

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

2018

Michaela Mochanová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Úloha adipokinetického hormonu
v metabolismu základních živin
u octomilky obecné**
Drosophila melanogaster

Diplomová práce

Michaela Mochanová

Školitel: Prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.

České Budějovice 2018

Mochanová, M., 2018: Úloha adipokinetického hormonu v metabolismu základních živin u octomilky obecné *Drosophila melanogaster* [Role adipokinetic hormone in metabolism of basic nutrients in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Mgr. Thesis, in Czech] Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 62 pp

Annotation

The aim of the thesis was evaluation of various metabolic characteristics in the fruit flies *Drosophila melanogaster* with deficiency of adipokinetic hormone (AKH) production, and with adenosine receptor dysfunction. The experiments were done with a goal to evaluate involvement of AKH and adenosine into control of the metabolic pathways. For that measuring of basic nutrients, level of Drome-AKH, mortality and some others characteristics in the fruit flies during starvation were performed. Results revealed the effect of AKH on metabolism of storage nutrients, however, the role of adenosine was unclear.

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

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

V Českých Budějovicích, 18. 4. 2018

.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Daliboru Kodříkovi za odborné vedení při práci, cenné rady a ochotu. Také bych chtěla poděkovat, Aleši Tomčalovi, který mi pomohl s analýzou lipidů pomocí HPLC – MS a se zpracováním naaměřených dat, Aničce Žaloudkové, Andrejce Bednářové za pomoc při práci. A také bych chtěla poděkovat, Helence Štěrbové za rodinnou atmosféru. A největší dík patří těmto dvěma lidem mému příteli, který to se mnou vše zvládl a celou dobu mě vždy podporoval a věřil mi a také patří obrovské dík mé nejdražší kamarádce Danče Hlávkové, která mi vždy věřila a velmi mi pomáhala. Děkuji i mé rodině, která tu při mně stála a dala mi tuto příležitost.

Práce byla financována projektem České grantové agentury č. 14-07172S (DK)

OBSAH

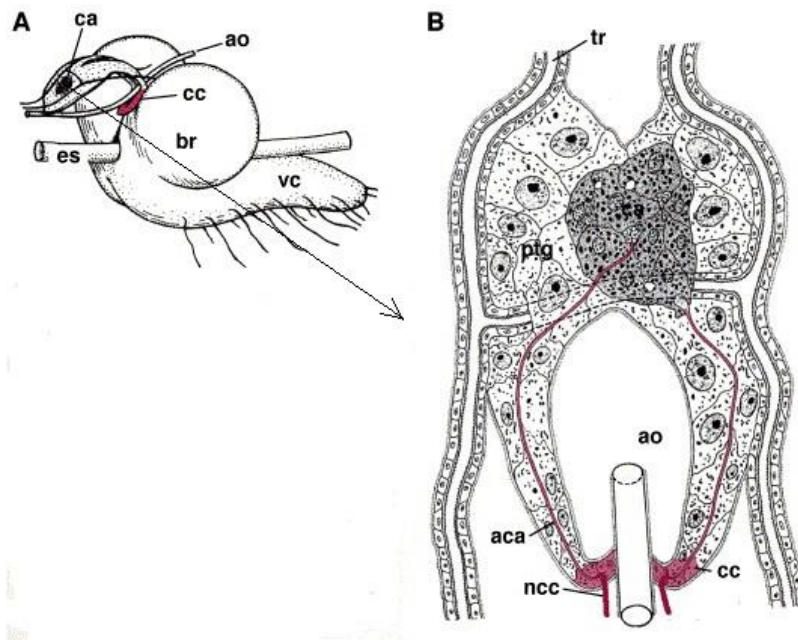
1	ÚVOD	1
1.1	Endokrinní soustava hmyzu	1
1.2	Adipokinetické hormony u hmyzu	2
1.3	Adipokinetický hormon jako „antiobézní“ faktor	5
1.4	Adenosin (Ado)	5
1.5	Adipokinetický hormon vs. adenosin	7
2	Cíle práce.....	9
3	MATERIÁL A METODIKA	10
3.1	Studované linie much octomilky obecné (<i>Drosophila melanogaster</i>) ..	10
3.2	Základní charakteristiky daných skupin much	11
3.2.1	Hmotnost dospělců	11
3.2.2	Hmotnost larev	12
3.2.3	Doba vývoje od vajíčka v kuklu	12
3.2.4	Hladovění daných skupin much	13
3.3	Příprava vzorků k biochemickému stanovení hladin živin a Drome-AKH u daných skupin much	13
3.3.1	Příprava extraktů	13
3.4	Stanovení základních živin.....	15
3.4.1	Stanovení proteinů BCA metodou.....	15
3.4.2	Stanovení celkových glycidů.....	15
3.4.2	Stanovení glykogenu	16
3.4.3	Stanovení lipidů sulfo – fosfovanilínový test	17
3.4.4	Analýza lipidů pomocí HPLC-MS	17
3.4.5	Kompetitivní ELISA test.....	17
3.5	Výsledky a jejich zpracování.....	20

4	Výsledky.....	21
4.1	Obsah živin v těle.....	21
4.1.1	Obsah hlavních skupin lipidů.....	21
4.1.2	Obsah celkových lipidů.....	24
4.1.3	Obsah celkových lipidů během hladovění.....	24
4.1.4	Obsah glykogenu.....	26
4.1.5	Obsah glykogenu během hladovění.....	27
4.1.6	Obsah volných glycidů.....	29
4.1.7	Obsah volných glycidů během hladovění.....	29
4.1.8	Obsah rozpustných a nerozpustných proteinů.....	31
4.1.9	Obsah proteinů během hladovění.....	31
4.2	Hladina AKH.....	34
4.2.1	Hladina AKH během hladovění.....	36
4.3	Ostatní charakteristiky.....	38
4.3.1	Mortalita během hladovění.....	38
4.3.2	Rychlost vývoje jedinců.....	40
4.3.3	Změny hmotnosti těla během hladovění.....	41
5	Diskuze.....	42
6	Závěr.....	48
7	Seznam citované literatury.....	49
8	Příloha.....	I
8.1	Příprava roztoků.....	I

