jedového extraktu injekcí do hemolymfy dospělců. Aby se vyloučil nežádoucí efekt roztoků nutných pro naředění extrahovaného jedu a pro fixaci tkání na ultrastrukturu svalů, byly testovány účinky těchto činidel.

4.1.1 Testování médií pro ředění jedu a fixačních činidel

Nejprve byl testován účinek samotných médií sloužících k naředění jedu. Do thoraxu dospělců *D. melanogaster* w¹¹¹⁸ bylo *in vivo* injikováno 50 nl Ringerova roztoku nebo draselného pufru. Po 1 h působení těchto látek byla tkáň zpracována pro potřeby TEM. Jako kontrola byl použit thorax bez jakéhokoli ošetření. Srovnáním ultrastruktury kontrolní a ošetřené tkáně (Obr. 5) se ukázalo, že tkáň ošetřené jak Ringerovým roztokem, tak draselným pufrem nesou vůči kontrole známky poškození. Konkrétně ovlivňují strukturu mitochondrií tak, že dochází k rozvolnění matrix a mitochondrie se jeví jako vakuolizované. Ringerův roztok ve srovnání s draselným pufrem má mírnější degradační efekt, proto byl využíván pro další experimenty.

Vzhledem k tomu, že i v kontrolní neošetřené tkáni (Obr. 5A) se náhodně objevovaly poškozené mitochondrie, byl dosud užívaný fixační roztok glutaraldehyd (GA) nahrazen účinnější fixační směsí GA s paraformaldehydem (GA+PA). Kontrolní tkáň po fixaci GA+PA nevykazovala žádný výskyt vakuolizovaných mitochondrií. Stejně tak i v tkáni ošetřené Ringerovým roztokem a fixované GA+PA nebyly pozorovány žádné změny v mitochondriích.

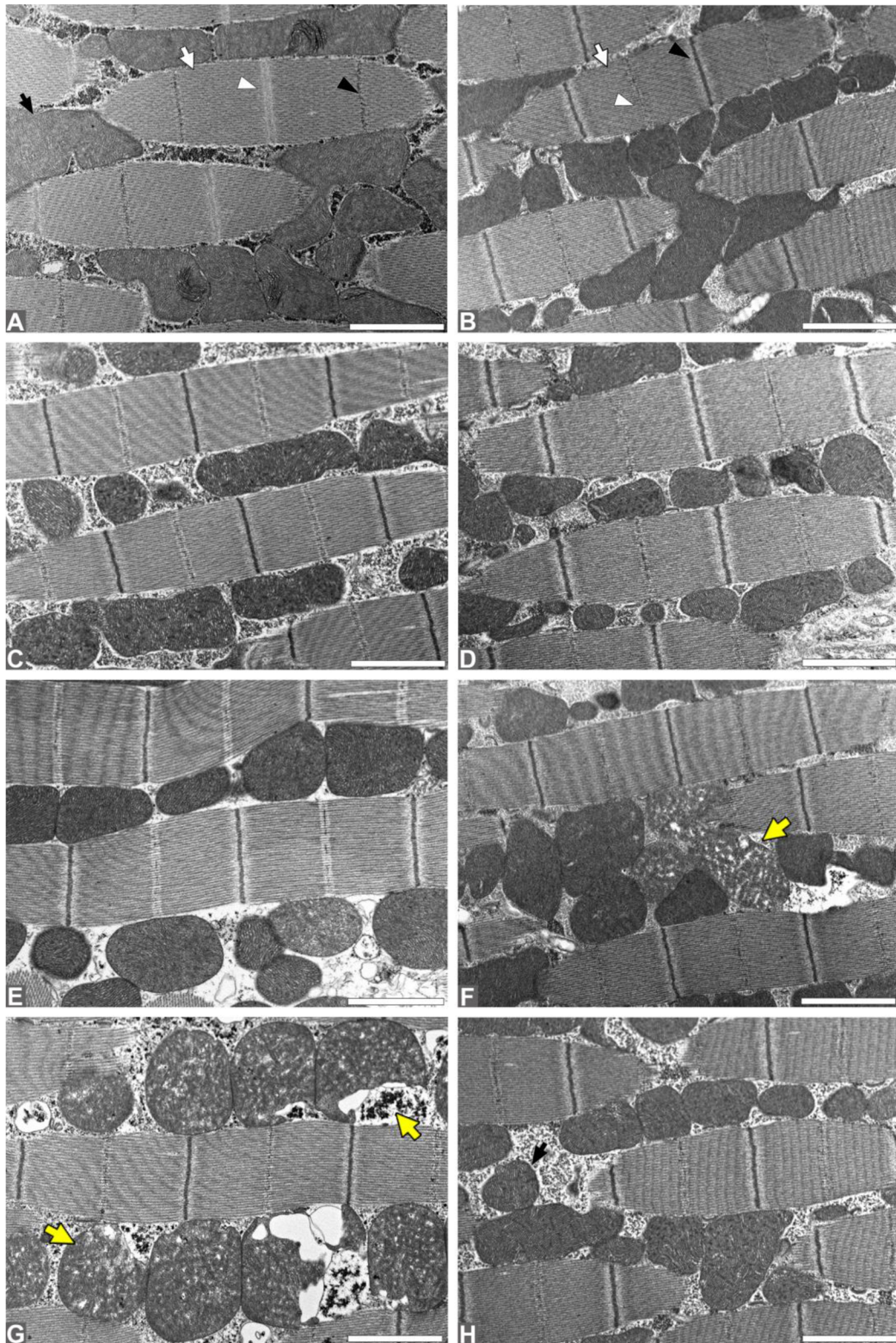
Z výsledků vyplývá, že ošetření tkáně některými médii vede k tvorbě artefaktů na úrovni ultrastruktury svalové tkáně. Nejšetrnější způsob ošetření tkáně ředění jedu v Ringerově roztoku a následná fixace GA+PA.