1 ÚVOD

1.1 Endokrinní soustava hmyzu

Vlastnosti a funkce endokrinní soustavy hmyzu jsou srovnatelné s endokrinní soustavou obratlovců. Centrum endokrinní soustavy u hmyzu je tvořeno neurosekretorickými buňkami mozku, endokrinními žlázami corpora cardiaca (CC) a corpora allata (CA). Mozek je nervově spojen s CC, která se nachází v blízkosti aorty a funguje jako neurohemální orgán sloužící k uvolňování neurohormonů do hemolymfy, ale i jejich vlastní produkci. Corpora cardiaca produkují například adipokinetické homony (AKH). CC jsou spojeny dalším párem nervů s corpora allata (CA). Tato tělíska produkují juvenilní hormony terpenoidní povahy, řídící metamorfózu a rozmnožování. Další důležitou žlázou jsou prothorakální žlázy, které mohou mít nepravidelný tvar a nachází se v prvním hrudním článku (prothorax) a produkují svlékací steroidní homony ecdysteroidy. Ecdysteroidy řídí svlékací procesy, metamorfózu a rozmnožování. U vyšších Dipter jako je například *D. melanogaster* žlázy CC a CA spolu s prothorakálními žlázami splývají v jediný orgán - kruhovou žlázu nasedající na přední část aorty v blízkosti mozku.



Obr. 1. Model struktury kruhové žlázy u larvy *D. melanogaster* (**A** a **B**). (**A**) – postranní pohled, (**B**) – příčný řez kruhovou žlázou). Zkratky: aca – axony ke corpus allatum, ao – aorta, br – brain (mozek), ca – corpus allatum, cc – corpus cardiacum, es – oesophagus (jícen), ncc – nervi corpori cardiaci, ptg – prothoracic gland (prothorakální žláza), tr – trachea lemující kruhovou žlázu, vc – ventral nerve cord (břišní nervová páska). Podle Velasco a kol. (2004) a King a kol. (1996).

1.2 Adipokinetické hormony u hmyzu

Adipokinetické hormony (AKH) jsou stresové hormony hmyzu, které patří mezi neuropeptidy kontrolující metabolické procesy (Gäde a kol. 1997) - především však stimulují reakce vedoucí k uvolňování energie. Adipokinetické hormony patří do tzv. adipokinetické hormone/red pigment concentrating hormone (AKH/RPCH) rodiny (Gäde 2009, Nässel a Winter 2010, Kodrík a kol. 2010). Strukturně tyto peptidy obsahují 8-10 aminokyselin s pyroglutamátovým zbytkem blokujícím N-konec, amidovou skupinou blokující C-konec molekuly, zbytkem aromatické aminokyseliny na pozici 4 (fenylalanin nebo tyrozin) a tryptofanem na pozici 8 (Gäde a Goldsworthy 2003, Gäde 2009, Gäde a Marco 2013). Dosud bylo objeveno a popsáno více jak 60 zástupců AKH u mnoha

různých druhů hmyzu (Gäde a kol. 2015). U octomilky obecné *Drosophila melanogaster* byl tento hormon identifikován skupinou Schaffer a kol. (1990). Jeho molekula má sekvenci: pGlu-Leu-Thr-Phe-Ser-Pro-Asp-Trp-NH₂ a používá se pro něj kódové označení Drome-AKH.

Adipokinetické hormony jsou syntetizovány neuroendokrinní žlázou corpora cardiaca, která se nachází v blízkosti mozku. Z ní jsou uvolňovány do hemolymfy a jí dopravovány k cílovým tkáním. AKH jako typické peptidické hormony nejsou schopné volně projít přes buněčnou membránu, proto je jejich signál převeden dovnitř buňky prostřednictvím specifického membránového receptoru zvaného AKH receptor (AKHR) (Park a kol. 2002). Tento receptor patří do rodiny receptorů pro gonadotropin releasing hormony (Lindemans a kol. 2011), které byly nalezeny u obratlovců. Tyto receptory jsou funkčně spojeny G-proteiny. Signální dráha AKH tedy zahrnuje vazbu na AKHR, aktivaci G-proteinu a následně pak alternativně buď adenylát cyklázovou nebo fosfolipázovou dráhu. V prvním případě jako druhý posel funguje cAMP, ve druhém pak inositol fosfát a diacylglycerol. V obou případech pak druzí poslové spolu s vápenatými ionty aktivují proteinkinázovou kaskádu vedoucí k aktivaci příslušných enzymů (Gäde a Auerswald 2003).

Obecně můžeme funkce AKH rozdělit do tří hlavních skupin. 1) Metabolické funkce, kde AKH stimulují katabolické děje, jako je mobilizace lipidů, glycidů a prolinu (Van der Horst a kol. 2001, Vroemen a kol. 1998), a inhibují syntetické procesy (Carlisle a Loughton 1979; Gokulda a kol. 1988; Kodrík a Goldsworthy 1995). 2) Biochemické funkce, kde AKH aktivují adenylát cyklázu (Spencer a Candy 1976), fosfolipázu C (Vroenen a kol. 1997), glykogen fosforylázu (Van Marrewijk a kol. 1980), a dále také antioxidační obranné mechanismy (Kodrík a kol. 2007, Bednářová a kol. 2013). 3) Fyziologické funkce, kde AKH stimulují srdeční činnost (Scarborough a kol. 1984, Noyes a kol. 1995), zvyšují svalový tonus (O' Shea a kol. 1984), stimulují imunitní odpověď (Goldsworthy a kol. 2002, 2003), aktivní pohybovou aktivitu (Socha a kol. 1999), regulují chování vyvolané hladověním (Lee a Park 2004), stimulují trávicí procesy (Lindemans a kol. 2011)

a inhibují zrání a vývoj vajíčka (Lorenz 2003). Z funkčního hlediska jsou AKH podobné glukagonu, který u obratlovců zvyšuje koncentrace glukózy v krvi za fyziologických i stresových podmínek (Jones a kol. 2012). Hmyz však může tolerovat větší výkyvy koncentrací glycidů i dalších metabolitů, proto kontrola jejich hladiny v hmyzí hemolymfě není tak přesná (Chapman 1998).