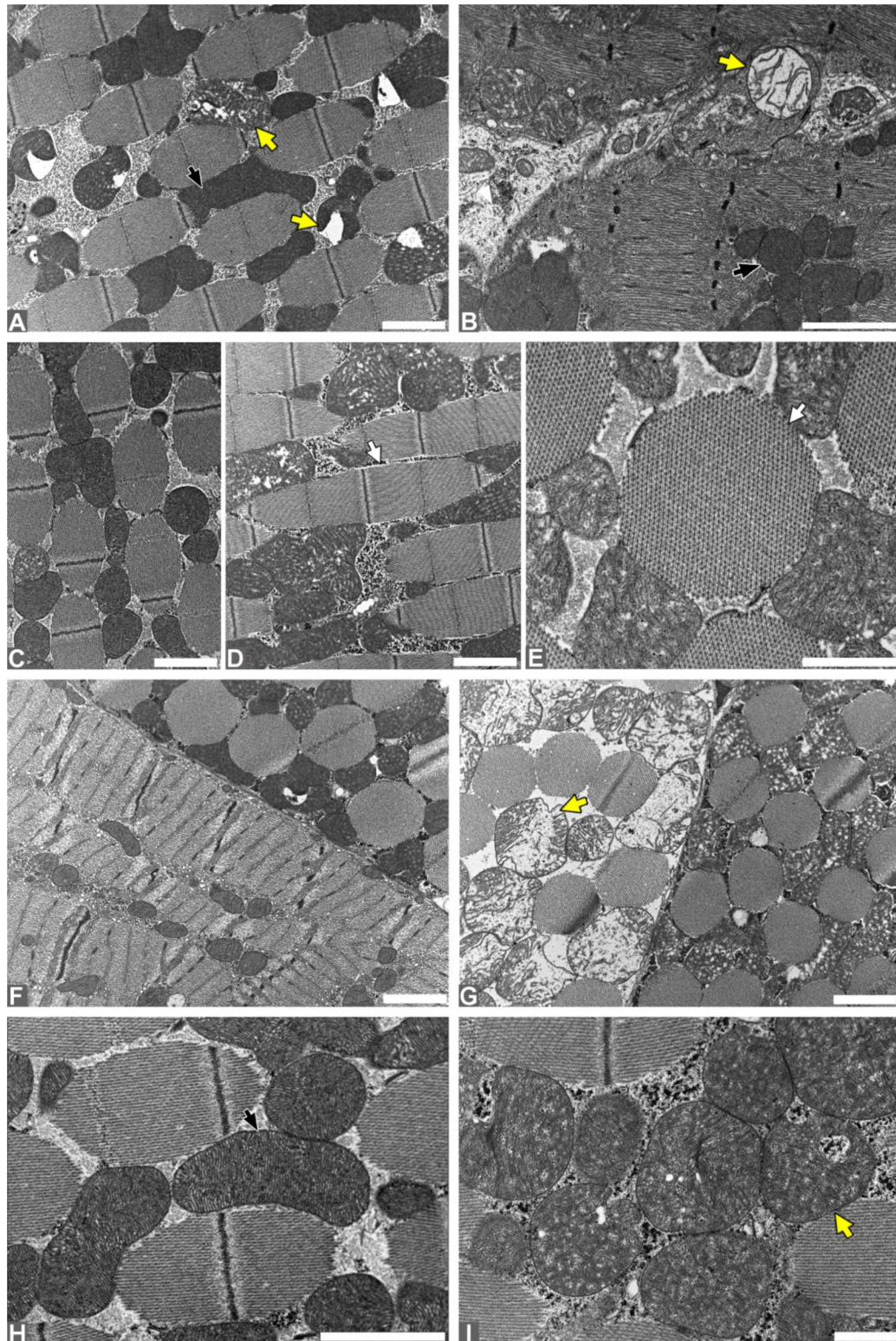
Obr. 5: Ultrastruktura thorakálních svalů *D. melanogaster* w¹¹¹⁸ po ošetření různými médii a při různé fixaci. (A–C) Vzorky fixované GA: bez ošetření (A), po ošetření Ringerovým roztokem (B) a po ošetření draselným pufrem (C). (D, E) Vzorky fixované směsí GA+PA: bez ošetření (D), po ošetření Ringerovým roztokem (E). *bílá šipka* – myofibrily; *černá šipka* – mitochondrie; *bílá hlava šipky* – M-linie myofibril; *černá hlava šipky* – Z-linie; *žlutá šipka* – vakuolizované mitochondrie; měřítko 2 μ m

4.1.2 Injikace vosičkového jedu do thoraxu *D. melanogaster*

Do thoraxu dospělců *D. melanogaster* bylo aplikováno 50 nl extraktu vosičkového jedu *in vivo* v koncentraci 1 jedová žláza (gl)/10 μ l Ringerova roztoku. U všech jedem injikovaných jedinců byla pozorována paralýza do 1 h po injikaci a vzorky byly sbírány 1 h, 2 h a 5 h po aplikaci jedu a fixovány směsí GA+PA. U kontrolních jedinců injikovaných Ringerovým roztokem k paralýze nedošlo. Analýza ultrastruktury svalové tkáně z odpovídajících oblastí thoraxu u všech testovaných skupin neodhalila výrazné strukturální změny ve srovnání s kontrolními vzorky. Myofibrily měly ve všech vzorcích identickou strukturu, lze u nich zřetelně rozlišit Z-linie oddělující sarkomery a M-linie ležící ve středu myozinových vláken (Obr. 6). Stavba některých mitochondrií ve vzorcích sebraných po 5 h od injikace jedu vykazovala změny vůči kontrole. Mitochondrie byly buď vakuolizované, nebo u nich došlo ke značné degradaci vnitřní struktury (bílé díry na Obr. 6G, Obr. 7). Avšak tyto změny v mitochondriích nebyly zaznamenány ani po 1, ani po 2 h od ošetření jedem (Obr. 6C, 6E) a naopak byly ojediněle pozorovány v kontrolním vzorku po 2 h od ošetření Ringerovým roztokem (Obr. 6F).



Obr. 6: Působení jedu *H. hebetor* na ultrastrukturu thorakálních svalů *D. melanogaster* w¹¹⁸. Snímky zachycují myofibrily a mitochondrie v thorakální tkáni u skupin: (A) neošetřená kontrola; (B) kontrola po 10 min působení Ringerova roztoku; (C) po 1 h působení jedu, (D) po 1 h působení Ringer. roztoku; (E) po 2 h působení jedu, (F) po 2 h působení Ringer. roztoku; (G) po 5 h působení jedu, (H) po 5 h působení Ringer. roztoku. *bílá šipka* – myofibrily; *černá šipka* – mitochondrie; *bílá hlava šipky* – M-linie myofibril; *černá hlava šipky* – Z-linie; *žlutá šipka* – různé stupně poškození mitochondrií; měřítko 2 μm

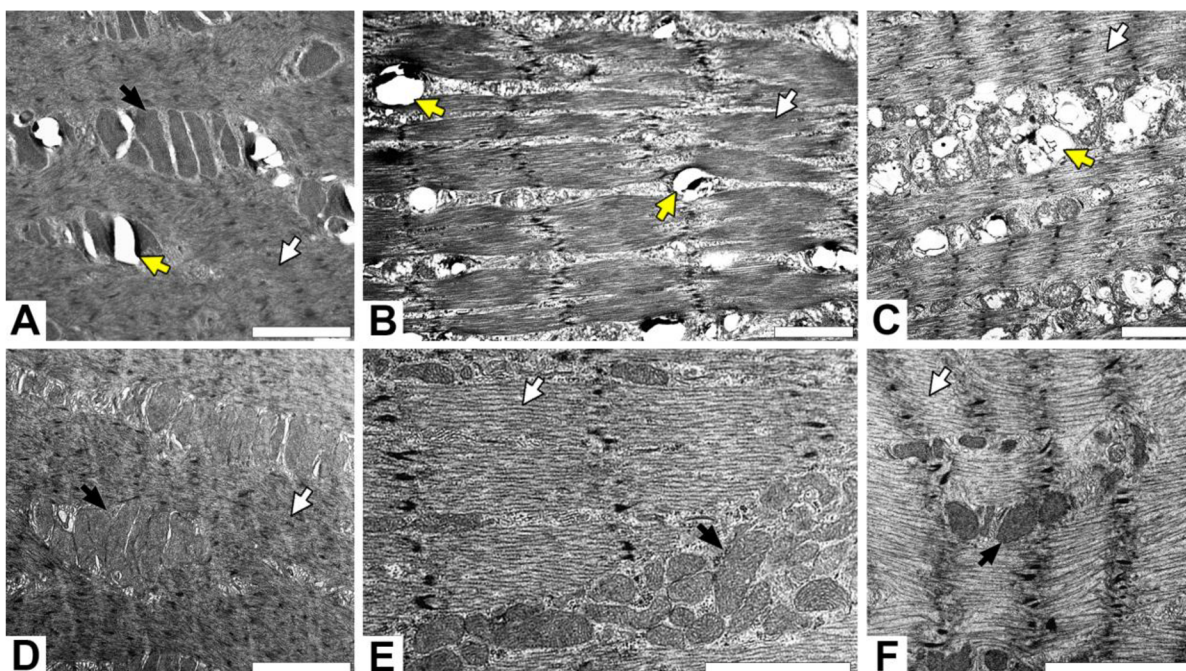


Obr. 7: Změny v ultrastruktuře mitochondrií v thorakální svalovině *D. melanogaster* w¹¹¹⁸ po 5 h působení jedu *H. hebetor*. (A–I) Snímky zachycují mitochondrie v různých svalových skupinách thoraxu. Kromě mitochondrií s typickou strukturou (černá šipka) bylo pozorováno velké množství mitochondrií s různým stupněm poškození vnitřní struktury (žlutá šipka), a to od mírné vakuolizace až po mitochondrie s výraznou degradací vnitřní matrix. (E) Příčný řez myofibrilou; (F, G) rozhraní dvou svalových skupin. bílá šipka – myofibrily; měřítko 2 μm (A, B, C, D, F, G, H), 1 μm (E, I)

4.2 Účinek jedu lumčika *H. hebetor* na svalovou tkáň thorakálních segmentů larvy *E. kuehniella*

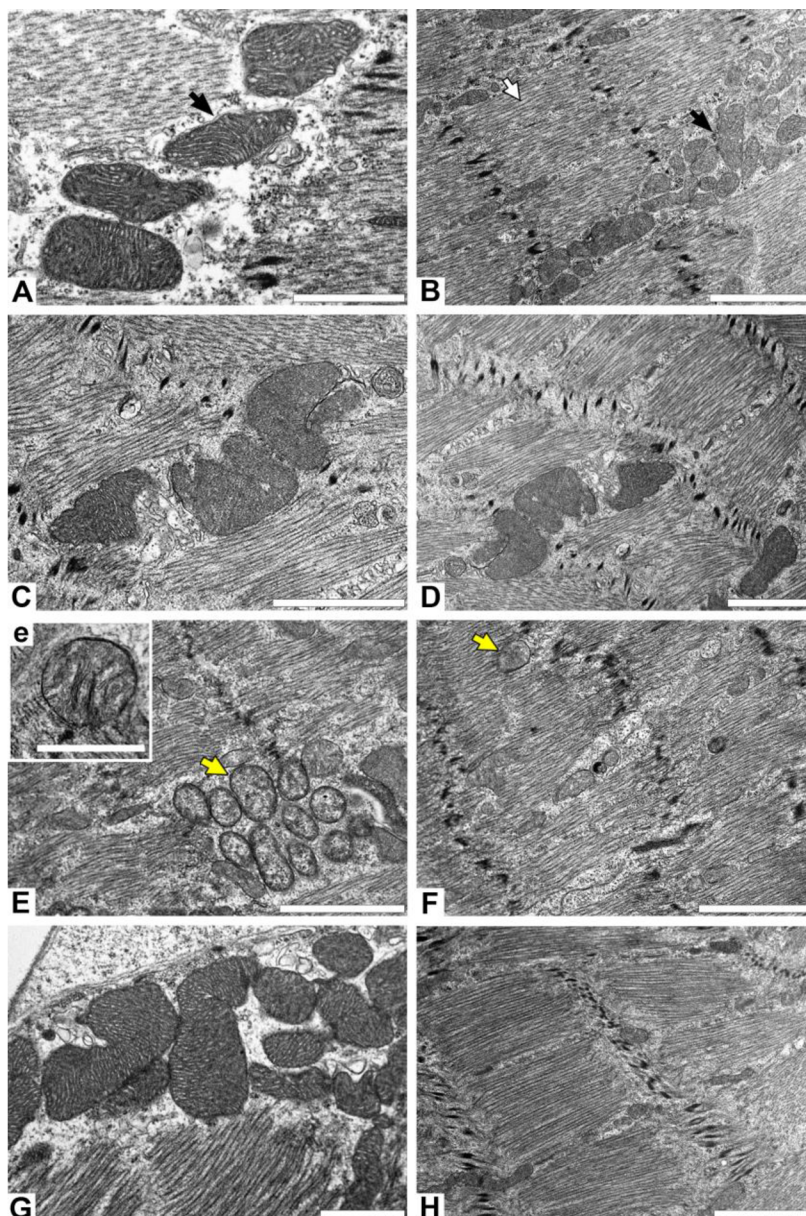
Dále bylo studováno, zda je průběh přirozené paralýzy hostitele lumčika, kterými jsou larvy zavíječe moučného *E. kuehniella*, obdobný jako po umělé aplikaci jedu u *D. melanogaster*. Podobně jako u octomilky bylo nejprve nutno zvolit vhodný způsob fixace. Jako účinnější pro zachování ultrastruktury svalové tkáně se ukázala fixace směsí GA+PA.

Rozdíl mezi použitím obou fixází je u *E. kuehniella* více patrný než u *D. melanogaster* vzhledem k větší velikosti zkoumaných vzorků. GA pronikal do tkání obtížněji, proto byly vzorky ze zavíječe nedofixovány. Již během krájení na ultramiktrotomu byly na řezech patrné trhliny a prázdná místa po vypadané tkáni. Ultrastruktura tkáně je též výrazně porušena, dochází zvláště k silnému poškození mitochondrií (Obr. 8A–C). Oproti tomu při použití směsí GA+PA je typická stavba myofibril i mitochondrií zachována (Obr. 8D–F). Stavba myofibril u larev zavíječe je obecně méně diferencovaná v porovnání s letovými svaly octomilky.



Obr. 8: Ultrastruktura svalové tkáně larvy *E. kuehniella* při použití rozdílných fixází. (A–C) Snímky tkáně fixované GA. (D–F) Snímky tkáně fixované GA+PA. *bílá šipka* – myofibrily; *černá šipka* – mitochondrie; *žlutá šipka* – poškozené mitochondrie; měřítko 2 μm

Thorakální segmenty přirozeně paralyzovaných larev *E. kuehniella* vosičkou *H. hebetor* byly zpracovány po 1 h, 5 h a 24 h od nabodnutí vosičkou a fixovány ve směsi GA+PA a byly podrobeny TEM analýze (Obr. 9). Z neparalyzovaných larev byla odebrána kontrolní tkáň. Struktura svalové tkáně paralyzovaných a kontrolních larev ve všech skupinách nevykazovala výrazné změny. Lišila se pouze přítomností atypických forem mitochondrií ve vzorcích odebraných 5 h od nabodnutí (Obr. 9E, 9F), což odpovídá 5 h od nástupu paralýzy (u larev *E. kuehniella* nastala paralýza do 1 min od nabodnutí *H. hebetor*).