Hlavním orgánem, kde probíhá mobilizace energetických živin u hmyzu je tukové těleso, které může být považováno jako funkční ekvivalent jater nebo bílé tukové tkáně u savců (Azeez a kol. 2014). Tukové těleso kontroluje nejen syntézu a využití energetických zásob jako je tuk a glykogen, ale také metabolismus proteinů např. (lipophorinů) obsažených v hemolymfě a řady dalších metabolitů (Arrese a Soulages 2010). Hmyz získává energii z lipidů převážně ve formě diacylglycerolů a z glykogenu ve formě trehalózy (Auerswald a Gäde 1999, Scaraffia a Wells 2003). U lipidů se v procesu lipolýzy spouštěné prostřednictvím AKH aktivuje adenylát cyklázová dráha, kterou se aktivují lipázy, které štěpí triacylglyceroly na diacylglyceroly. Diacylglyceroly jsou hlavní transportní formou hmyzích lipidů a jsou přenášeny lipoforinovými nosiči (HDLp). V místě spotřeby - například v pracujícím svalu - jsou mastné kyseliny štěpeny v procesu beta oxidace (Van der Horst a kol. 2001) za uvolňování energetických substrátů. K mobilizaci glycidů dochází v procesu glykogenolýzy, která je u hmyzu také spouštěna AKH, prostřednictvím fosfolipázy C, která aktivuje přes kinázovou kaskádu enzym glykogen fosforylázu, jež štěpí glykogen na glukózu. Z glukózy je následně syntetizována trehalóza (transportní cukr), která je uvolněna do hemolymfy a přepravována k cílovým orgánům, kde se opět přeměňuje na glukózu sloužící jako přímý zdroj energie (Gäde a Auerswald 2003, Arrese a kol. 1999).

Uvolnění AKH z (CC) je pravděpodobně spouštěno zpětnovazebně poklesem trehalózy v hemolymfě na počátku aktivního pohybu (Beenackers a kol. 1984). Tento proces byl pozorován také u *D. melanogaster* (Kim a Rulifson 2004), kde se také ukázalo, že naopak trehalóza a glukóza inhibují uvolňování AKH z neurosekretorických buněk

(Passier a kol. 1997). To tedy naznačuje, že hladina trehalózy nebo glukózy hraje u *D. melanogaste* přímou roli v sekreci AKH.

1.3 Adipokinetický hormon jako „antiobézní“ faktor

Klíčovým procesem zajišťujícím udržení homeostázy a zdraví organismu je soulad příjmu potravy, ukládání energetických zásob a jejich výdej. Selháním tohoto systému může dojít k metabolickým onemocněním jako je např. obezita (Bouret a kol. 2015). U *D. melanogaster* bylo prokázáno, že AKH snižuje zásoby tuku v tukovém tělese, ale nikoliv zásoby glykogenu. Tento účinek AKH jako antiobézního hormonu přímo souvisí s požadavky AKH signalizace v tukovém tělese. Navzdory tomuto účinku AKH stimuluje trávicí procesy a pravděpodobně také chuť k jídlu (Gáliková a kol. 2017). To činí AKH jako velmi perspektivní faktor v boji proti obezitě.

1.4 Adenosin (Ado)

Adenosin patří mezi purinové nukleosidy, které jsou základní složkou nukleových kyselin. Skládá se z molekuly adeninu, který je připojen glykosidickou vazbou k molekule ribosy. Ado je přítomen ve všech živých organizmech (Jacobson a Gao 2009, Fredholm 2010). Ado se vytváří defosforylací AMP (Masino a Boison 2013). Může být transportován do hemolymfy a připojen na jednu, dvě nebo tři fosfátové skupiny (AMP, ADP, ATP; adenosin – mono-, di-, tri- fosfát). Ado také hraje důležitou roli jako extracelulární posel (cAMP), produkovaný adenylát cyklázou a je také jednou ze strukturálních jednotek nukleových kyselin (RNA nebo DNA), pokud se připojí na deoxyribosu (Jacobson a Gao 2009).

Adenosin řídí homeostázu a slouží také jako neuromodulátor. Ado je klíčový buněčný metabolit, který fyziologicky řídí řadu procesů. Tyto procesy zahrnují homeostázu kyslíku, energie, metabolismus tuku i glycidů, imunitní reakce (Jacobson a Gao 2009). Ado hraje také důležitou

roli v mozku, kde moduluje uvolňování nervových přenašečů (Sebastiao a Ribeiro 2000), chrání mozek před ischemií a hypoxií a před oxidativním stresem (Cunha 2001, Ferreira a Paes-de-Carvalho 2001, Fredholm a kol. 2011). Ado může být také zapojen do patologických stavů mozku (např. regulace spánku, epilepsie). Při řízení fyziologických procesů např. v mozku a srdci snižuje aktivitu těchto tkání (např. snížením srdečního rytmu, vazodilatací) (Fredholm a kol. 1999). Úloha Ado jako signální molekuly je v mnoha případech k nerozeznání od hormonů. Proto je někdy nazýván jako stresový hormon (Hasko a kol. 2002). Doba působení Ado je velmi krátká 1-10 sekund (Jacobson a Gao 2009).

Ado je součástí mnoha metabolických drah (Fredholm 2010). Za normálních podmínek je adenosin tvořen nepřetržitě intracelulárně stejně jako extracelulárně. Produkce intracelulárního Ado je zprostředkována rozpadem extracelulárních adeninových nukleotidů (ATP→Ado). Tato reakce je zprostředkována intracelulární 5' nukleotidásou, která defosforyluje AMP nebo SAH (S-adenosylhomocysteine) hydrolýzou. Ado syntetizovaný intracelulárně je transportován do extracelulárního prostoru prostřednictvím specifických obousměrných transportérů usnadněnou difúzí, která účinně vyrovnává hladinu intracelulárního a extracelulárního Ado. V některých tkáních je nukleosidový transport proteinů schopný udržet vysokou koncentraci Ado proti koncentračnímu gradientu. Když je koncentrace Ado v extracelulárním prostoru vysoká, Ado je transportován do buněk prostřednictvím transportérů. Poté dojde k fosforylaci na AMP pomocí adenosinkinázy nebo k degradaci na inosin prostřednictvím adenosindeaminázy. Jiným zdrojem extracelulárního Ado je cAMP, který může být uvolněn z neuronů a přeměněn extracelulární fosfodiesterázou na AMP a poté vnější 5'-nukleotidásou (ecto-5'-nukleotidase) na adenosin, k transportu Ado využívá buď speciální membránové proteiny – nukleosidové transportéry (Rose a Coe 2008, Molina – Arcas a kol. 2009) nebo extracelulární adenosin využije membránové adenosinové receptory (AdoR). Tento receptor patří mezi G-protein coupled receptory (GPCR). Po navázání Ado na AdoR, tento děj spustí kaskádu reakcí, vedoucí