Obr. 9: Ultrastruktura svalové tkáně larvy *E. kuehniella* po přirozené paralýze *H. hebetor*. Snímky zachycují myofibrily a mitochondrie ve svalové tkáni: (A, B) neparalyzovaných larev; (C, D) larev po 1 h paralýzy; (E, e, F) larev po 5 h paralýzy; (G, H) larev po 24 h paralýzy. Levý sloupec zachycuje detailní pohled na mitochondrie. bílá šipka – myofibrily; černá šipka – mitochondrie; žlutá šipka – atypické mitochondrie; měřítko 1 μm (A, e, G), 2 μm (B, C, D, E, F, H)

4.3 Role glutamátových receptorů při působení jedu *H. hebetor*

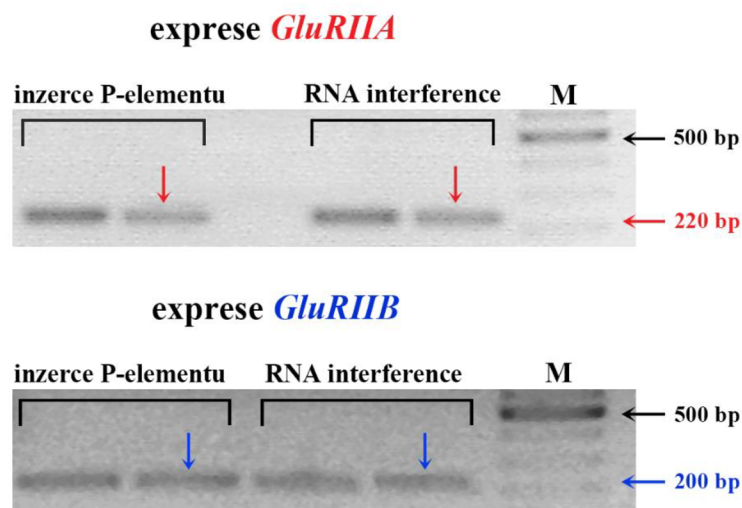
Vzhledem k tomu, že přirozená paralýza ani umělá injekce vosičkového jedu nevyvolává žádné okamžité změny na úrovni ultrastruktury, byl záměr studovat paralýzu z hlediska přenosu nervového vzruchu na nervosvalové ploténce (NMJ) pomocí regulace funkce glutamátových receptorů (GluR) genetickými manipulacemi. Vzhledem k tomu, že nejvýznamnější funkční podjednotky GluR – GluRIIA a GluRIIB se navzájem kompenzují (Marrus et al. 2004) a linie s nulovou mutací v obou podjednotkách není životaschopná, bylo cílem získat linii s částečnou downregulací v obou těchto podjednotkách. Za tímto účelem byly v databázi FlyBase vyhledány a otestovány kandidátní linie *D. melanogaster*, které mohou vykazovat změnu v expresi genů *GluRIIA* a *GluRIIB* a posloužit k přípravě dvojitého mutanta. U tohoto mutanta se předpokládá zpoždění nástupu paralýzy oproti kontrolním jedincům.

4.3.1 Identifikace linií *D. melanogaster* s mutací v *GluRIIA* a *GluRIIB*

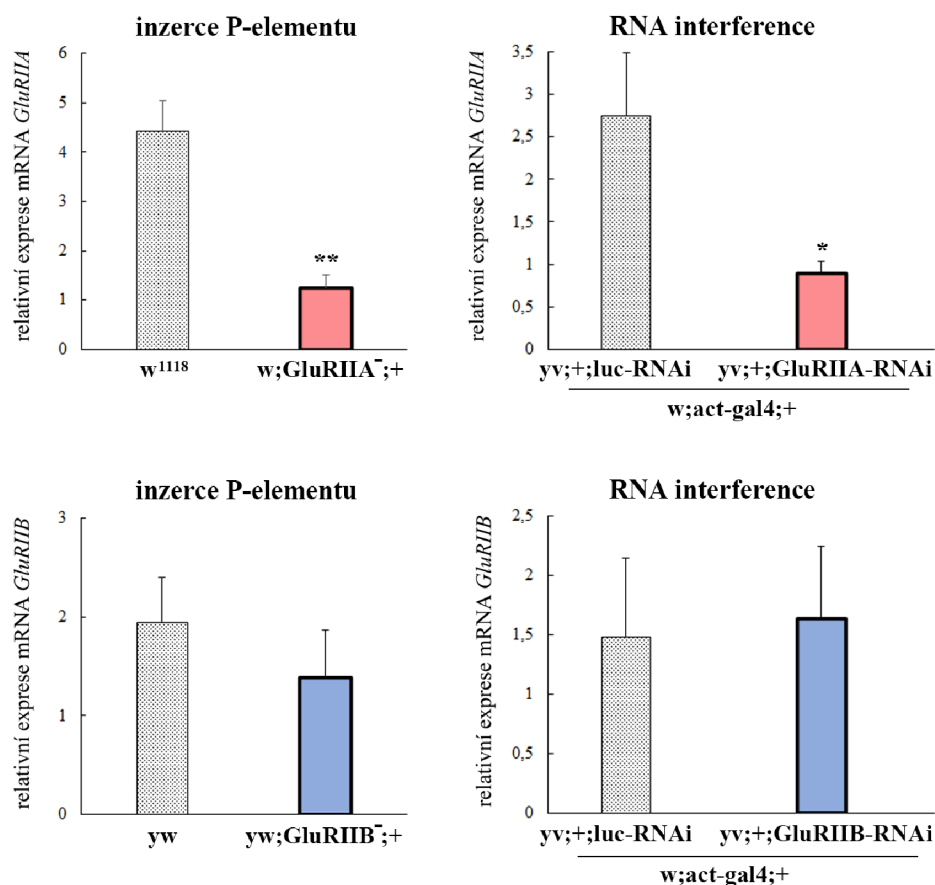
Ke každému typu glutamátového receptoru (*GluRIIA* a *GluRIIB*) byly k dispozici linie s inzercí P-elementu a RNA interferencí (viz 3.1 Laboratorní zvířata). K aktivaci RNA interference ve všech buňkách exprimujících aktin byla použita driverová linie *w;act-gal4/CyO,GFP;+*. Účinek genetických manipulací na expresi *GluRIIA* a *GluRIIB* u F1 samců s RNA interferencí (*yv;act-gal4/+;GluRIIA-RNAi/+* a *yv;act-gal4/+;GluRIIB-RNAi/+*) a u samců s inzercí P-elementu (*w;GluRIIA⁻;+* a *yw;GluRIIB⁻;+*) byl testován pomocí RT-PCR a qRT-PCR. V každé PCR reakci byla použita kontrolní cDNA získaná z linií *D. melanogaster*, které odpovídaly genetickému pozadí použitých linií.

Gelová elektroforéza RT-PCR produktů ověřila účinnost navržených primerů a ukázala možnou downregulaci v případě inserce P-elementu a RNAi genu *GluRIIA*. Množství RT-PCR produktů u linií s inzercí P-elementu v *GluRIIB* a RNAi *GluRIIB* nevykazovalo signifikantní rozdíly od množství produktů získaných z kontrolních linií (Obr. 10).

Pro ověření výsledků získaných z RT-PCR bylo provedeno detailní stanovení relativní míry exprese mRNA *GluRIIA* a *GluRIIB* pomocí qRT-PCR (Obr. 11). Průměrné hladiny mRNA ze třech biologických replikátů ve třech opakováních byly normalizovány k referenčnímu genu *rp49*. qRT-PCR potvrdila downregulaci *GluRIIA* u linie s inzercí P-elementu a u RNAi linie, a naopak vyvrátila downregulaci *GluRIIB* u RNAi linie.