přes dráhy aktivující adenylát cyklázu, fosfolypázu C, spolu s cAMP, diacylglycerolem, inositol fosfátem a Ca^{2+} jako přenašeči (viz kap. 1.2) U savců byly nalezeny 4 druhy AdoR receptorů, A1, A2A, A2B, A3. Tyto receptory moduluji intracelulární hladinu Ado a cAMP rozdílnými způsoby. Receptory A1 a A3, které se váží s G_i (inhibitory) proteinovou rodinou, po aktivaci inhibují tvorbu cAMP. Naopak aktivace receptorů A2A a A2B, které se váží s G_s (stimulanty) proteinovou skupinou, zapříčiní zvýšení tvorby cAMP (Dolezalova a kol. 2007, Kucerova a kol. 2012). Tyto AdoR skupiny se u savců nachází na různých místech těla. Např. A2A receptor je nejvíce exprimován v určitých částech mozku, slezině, v thymu (buňky imunity), srdci, plicích a cévách; A2B je exprimován ve všech tkáních, ale pouze v malých množstvích (Nyce 1999). U *D. melanogaster* je pouze jeden typ AdoR, který je podobný savčímu receptoru A2A a A2B. Po jeho aktivaci dojde v buňkách ke zvýšené expresi cAMP (Dolezalova a kol. 2007, Kucerova a kol. 2012). Pochopení Ado signalizace by mohlo pomoci vyvinout nové strategie k léčení různých lidských chorob jako je například tachykardie, poruchy spánku, onemocnění imunitního systému a zánětlivá onemocnění (Jacobson a Gao 2006).

1.5 Adipokinetický hormon vs. adenosin

Je zřejmé, že jak AKH, tak Ado signalizace využívá podobné mechanismy: receptory obou látek jsou spojené s G-proteiny a jejich signální reakce zvyšují hladiny cAMP a vedou k uvolňování vápníku. Tento fakt by mohl naznačovat, že AdoR by mohl sloužit jako další receptor spolu s AKH receptorem k aktivaci glykogenolytických procesů v buňkách tukového tělesa (Dolezalova a kol. 2007). Zuberova a kol. (2010) dále zjistili, že AdoR je u *D. melanogaster* exprimován v kruhové žláze, kde se nacházejí také buňky produkující AKH, nicméně o přímém zastoupení obou faktorů není dosud nic známo. Adenosin i AKH jsou zapojeny do energetického metabolismu, fyziologie tukové tkáně, imunitní odpovědi, metabolismu kyslíku a nervových funkcí (Kodrík 2008,

Jacobson a Gao 2009). Bylo také zjištěno, že oba faktory se pravděpodobně zapojují do obranné odpovědi na oxidativní stres u savců i u hmyzu (Maggirwar a kol. 1994, Husain a Somani 2005, Sousa a kol. 2008, Krishnan a Kodrík 2012, Kodrík a kol. 2015). Vystává otázka, zda Ado a AKH signální dráha fungují nezávisle nebo dohromady. Práce Zemanová a kol. (2016) naznačuje, že Ado a AKH signální dráhy nejspíše kontrolují antioxidantní odpovědi na stres nezávisle, avšak nevylučují se možnosti koordinace a zpětnovazebných účinků těchto drah.

2 Cíle práce

- Stanovit metabolické charakteristiky much *D. melanogaster* s poruchou produkce AKH a poruchou receptoru pro adenosin.
- Stanovit hladiny základních živin, hladiny Drome-AKH hormonu a mortalitu během hladovění.
- Posoudit vliv adipokinetického hormonu a adenosinu na vývoj larev *D. melanogaster*.
- Posoudit vzájemný vztah AKH a adenosinu v řízení výše uvedených charakteristik.

Téma práce je součástí projektu, který studuje úlohy a vlastnosti adipokinetických hormonů v hmyzím těle a jejich případné interakce s adenosinem. Protože tyto faktory kontrolují životně důležité procesy, je hlavním cílem projektu tyto procesy dobře poznat a pochopit, a případně je ovlivňovat. Takové poznatky mohou být někdy v budoucnosti prakticky použitelné třeba v zemědělství a posloužit tak k vývoji nových metod kontroly populací škodlivých druhů hmyzu.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 *Studované linie much octomilky obecné (Drosophila melanogaster)*

Octomilky byly od vajíčka po dospělé chovány ve skleněných epruvetách na speciální potravě (kukuřičná mouka/kvasnice/cukr). Epruvety s mouchami byly uchovávány v termostatech při teplotě 25 °C a fotoperiodě 12 h světlo - 12 h tma. Pokusy byly prováděny na larvách od prvního až do třetího instaru, dospělých samcích a samicích 3 dny po svléknutí.

Na pokusy byly použity tyto linie much: White (w^{1118}), AKH-deficientní (AKH-def), Rescue-AKH (R-AKH), AdoR-deficientní (AdoR-def), AKH-def/AdoR-def (double-def), AdoR-Exelixis-deficientní (ExAdoR-def):

1) Linie **white** (w^{1118}), (Bloomington Centre # 1118) sloužila jako kontrola k ostatním liniím much, které byly používány v pokusech.

2) Linie AKH-deficientní (**AKH-def**), s mutací genu pro syntézu adipokinetického hormonu na III. Chromozomu. Tato mutace s delecí tří bází, která způsobila ztrátu druhé aminokyseliny (Leu) z AKH oktapeptidu byla připravena cílenou mutací tohoto genu prostřednictvím TALEN (Transcription Aktivator-Like Effector Nuclease) metody. Výsledný genotyp mouchy AKH-def je $w; +; AKH-def / w; +; AKH-def$ (Sajwan a kol. 2015).

3) Linie Rescue-AKH (**R-AKH**), u které došlo k obnovení AKH produkce je vykřížená z AKH-def mouchy, u které byla navíc na II. chromozomu navozena ektopická exprese genu AKH. Výsledný genotyp mouchy byl $w; UAS - AKH+ = w+; AKH-def / w; act - G4 = w+; AKH-def$.

4) Linie Adenosin Receptor-deficientní (**AdoR-def**) s mutací v genu pro adenosinový receptor na III. chromozomu. Tato mutace byla vytvořena

vložím genu mini-white, w^{+mc} v AdoR genu. Moucha byla připravena homologní rekombinací. Výsledný genotyp mouchy byl $w; +; AdoR-def / w; +; AdoR-def$ (Dolezalova a kol. 2007).