Obr. 10: Gelová elektroforéza produktů RT-PCR. PCR produkty testovaných linií *GluRIIA* zleva: w^{1118} , $w;GluRIIA^{-};+$, $yv;act-gal4/+;luc-RNAi/+$, $yv;act-gal4/+;GluRIIA-RNAi/+$. PCR produkty testovaných linií *GluRIIB* zleva: yw , $yw;GluRIIB^{-};+$, $yv;act-gal4/+;luc-RNAi/+$, $yv;act-gal4/+;GluRIIB-RNAi/+$. barevná šipka – produkt testované linie, *M*; marker



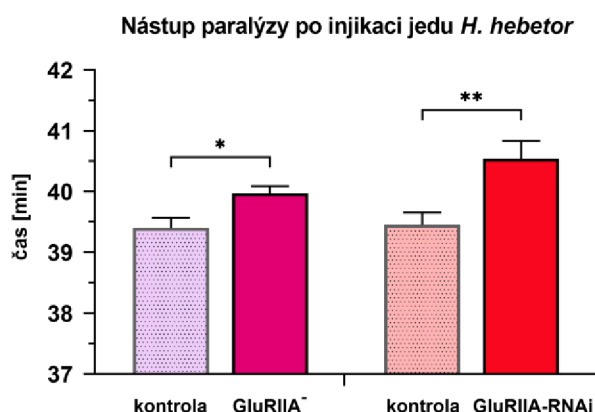
Obr. 11: Grafické znázornění relativní exprese mRNA *GluRIIA* a *GluRIIB* u příslušných linií. Hladiny mRNA byly normalizovány k referenčnímu genu *rp49* a jsou znázorněny sloupcovými grafy s vyznačenou hodnotou SD. Statisticky významné rozdíly byly vyhodnoceny dvouvýběrovým t-testem, na obrázku označeny * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3.2 Měření nástupu paralýzy u linií s downregulací exprese *GluRIIA*

Přestože se nepodařilo připravit dvojitého mutantu v obou hlavních podjednotkách GluR, byl měřen nástup paralýzy alespoň u linií s downregulací podjednotky GluRIIA. Vzhledem ke kompenzaci podjednotky GluRIIA podjednotkou GluRIIB se však nepředpokládalo výrazné zpoždění nástupu paralýzy.

Linie $w;GluRIIA^{-};+$ a $yv;act-gal4/+;GluRIIA-RNAi/+$, u kterých qRT-PCR odhalila změny v expresi genů pro GluR, byly podrobeny měření nástupu paralýzy od injekce jedu *H. hebetor*. Jed byl aplikován vždy do 10 samců v množství 50 nl a koncentrací 1 μ g/10 μ l Ringerova roztoku spolu s barvou „Erioglaurine Disodim Salt“ pro ověření úspěšné injekce. Pokusní jedinci byli nepřetržitě sledováni a čas nástupu celkové paralýzy byl zaznamenán s přesností na minuty. Mouchy se po anestezii a nabodnutí probraly do 2 min a první známky paralýzy se začaly objevovat po 35–40 minutách. Jedinci leželi a po otočení vodorovně položené vialky se nadrželi na stěně, ale padali na dno, nebo ještě stáli, ale nebyli schopni pohybu. Další pozorování ukázala, že po 100 min od paralýzy jedinci ještě jeví známky života (záškuby nohou). Poté již nebyl zaznamenán další pohyb. Mouchy byly sledované 48 h.

Zaznamenané časy nástupu celkové paralýzy byly statisticky vyhodnoceny a data jsou graficky znázorněna na obrázku (Obr. 12). U jedinců $w;GluRIIA^{-};+$ a $yv;ac-gal4/+;GluRIIA-RNAi/+$ nástup paralýzy vykazoval mírné, avšak statisticky významné zpoždění (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).



Obr. 12: Čas nástupu paralýzy u linií s downregulací *GluRIIA*. Sloupcové grafy znázorňují časy nástupu paralýzy u linií zleva: w^{1118} , $w;GluRIIA^{-};+$, $yv;act-gal4/+;luc-RNAi/+$ a $yv;act-gal4/+;GluRIIA-RNAi/+$. Statisticky významné rozdíly vyhodnoceny dvouvýběrovým t-testem jsou v grafu znázorněny podle hladiny průkaznosti: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, (průměr +SD, $n = 10$).

5 Diskuze

Předkládaná práce prokazuje vliv inkubačních roztoků a fixačních činidel na vznik artefaktů v ultrastruktuře svalové tkáně hmyzu. Pro případnou inkubaci je nejšetrnějším médiem Ringerův roztok, který je rovněž vhodný pro ředění látek určených k aplikaci *in vivo*. Nejvhodnějším primárním fixačním médiem je směs GA+PA, neboli Karnovského fixace (Nebesářová 2001). Zatímco základní GA fixace proniká do hloubky tkáně pomalu, PA díky tomu, že obsahuje jen jednu aldehydickou skupinu, penetruje do tkáně rychleji (Nebesářová 2001). Rychlý způsob fixace je nezbytný zejména pro zachování ultrastruktury mitochondrií, které jsou velice citlivé na osmotické změny (Walker et al. 2006). Při odebrání větších kusů tkáně se osvědčila injekce fixáže přímo do živého organismu, kdy hemolymfa zajistila rychlý průnik fixační látky do celého těla. Kombinace ředění vosičkového jedu v Ringerově roztoku s GA+PA fixací a zároveň přechod na aplikaci jedu *in vivo* výrazně eliminovaly vznik artefaktů. Zvolené *in vitro* podmínky v předchozí studii (Podlahová 2019) účinku jedu na svalovou tkáň *D. melanogaster* vedly ke špatné interpretaci výsledků.

Ve světle nových poznatků nebyly zaznamenány žádné degradační účinky jedu na svalovou tkáň ani u *D. melanogaster*, ani u přirozeně paralyzovaného hostitele *E. kuehniella*, přestože byli jedinci evidentně paralyzováni. Po nástupu paralýzy nebyla u obou organismů pozorována změna ani ve stavbě myofibril, ani ve struktuře mitochondrií. Změny ve struktuře některých mitochondrií byly pozorovány až po 5 h působení jedu, náhodně i v kontrolní tkáni, tudíž se nejednalo o přímý účinek vosičkového jedu, ale zřejmě o projev hypoxie jako sekundárního efektu paralýzy. Podobné účinky na stavbu mitochondrie v podobě vakuolizace byly sledovány jako projev hyperoxie (Walker et al. 2006, Holmbeck et al. 2015). Oproti vakuolizovaným mitochondriím, přirozená stavba mitochondrií nevykazuje rozvolnění, kristy jsou zde uspořádány v těsné blízkosti (Macchi 2013, Trevisan et al. 2018)

Zatímco dospělci *D. melanogaster* nejeví známky života po 5 h od nástupu paralýzy, tak přirozeně paralyzované larvy *E. kuehniella* přežívají po dobu nezbytnou pro vývoj parazitoidních larev. Pravděpodobně je dávka jedu optimalizovaná natolik, že většinou neohrozí přežití hostitelské larvy po dobu parazitismu. Působení jedu zde snižuje imunitní odpověď a zachovává činnost srdce a střeva (Beard 1952). Přizpůsobení se napadení larvy na nový způsob života zřejmě vysvětluje absenci vakuolizovaných mitochondrií ve vzorcích odebraných 24 h od aplikace jedu, kdy pravděpodobně k hypoxii nedochází.

Pokus adaptace vosičky na nový druh hostitele, larvy *D. melanogaster*, se nezdařil zřejmě proto, že larva octomilky je morfologicky (hlavně velikostí) velmi vzdálená od přirozených hostitelů. Larva *D. melanogaster* je pro vosičku neatraktivní, jelikož ta pro vývoj svých parazitických potomků potřebuje zajistit dostatečnou zásobu potravy, na kterou jsou uzpůsobené trávicí enzymy parazitoida. Na tuto skutečnost poukázala studie ukazující preferenci *H. hebetor* k larvám *E. kuehniella* a *Helicoverpa armigera* (Borzoui et al. 2016). Metoda injikace do thoraxu dospělce *D. melanogaster* se jen částečně blíží přirozeným podmínkám, jednak je použita anestezie a dále se píchá jedový extrakt obsahující i proteiny jedové žlázy a pravděpodobně množství jedu neodpovídá přirozené paralýze. Nicméně zachování ultrastruktury svalových vláken po působení jedu bylo ověřeno na přirozeném hostiteli.

Studium ultrastruktury neodhalilo žádný účinek jedu *H. hebetor*, proto je pravděpodobné, že jed působí pouze na nervosvalové úrovni, podobně jak bylo prokázáno u jiných ektoparazitoidních vosiček (Eldefrawi et al. 1988, Ferber et al. 2001, Moore et al. 2006). Působení jedu *H. hebetor* přes GluR se zatím nepodařilo prokázat, vzhledem k tomu, že nemohla být připravena mutantní linie *D. melanogaster* v obou funkčních podjednotkách GluRIIA a GluRIIB. Downregulace jedné z podjednotek GluR (GluRIIA) způsobila cca třiminutové zpoždění v nástupu paralýzy, což je vzhledem k obvyklému nástupu paralýzy kolem čtyřiceti minut po aplikaci jedu velmi mírná prodleva. Nicméně tento výsledek odpovídá skutečnosti, že funkce GluRIIA je kompenzována funkční podjednotkou GluRIIB (Marrus et al. 2004). Do budoucna bude nutno získat mutanty s částečnou downregulací v podjednotce GluRIIC popřípadě podjednotce GluRIID, jelikož mutanti s úplnou delecí v těchto podjednotkách nepřežívají, a provést u nich měření nástupu paralýzy.

6 Závěr

Přestože jed lumčíka *H. hebetor* působí velmi účinnou paralýzu přirozeného hostitele, popřípadě modelového organismu, neovlivňuje ultrastrukturu thorakální svalové tkáně. Jed zřejmě působí již na úrovni přenosu signálu na nervosvalové ploténce. Tato skutečnost se zatím nepodařila prokázat vzhledem k absenci vhodné mutantní linie. Zpoždění nástupu paralýzy u mutantů s částečnou downregulací v jedné z podjednotek GluR je k prokázání působení jedu přes tyto receptory nedostatečné. Práce dále optimalizuje podmínky zpracování hmyzí svalové tkáně pro transmisní elektronovou mikroskopii tak, aby ultratenké řezy kvalitně odrážely přirozený stav tkáně a neobsahovaly zavádějící artefakty. Osvědčila se Karnovského fixace kombinující GA s PA a u větších vzorků i prodloužení časů působení chemikálií při převádění vzorků do pryskyřice.

7 Seznam použitých zkratek

AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionová kyselina
DEPC	diethylpyrokarbonát
GA	glutaraldehyd
PA	paraformaldehyd
gl	jedová žláza (gland)
GluR	glutamátový receptor
GluRIIA	glutamátový receptor typu II A
GluRIIB	glutamátový receptor typu II B
GluRIIC/D/E	glutamátový receptor typu II C/D/E
iGluR	ionotropní glutamátový receptor
NMDA	<i>N</i> -methyl-D-aspartát
PBS	pufrovaný fosfátový roztok
PT	pokožková teplota
qRT-PCR	kvantitativní reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
RT	reverzní transkripce
RT-PCR	reverzně transkripční polymerázová řetězová reakce
SD	směrodatná odchylka
TEM	transmisní elektronová mikroskopie

8 Seznam použité literatury

BEARD, Raimon L. The toxicology of *Habrobracon* venom: A study of a natural insecticide. *Bulletin*. The Connecticut Agricultural Experiment Station, 1952, **562**, 1-27.

BECKAGE, Nancy E. a Dale B. GELMAN. Wasp Parasitoid Disruption Of Host Development: Implications for New Biologically Based Strategies for Insect Control. *Annual Review of Entomology*. 2004, **49**(1), 299-330. ISSN 0066-4170. DOI: 10.1146/annurev.ento.49.061802.123324.

BORZOU, Ehsan, Bahram NASERI a Mozghan MOHAMMADZADEH-BIDARANI. Adaptation of *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae) to Rearing on *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) and *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Science*. 2016, **16**(1), 12, 1536-2442. DOI: 10.1093/jisesa/fiew001.

COLLINS, Catherine A a Aaron DIANTONIO. Synaptic development: Insights from *Drosophila*. *Current Opinion in Neurobiology*. 2007, **17**(1), 35-42. ISSN 09594388. DOI: 10.1016/j.conb.2007.01.001.

DIANTONIO, Aaron, Sophie A. PETERSEN, Manfred HECKMANN a Corey S. GOODMAN. Glutamate Receptor Expression Regulates Quantal Size and Quantal Content at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *The Journal of Neuroscience*. 1999, **19**(8), 3023-3032. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-08-03023.1999.

DOWTON, M a Andrew D. AUSTIN. Molecular phylogeny of the insect order Hymenoptera: Apocritan relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994, **91**(21), 9911-5. DOI: 10.1073/pnas.91.21.9911.

DOWTON, M. a Andrew D. AUSTIN. Phylogenetic Relationships among the Microgastroid Wasps (Hymenoptera: Braconidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 1998, **10**(3), 354-366. ISSN 10557903. DOI: 10.1006/mpev.1998.0533.

ELDEFRAWI, A. T., M. E. ELDEFRAWI, K. KONNO, N. A. MANSOUR, K. NAKANISHI, E. OLTZ a P. N. USHERWOOD. Structure and synthesis of a potent glutamate receptor antagonist in wasp venom. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1988, **85**(13), 4910-4913. ISSN 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.85.13.4910.

FEATHERSTONE, David E., Emma RUSHTON, Jeffrey ROHRBOUGH, Faith LIEBL, Julie KARR, Qi SHENG, Christopher K. RODESCH, Kendal BROADIE. An Essential *Drosophila* Glutamate Receptor Subunit That Functions in Both Central Neuropil and Neuromuscular Junction. *Journal of Neuroscience*. 2005, **25**(12), 3199-3208. ISSN 0270-6474. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4201-04.2005.

FERBER, Michael, Michael HÖRNER, Sabine CEPOK a Werner GNATZY. Digger wasp versus cricket: Mechanisms underlying the total paralysis caused by the predator's venom. *Journal of Neurobiology*. 2001, **47**(3), 207-222. ISSN 00223034. DOI: 10.1002/neu.1028.

HAGHIGHI, A.Pejmun, Brian D. MCCABE, Richard D. FETTER, Jessica E. PALMER, Sabrina HOM a Corey S. GOODMAN. Retrograde Control of Synaptic Transmission by Postsynaptic CaMKII at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *Neuron*. 2003, 39(2), 255-267. ISSN 08966273. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00427-6.

HOLMBECK, Marissa A., Julia R. DONNER, Eugenia VILLA-CUESTA a David M. RAND. A *Drosophila* model for mito-nuclear diseases generated by an incompatible tRNA-tRNA synthetase interaction. *Disease Models and Mechanisms*. 2015. ISSN 1754-8411. DOI: 10.1242/dmm.019323.