5) Linie AKH-def/AdoR-def (double-def), nesla dvojitou mutaci a to mutaci s delecí genu pro syntézu adipokinetického hormonu jako u (AKH-def) mutantu a s mutací v genu pro adenosinový receptor jako u (AdoR-def) mutantu, kterému byl vložen gen w^{+mc} . Tato moucha byla připravena rekombinantním křížením homozygotních genotypů těchto much $w; +; AdoR-def$ AKH-def / $w; +; AdoR-def$ AKH-def .

6) Linie Exelixis-AdoR-deficientní (ExAdoR-def) nese mutaci v genu pro adenosinový receptor na III. chromozomu, která byla připravena jiným způsobem než AdoR-def. Výsledný genotyp mouchy byl $w+; +; ExAdoR-def$ (malá delece v sekvenci adenosinového receptoru) / $w+; +; Dj$ (3R) ExAdoR-def (velká delece v sekvenci adenosinového receptoru).

3.2 Základní charakteristiky daných skupin much

3.2.1 Hmotnost dospělců

Pokusné mouchy - samci i samice - byli nechány klást do připravených epruvet s potravou po dobu 24 hodin v počtu 10 samců a 20 samic. U skupiny (R-AKH) muselo dojít k nakřížení dvou linií much. Výsledný genotyp (R-AKH) byl $w; UAS - AKH+ = w+; AKH-def / w; act - G4 = w+; AKH-def.$, u první linie genotypu $w; UAS-AKH+ = w+; AKH-def/w; UAS-AKH+=w+; AKH-def$ se vybíraly pouze neoplozené samičky a ty se zkřížily se samci druhé linie $w; CyOGFP; AKH-def / w; act - G4 = w+; AKH-def$ a byli nechány klást na novou potravu. Všechny skupiny much byly nechány v těchto epruvetách tři dny, aby si zvykly a zkřížily se. Poté byly každých 24 hodin přemístěny do epruvet s novou potravou a po třech dnech byly dospělé mouchy odstraněny. Poté se začala líhnout nová generace much. U skupiny R-AKH byly vybírány pouze jedinci s rovnými křídly. Všichni vylíhlí jedinci byli roztříděni na samce a samice

a umístění do epruvet s novou potravou, kde byli drženi po dobu tří dnů, aby dospěli. Poté byli usmrceni v -20 °C a váženi na vahách (Explorer, Ohaus, max – 62 g, d – 0,01 mg).

3.2.2 Hmotnost larev

Samice se samci jednotlivých skupin byly vloženy do plastových klecí, používaných ke kladení vajíček kromě skupiny R-AKH; u skupiny R-AKH muselo dojít k nakřížení dvou linií (viz kap. 3.2.1) Pak byly mouchy všech skupin nechány tři dny na speciální potravě z agaru - příprava viz Příloha s trochou droždí rozmíchaného v destilované vodě. Poté, co si zvykly na dané prostředí, tak jim byla každých 8 hodin měněna potrava s nakladenými vajíčky za novou potravu a vajíčka přemístěna do inkubátoru. Druhý den se z vajíček vylíhly larvy, které byly jako jednodenní vybírány za pomoci binolupy; skupiny R-AKH je potřeba použít binolupu s UV světlem (ZEISS GFP STEREO, Diskovery V.8). Pomocí driveru act – Gal4 byla u larev zapnuta ektopická exprese genu AKH. Vybíraly se larvy, které nesvítily, protože tyto larvy obsahovaly danou mutaci. Larvy, které svítily, by v dospělosti byly se zahnutými křídly a bez dané mutace. Vybrané larvy byly přeneseny do nových epruvet, po 3 dnech vymyty z potravy a po 8 kusech váženy na vahách (Explorer, Ohaus, max – 62 g, d – 0,01 mg).

3.2.3 Doba vývoje od vajíčka v kuklu

Samice se samci jednotlivých skupin byli vloženi do plastových klecí (viz kap. 3.2.2), přičemž skupina much (R-AKH) musela být znovu nakřížena (viz kap. 3.2.1). Poté byly mouchy nechány tři dny na speciální potravě z agaru - příprava viz Příloha spolu s droždím (viz kap. 3.2.2). Poté, co si mouchy zvykly na dané prostředí, jim byla každé 4 hodiny potrava s nakladenými vajíčky měněna a vajíčka se nechala inkubovat do druhého dne. Druhý den byly vybírány z potravy již jednodenní larvy, za pomoci binolupy (ZEISS Stemi 2000 – C), kromě skupiny R-AKH, u které je potřeba použít binolupu s UV světlem (ZEISS GFP STEREO, Diskovery V.8). Larvy po přenesení do nové potravy byly pozorovány

v určitých intervalech (5,4; 5,5; 5,6; 6,0; 6,1 dne) a bylo počítáno množství kukel přibývajících v čase.

3.2.4 Hladovění daných skupin much

Genetické manipulace u daných skupin much mohou mít vliv na délku přežití. Pokusné mouchy byly připravovány obdobným způsobem, jako je uvedeno v kapitole 3.2.1. V období, kdy byly mouchy 3-6 dní staré, byly po 10 jedincích vloženy do epruvet na 0,5% agarózu - příprava viz Příloha a nechány hladovět. Mouchy byly kontrolovány každých 12 hodin (v 8:00 a v 20:00 hodin) a byl vždy spočítán počet uhynulých jedinců. Tento pozorovací pokus byl prováděn tak dlouho, dokud všechny mouchy nezahynuly. K pokusům ke stanovení základních živin a hladin Drome-AKH během hladovění byly použity samci i samice 3 dny po svléknutí a byly v intervalech 10, 20, 30, 40, 50, 60 hodin hladovění na 0,5% agaróze usmrceny mrazem v -20 ° C. Poté byly přeneseny do epruvet po dvou jedincích a poté byly zváženy na analytických vahách (Explorer, Ohaus, max – 62 g, d – 0,01 mg) a v epruvetách uloženy v -20 °C na další zpracování. Pokud to bylo možné, byly vzorky po celou dobu manipulace uchovávány na ledu.

3.3 Příprava vzorků k biochemickému stanovení hladin živin a Drome-AKH u daných skupin much

3.3.1 Příprava extraktů

3.3.1.1 Extrakce Drome-AKH

K získání AKH byly mouchy stříhány na polovinu v prothoraxu za prvním párem nohou; na jeden vzorek byly použity 2 mouchy. Poté byly vzorky zhomogenizovány jehlovým sonikátorem (ULTRASONIC HOMOGENIZER 4710 series; v 120 µl v 80 % methanolu). Homogenát

byl stočen (10 000 g, 4 °C, 3 minuty v centrifuze Hettich EBA 12 R), supernatant přenesen do nové zkumavky a zbylý sediment byl znovu extrahován stejným způsobem, oba supernatanty byly spojeny a odpařeny ve vakuové centrifuze (Speed Vac Jouan RC 10.22).