CHANG Hangil, CIANI Sergio, KIDOKORO Yoshiaki. Ion permeation properties of the glutamate receptor channel in cultured embryonic *Drosophila* myotubes. *Journal of Physiology*. 1994, **476**(1), 1-16. PMID 7519261, PMCID PMC1160414.

JAN, L. Y. a Y. N. JAN. L-glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *The Journal of Physiology*. 1976, **262**(1), 215-236. ISSN 00223751. DOI: 10.1113/jphysiol.1976.sp011593.

JOHANSEN, J., M. E. HALPERN, K. M. JOHANSEN a H. KESHISHIAN. Stereotypic morphology of glutamatergic synapses on identified muscle cells of *Drosophila* larvae. *The Journal of Neuroscience*. 1989, **9**(2), 710-725. ISSN 0270-6474. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.09-02-00710.1989.

KRYUKOVA, N. A., I. M. DUBOVSKIY, E. A. CHERTKOVA, Ya. L. VORONTSOVA, I. A. SLEPNEVA a V. V. GLUPOV. The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system, the generation of reactive oxygen

species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology*. 2011, **57**(6), 796-800. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2011.03.008. ISSN 00221910.

LEMAITRE, Bruno a Jules HOFFMANN. The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*. 2007, **25**(1), 697-743. ISSN 0732-0582. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615.

MACCHI, Marc, Najla EL FISSI, R. TUFI, M. BENTOBI, J.-C. LIEVENS, L. M. MARTINS, J. ROYET a T. RIVAL. The *Drosophila* inner-membrane protein PMI controls crista biogenesis and mitochondrial diameter. *Journal of Cell Science*. 2013, **126**(3), 814-824. DOI: 10.1242/jcs.115675. ISSN 0021-9533.

MARRUS, Scott B., Scott L. PORTMAN, Marcus J. ALLEN, Kevin G. MOFFAT a Aaron DIANTONIO. Differential Localization of Glutamate Receptor Subunits at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *Journal of Neuroscience*. 2004, **24**(6), 1406-1415. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1575-03.2004.

MAURYA, Santosh K, Muthu PERIASAMY a Naresh C BAL. High gender - specific susceptibility to curare- a neuromuscular blocking agent. *Biological Research*. 2013, **46**(1), 75-78. ISSN 0716-9760. DOI: 10.4067/S0716-97602013000100011.

MAYS, Tessily A., Jamie L. SANFORD, Toshihiko HANADA, Athar H. CHISHTI a Jill A. RAFAEL-FORTNEY. Glutamate receptors localize postsynaptically at neuromuscular junctions in mice. *Muscle Nerve*. 2009, **39**(3), 343-349. ISSN 0148639X. DOI: 10.1002/mus.21099.

MOORE, Eugene L., Gal HASPEL, Frederic LIBERSAT a Michael E. ADAMS. Parasitoid wasp sting: A cocktail of GABA, taurine, and β -alanine opens chloride channels for central synaptic block and transient paralysis of a cockroach host. *Journal of Neurobiology*. 2006, **66**(8), 811-820. ISSN 0022-3034. DOI: 10.1002/neu.20254.

MOREAU, Sébastien a Sassan ASGARI. Venom Proteins from Parasitoid Wasps and Their Biological Functions. *Toxins*. 2015, **7**(7), 2385-2412. DOI: 10.3390/toxins7072385.

MORIMOTO, T., M. NOBECHI, A. KOMATSU, H. MIYAKAWA a A. NOSE. Subunit-specific and homeostatic regulation of glutamate receptor localization by CaMKII in

Drosophila neuromuscular junctions. *Neuroscience*. 2010, **165**(4), 1284-1292. ISSN 03064522. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.11.059.

NEBESÁŘOVÁ, Jana. Transmisní elektronový mikroskop. *Elektronová mikroskopie pro biology* [online]. 2001 [cit. 2019-08-21]. Dostupné z: <http://triton.paru.cas.cz/old-lem/book/>.

PAUCHOVÁ, Lucie. Využití bioluminiscenčních, histologických a imunohistochemických technik při studiu lokalizace produktů genové exprese v tkáních hmyzu. [Using of bioluminescence, histology and immunohistochemistry in the localization of gene expression products in insect tissues. Bc. Thesis, in Czech]. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice. 2019, 55 p.

PENNACCHIO, Francesco a Michael R. STRAND. Evolution of developmental strategies in parasitic Hymenoptera. *Annual Review of Entomology*. 2006, **51**(1), 233-258. DOI: 10.1146/annurev.ento.51.110104.151029.

PERIQUET, Georges, Yves BIGOT a Géraldine DOURY. Physiological and Biochemical Analysis of Factors in the Female Venom Gland and Larval Salivary Secretions of the Ectoparasitoid Wasp *Eupelmus orientalis*. *Journal of Insect Physiology*. 1997, **43**(1), 69-81. ISSN 00221910. DOI: 10.1016/S0022-1910(96)00053-4.

PIEK, Tom. Neurotoxins from venoms of the hymenoptera—Twenty-five years of research in Amsterdam. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 1990, **96**(2), 223-233. DOI: 10.1016/0742-8413(90)90001-P.

PERKINS, Lizabeth A, Laura HOLDERBAUM, Rong TAO, et al. The Transgenic RNAi Project at Harvard Medical School: Resources and Validation. *Genetics*. 2015, **201**(3), 843-852. DOI: 10.1534/genetics.115.180208.

PETERSEN, Sophie A, Richard D FETTER, Jasprina N NOORDERMEER, Corey S GOODMAN a Aaron DIANTONIO. Genetic Analysis of Glutamate Receptors in *Drosophila* Reveals a Retrograde Signal Regulating Presynaptic Transmitter Release. *Neuron*. 1997, **19**(6), 1237-1248. ISSN 08966273. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80415-8.

PODLAHOVÁ, Šárka. Vliv adipokinetického hormonu na působení jedu z vosičky, *Habrobracon hebetor*, ve svalové tkáni octomilky, *Drosophila melanogaster* [Effect of the venom of *Habrobracon hebetor* on *Ephestia kuehniella* and *Drosophila melanogaster* muscles. Mgr. Thesis, in Czech]. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice. 2019, 40 p.

QIAN, Cen, Yang LIU, Qi FANG, Yan MIN-LI, Shu-Sheng LIU, Gong-Yin YE a Yan-Min LI. Venom of the ectoparasitoid, *Nasonia vitripennis*, influences gene expression in *Musca domestica* hemocytes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 2013, **83**(4), 211-231. ISSN 07394462. DOI: 10.1002/arch.21107.

QIN, Gang, Tobias SCHWARZ, Robert J KITTEL, Andreas SCHMID, Tobias M RASSE, Dennis KAPPEI, Evgeni PONIMASKIN, Manfred HECKMANN a Stephan J SIGRIST. Four Different Subunits Are Essential for Expressing the Synaptic Glutamate Receptor at Neuromuscular Junctions of *Drosophila*. *Journal of Neuroscience*. 2005, **25**(12), 3209-3218. ISSN 0270-6474. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4194-04.2005.

QUISTAD, Gary B., Quyen NGUYEN, Paul BERNASCONI a Douglas J. LEISY. Purification and characterization of insecticidal toxins from venom glands of the parasitic wasp, *Bracon hebetor*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 1994, **24**(10), 955-961. ISSN 09651748. DOI: 10.1016/0965-1748(94)90132-5.