3.3.1.2 Extrakce proteinů

Každá moucha byla individuálně zhomogenizována jehlovým sonikátorem (ULTRASONIC HOMOGENIZER 4710 series) ve 250 µl 0,2 M Tris-HCl pufru, pH 7,8 - příprava viz Příloha. Homogenát byl stočen (10 000 g, 4 °C, 3 minuty v centrifuze Hettich EBA 12 R) a bylo odebráno 50 µl supernatantu na stanovení ve vodě rozpustných bílkovin. Zbylý sediment byl dále extrahován ve 100 µl 1 % tritonu v 0,2 M Tris-HCl pufru (pH 7,8). Pro stanovení ve vodě nerozpustných bílkovin bylo použito 50 µl takto získaného supernatantu (Stoscheck 1990).

3.3.1.3 Extrakce celkových glycidů, glykogenu

Každý vzorek byl zhomogenizován jehlovým sonikátorem v 100 µl 70% etanolu a poté byl vzorek stočen (10 000 g, 4 °C, 3 minuty). Supernatant byl přenesen do jiné mikrozkušavky a zbylý sediment znovu extrahován stejným způsobem. Oba supernatanty byly spojeny a odpařeny ve vakuové centrifuze (Speed Vac Jouan RC 10.22). Zbylý sediment byl použit pro extrakci na stanovení glykogenu (Carol a kol. 1956). Sedimenty po extrakci glycidů byly znova homogenizovány jehlovým sonikátorem v 100 µl, 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8 - příprava viz Příloha. Vzorky byly poté stočeny (10 000 g, 4 °C, 3 minuty) a extrakce byla zopakována ještě jednou; nakonec byly oba supernatanty spojeny a odpařeny ve vakuové centrifuze (Speed Vac Jouan RC 10.22; Ohtsu a kol. 1992).

3.3.1.4 Extrakce celkových lipidů

K extrakci pro stanovení celkových lipidů byly použity sedimenty z předchozí extrakce celkových glycidů a glykogenu. Vzorky byly zhomogenizovány jehlovým sonikátorem, ve 150 µl směsi chloroform : metanol, 2 : 1 (Folch a kol. 1957, Košťál a Šimek 1998). Vzorek byl pak

stočen (10 000 g, 4 °C, 3 minuty) a supernatant odebrán. Extrakce byla zopakována ještě jednou a oba supernatanty byly spojeny a odpařeny ve vakuové centrifuze (Speed Vac Jouan RC 10.22).

3.4 Stanovení základních živin

3.4.1 Stanovení proteinů BCA metodou

Princip metody spočívá v tom, že bicinchoninová kyselina (BCA) tvoří v alkalickém prostředí komplex s Cu^{1+} za vzniku nachového zbarvení. Cu^{2+} ionty, které jsou s proteinem vázány peptidickou vazbou se v alkalickém prostředí redukují na mědné. Sytost barevného produktu je přímo úměrná koncentraci proteinů (Stoschck 1999).

Ke stanovení obsahu proteinů ve vzorcích byl použit kit firmy Sigma-Aldrich. Do připravených vzorků (viz kap. 3.3.3) na stanovení rozpustných (50 μl) a nerozpustných proteinů (50 μl) byl přidán 1 ml reakčního činidla, které bylo připraveno smícháním roztoku BCA a 4% CuSO_4 v poměru 50 : 1. Poté byly vzorky promíchány (Vortex Mixer – Labnet international Inc.) a inkubovány v blokovém termostatu (60 °C, 30 minut, Block Heater SBH 130 D). Po zahřátí byly vzorky ochlazeny a ekvivalent 200 μl byl použit na stanovení proteinů. Absorbance vzorků byla měřena na mikrotitrační destičce na ELISA čtečce při 562 nm (ELISA čtečka Spectra Max 340 PC, Molecular Devices, USA). Pro stanovení faktického obsahu proteinů byla spolu se vzorky vždy připravena série BSA (Bovine serum albumin, Sigma-Aldrich) standardů o těchto dávkách: 0,5 μg ; 2 μg ; 8 μg ; 18 μg ; 50 μg . Tyto standardy v objemu 50 μl byly použity na vlastní stanovení (Stoscheck 1990).

3.4.2 Stanovení celkových glycidů

Metoda stanovuje celkové glycidy - redukující i neredukující. Cukerné sloučeniny ve vzorku se po zahřátí s kyselinou sírovou hydrolyzují a následně se dehydratují za vzniku furfuralu. Furfural reaguje s anthronem za vzniku barevné sloučeniny (Laurentin a Edwards 2003).

Odpařený vzorek (viz kap. 3.3.4) byl rozpuštěn ve vhodném množství destilované vody v závislosti na množství much ve vzorku a na stanovení celkových glycidů byl použit 40 μl ekvivalent. Do vzorku bylo přidáno 230 μl anthronového činidla - příprava viz Příloha. Spolu se vzorky byl připraven standard glukózy o těchto dávkách: 1,6 μg ; 3,6 μg ; 7,2 μg ; 14,4 μg ; 28,8 μg ; 57,6 μg a blank (destilovaná voda). Poté byl vzorek promíchán (Vortex Mixer – Labnet international Inc.) a povařen v blokovém termostatu (100 °C, 8 minut). Povařený vzorek byl ochlazen a ekvivalent 200 μl byl použit na vlastní měření. Absorbance vzorků spolu se standardem byla měřena na mikrotitrační destičce na ELISA čtečce při 620 nm (ELISA čtečka Spectra Max 340 PC, Molecular Devices, USA; (Carol a kol. 1956).

3.4.2 Stanovení glykogenu

Metoda spočívá ve vylouhování živočišných tkání v horkém roztoku KOH, následném působení etanolu, při kterém dojde k vysrážení glykogenu. Vysrážený glykogen je hydrolyzován Na_2SO_4 . Výsledný hydrolyzát je jako redukující cukr stanoven pomocí anthronového činidla (Seifter a kol. 1950).

Odpařený vzorek (viz kap. 3.3.4) byl rozpuštěn v 20 μl destilované vody. Poté bylo do vzorku přidáno 130 μl 30% KOH a byl povařen v blokovém termostatu (100 °C, 15 minut). Následně byl vzorek promíchán na vortexu a ochlazen. Po stočení v centrifuze (14 000 g, 4 °C, 15 minut) byl ze vzorku odebrán 50 μl ekvivalent supernatantu do nové mikrozkušavky a k němu přidáno 25 μl 10% Na_2SO_4 . Poté byl vzorek znovu promíchán na vortexu a smíchán se 150 μl 95% etanolu. Po dalším promíchání byl vzorek ponechán na ledu 30 minut za dalšího občasného promíchání. Následovala centrifugace (10 000 g, 4 °C, 20 minut) a odstranění supernatantu; sediment byl pak rozmíchán ve 100 μl 70% etanolu a znovu stočen (10 000 g, 4 °C, 20 minut). Po odstranění supernatantu byl zbylý sediment rozpuštěn ve vhodném množství destilované vody v závislosti na množství much ve vzorku z čehož bylo 40 μl odebráno na stanovení glykogenu pomocí anthronového činidla (viz kap 3.4.2) (Ohtsu a kol. 1992).

3.4.3 Stanovení lipidů sulfo – fosfovanilínový test

Podmínkou pro tuto reakci je přítomnost dvojných vazeb, které jsou v lipidech hmyzu hojně zastoupeny. Reakce probíhá v koncentrované kyselině sírové v několika krocích: nenasyčené mastné kyseliny reagují s kyselinou sírovou za vzniku karbonylových iontů. Vanilín reaguje s kyselinou fosforečnou a produkt tvoří ester kyseliny fosforečné. Tento ester reaguje s karbonylovými ionty za vzniku barevného komplexu (Zöllner a Kirch 1962, Knight a kol. 1972).

Do odpařeného vzorku (viz kap 3.3.5) bylo přidáno 100 μ l koncentrované kyseliny sírové a vzorek byl povařen v blokovém termostatu (100 °C, 10 minut). Po ochlazení byl přidán ke vzorku 1 ml fosfovanilínového činidla – příprava viz Příloha, a po důkladném promíchání na vortexu byla směs 30 minut inkubována při pokojové teplotě. Spolu se vzorkem byl obdobně připraven standard kyseliny olejové o těchto dávkách: 0,282 μ g, 0,565 μ g, 1,412 μ g, 2,825 μ g, 5,650 μ g, 14,125 μ g, 28,250 μ g, 56,500 μ g, a blank - koncentrovaná kyselina sírová. Absorbance byla měřena na mikrotitrační destičce při 546 nm (ELISA čtečka Spectra Max 340 PC, Molecular Devices, USA).

3.4.4 Analýza lipidů pomocí HPLC-MS

Těla *D. melanogaster* byla extrahována dle Folcha (1957) (viz kap.3.3.5) (chloroform: metanol), extrakty byly odpařeny a znovu rozpuštěny v metanolu s interním standardem (PG 17:0/17:0). Pět μ l vzorku bylo automatickým dávkovačem Accela (Thermo) nastříknuto na chromatografickou kolonu Gemini 250 x 2 mm i.d. 3 μ m (Phenomenex), kde proběhlo rozdělení vzorku. Dále byl vzorek zpracován hmotnostním spektrometrem LTQ (Thermo) dle postupu popsaném Schneedorferovou a kol. (2015).

3.4.5 Kompetitivní ELISA test

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) je biochemická metoda využívající protilátky a enzymu, který dokáže vyvolat barevnou změnu

ve vzorku tak, aby bylo možné reakci změřit. Tato metoda dokáže ve vzorku změřit velmi malé množství antigenů (například hormonů) nebo i protilátek (Gan a Patel 2013). V kompetitivním ELISA testu probíhá proces, ve kterém dochází k „soutěžení“ antigenů o navázání na mikrotitrační ELISA destičku, na které je navázána primární protilátka. Konkurence je mezi antigenem ve vzorku a antigenem BLAM (Biotin Long Arm Maleimide), který obsahuje vazebné místo pro sekundární protilátku. Po přidání sekundární protilátky HRPS (Horse Radish Peroxidase Streptavidin), který je značený Avidinem, se přidá substrát (Elisa Substrate buffer). Je-li ve vzorku velké množství antigenu, tak se naváže na mikrotitrační ELISA destičku a nedojde k barevné reakci. Je-li ve vzorku málo antigenu, tak se na mikrotitrační ELISA destičku naváže Blam, který obsahuje vazebné místo pro sekundární protilátku HRPS a tím dojde k enzymatické barevné reakci po přidání substrátu mezi Avidinem a BLAM (Biotinem).

Kompetitivní ELISA test byl prováděn podle Zemanové a kol. (2016) následujícím způsobem: nejprve byla na mikrotitrační ELISA destičku (Corning, New York) napipetována IgG protilátka (anti-Drome AKH polyclonal antibody dar od J. Veenstery, Bordeaux University, Francie), ředěna 1: 10 000 v Coating buffer - příprava viz Příloha 100 μ l / jamku. Na destičku byla nalepena fólie a poté byla vložena do lednice a ponechána do druhého dne. Druhý den byl pufr z mikrotitrační ELISA destičky odstraněn a všechny jamky byly promyty multikanálovou pipetou 3 krát s 200 μ l Washing buffer (WB^+) - příprava-viz Příloha. Po každém promytí byl zbylý roztok z jamek vždy odstraněn sklepnutím na filtrační papír. Poté byly zablokovány nespecifické vazby (místa, kde se antigen nenavázal) blokovacím pufrům (3% roztok boviny serum albuminu ve WB^+) 200 μ l / jamku – příprava viz Příloha a destička byla inkubována v inkubátoru (Heidolph TITRAMAX 1000) (37 °C, 1 hodina); následovalo promytí 3 krát ve WB^+ . V dalším kroku byl do jamek mikrotitrační ELISA destičky aplikován antigen obsažený v 50 μ l vzorku v (WB^-) – příprava viz Příloha (ekvivalent 2 hlav a roztok BLAMu (Gln-Leu-Thr-Phe-Ser-