SHAIK, Haq Abdul, Archana MISHRA a Dalibor KODRÍK. Beneficial effect of adipokinetic hormone on neuromuscular paralysis in insect body elicited by braconid wasp venom. *Elsevier*. 2017, **196**, 11-18. ISSN 15320456. DOI: 10.1016/j.cbpc.2017.02.011.

SCHULDINER, Oren, Daniela BERDNIK, Jonathan Ma LEVY, Joy S. WU, David LUGINBUHL, Allison Camille GONTANG a Liqun LUO. PiggyBac-Based Mosaic Screen Identifies a Postmitotic Function for Cohesin in Regulating Developmental Axon Pruning. *Developmental Cell*. 2008, **14**(2), 227-238. ISSN 15345807. DOI: 10.1016/j.devcel.2007.11.001.

SCHUSTER, Christoph M., Andreas ULTSCH, Patrick SCHLOSS, Jane A. COX, Bertram SCHMITT a Heinrich BETZ. Molecular Cloning of an Invertebrate Glutamate Receptor Subunit Expressed in *Drosophila* Muscle. *Science*. 1991, **254**(5028), 112-114. ISSN 0036-8075. DOI: 10.1126/science.1681587.

SLUSS R. Behavioral and anatomical responses of the convergent lady beetle to parasitism by *Perilitus coccinellae* (Schrank) (Hymenoptera: Braconidae) *Journal of Invertebrate Pathology*. 1968, **10**(1), 9-27.

STRAND, M. R., S. B. VINSON, W. C. NETTLES a Z. N. XIE. In vitro culture of the egg parasitoid *Telenomus heliothidis*: the role of teratocytes and medium consumption in development. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 1988, **46**(1), 71-78. ISSN 00138703. DOI: 10.1111/j.1570-7458.1988.tb02269.x.

THIBAUT, Stephen T., Matthew A. SINGER, Wesley Y. MIYAZAKI, et al. A complementary transposon tool kit for *Drosophila melanogaster* using P and piggyBac. *Nature Genetics*. 2004, **36**(3), 283-287. ISSN 1061-4036. DOI: 10.1038/ng1314.

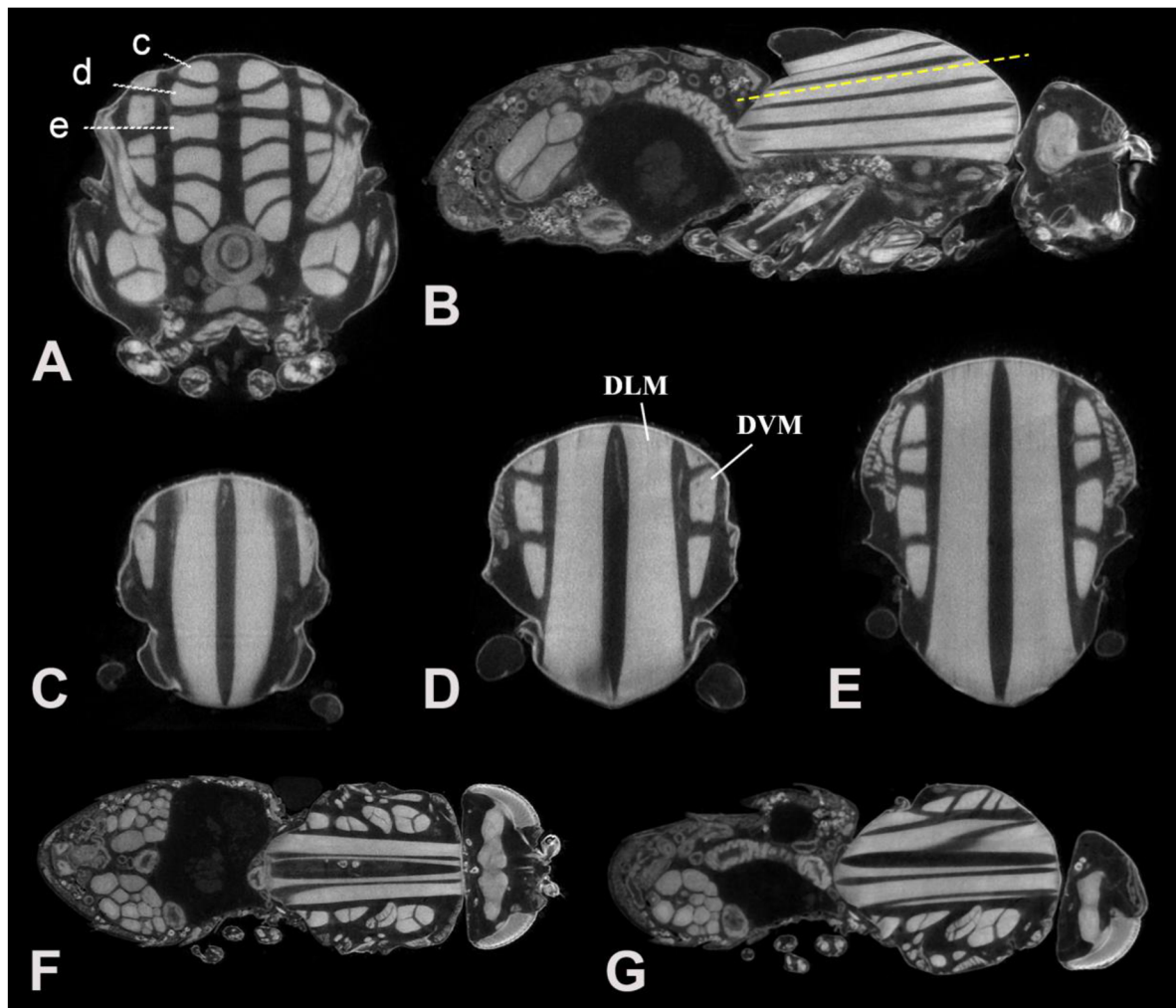
TREVISAN, Tatiana, Diana PENDIN, Aldo MONTAGNA, Sergio BOVA, Anna Maria GHELLI a Andrea DAGA. Manipulation of Mitochondria Dynamics Reveals Separate Roles for Form and Function in Mitochondria Distribution. *Cell Reports*. 2018, **23**(6), 1742-1753. ISSN 22111247. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.04.017.

WALKER, David W., Petr HÁJEK, Julien MUFFAT, Dan KNOEPFLE, Stephanie CORNELISON, Giuseppe ATTARDI a Seymour BENZER. Hypersensitivity to oxygen and shortened lifespan in a *Drosophila* mitochondrial complex II mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, **103**(44), 16382-16387. ISSN 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0607918103.

WALTHER, Christian a Werner RATHMAYER. The effect of *Habrobracon* venom on excitatory neuromuscular transmission in insects. *Journal of Comparative Physiology*. 1974, **89**(1), 23-38. ISSN 0340-7594. DOI: 10.1007/BF00696160.

9 Příloha 1

Uspořádání svalových vláken v thoraxu *D. melanogaster*



Obr. P1: Snímky *D. melanogaster* pořízené pomocí Micro-CT Skyscan 1272, Bruker. (A) příčný řez thoraxem; (B) podélný průřez středem těla octomilky, ideální místo pro pořízení ultratenkých řezů thoraxu ukazuje žlutá přerušovaná čára; (C–E) dorzální pohledy na organizaci svalových skupin označených na snímku A písmeny c, d, e; (F) podélný průřez dorzální částí těla octomilky; (G) podélný průřez laterální částí těla octomilky. DLM; dorzolongitudinální svaly, DVM; dorzoventrální svaly. Bajgar a Krejčová, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích 2022.