Pro-Ap-Trp-Lys(bio)-Gly-NH₂, Vidia, Praha, Czech Republic) 50 µl o dávce 195 fmol v (WB⁻). Kompetice mezi oběma agens probíhala (1 hodina, 37 °C). Paralelně se vzorky byl na destičku aplikován také Drome-AKH standard řaděný dvojkovou řadou v (WB⁻) s počáteční dávkou 10 pmol / jamku a slepý vzorek. Po inkubaci byla mikrotitrační ELISA destička 3 krát promyta tak jako v předchozích případech. Následně byla přidána sekundární protilátka HRPS (Horse Radish Peroxidase Streptavidin, Vector Laboratories, CA, USA; ředění 1:5000, 100 µl), která má enzymatickou aktivitu a připojuje se pouze na BLAM. Poté byla destička opět inkubována (1 hodina, 37 °C), následovalo další promytí a přidání substrátu (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine, Sigma Aldrich, 100 µl do každé jamky). Během další inkubace (40 minut, 37 °C) byla destička zabalena do alobalu kvůli zamezení přístupu světla. Probíhající barevná reakce byla zastavena přidáním 50 µl 0,5 M H₂SO₄ do každé jamky a intenzita reakce změřena na ELISA čtečce (Spectra Max 340 PC, Molecular Devices, USA) při vlnové délce 450 nm.

3.5 Výsledky a jejich zpracování

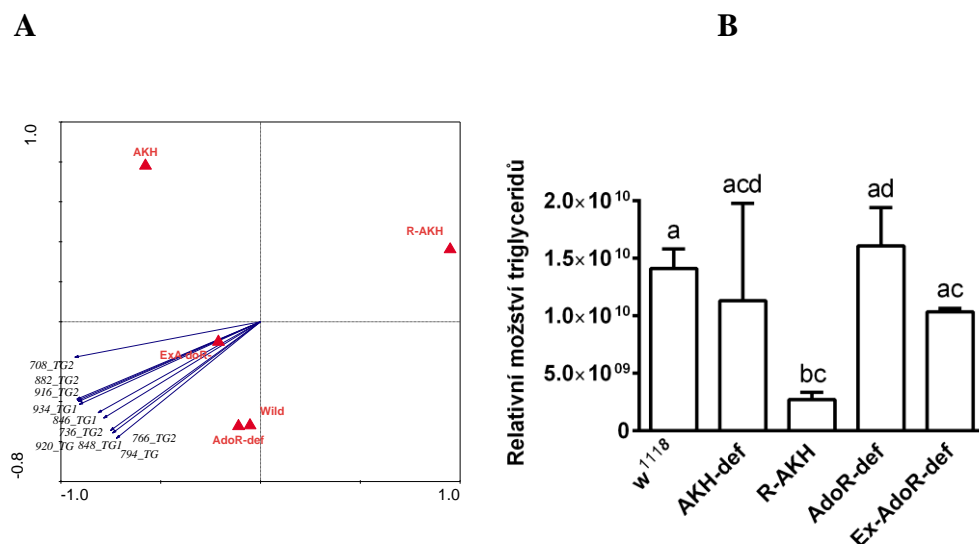
Pro vizualizaci naměřených dat a jejich statistické zpracování byl použit program GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc., CA, USA). Na vyhodnocení dat o přežívání byla použita analýza přežívání (survival analysis). Ke zjištění rozdílu mezi jednotlivými skupinami byl použit Gehan-Wilcoxonův test s Bonferroniho korekcí hladiny významnosti ($P = 0,013$, Dunn 1961). V ostatních případech byly pro statisticky významné rozdíly využity 0,1 %, 1 % a 5 % hladiny významnosti. Prostřednictvím analýzy rozptylu s opakovanými měřeními (Repeated measures analysis of variance, RM ANOVA) a následného mnohonásobného porovnání Dunnetovým testem (post hoc test, porovnání skupin s kontrolní skupinou) byla zpracována data získaná během hladovění, tj. obsahy živin v těle, množství Drome-AKH a vývoj jedinců od prvního instaru v kuklu. Množství Drome-AKH u skupin bez jakéhokoliv zásahu bylo hodnoceno pomocí jednocestné analýzy rozptylu (one-way ANOVA) a následného mnohonásobného porovnání Tukeyho testem (porovnání všech skupin mezi sebou). Prostřednictvím jednocestné analýzy rozptylu a následného Dunnetova testu (porovnání skupin s kontrolní skupinou) byl u skupin bez jakéhokoliv zásahu vyhodnocen obsah živin. Data z HPLC-MS byla zpracována mnohorozměrnou lineární omezenou redundanční analýzou (redundancy analysis, RDA, program CANOCO 4.5, Plant Research International, Holandsko). Statistická průkaznost proměnných byla prokázána Monte-Carlo permutačním testem (Lepš a Šmilauer 2000). Na základě této analýzy byla vytvořena grafická vizualizace dat. Naměřené hodnoty jsou vyjádřeny jako průměr \pm směrodatná odchylka (standard deviation, SD). Počet měření v jednotlivých pokusech je uveden v popisech příslušných grafů.

4 Výsledky

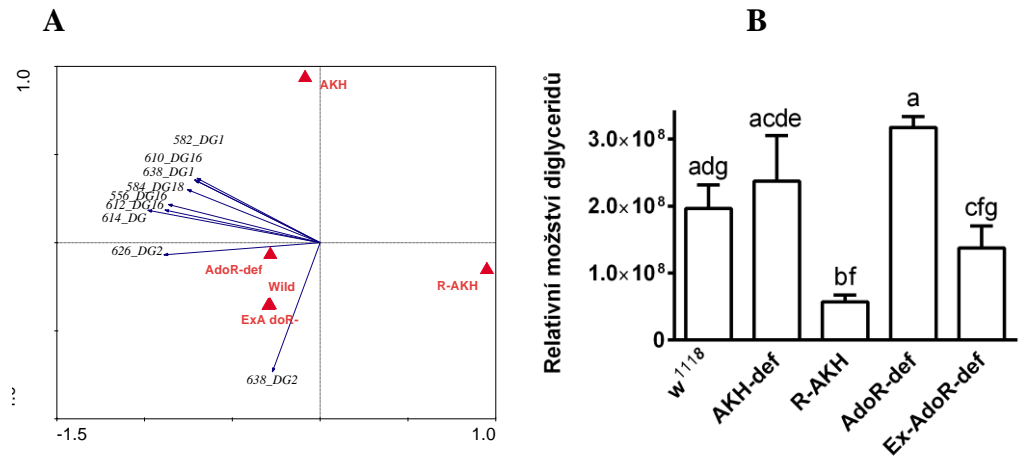
4.1 Obsah živin v těle

4.1.1 Obsah hlavních skupin lipidů

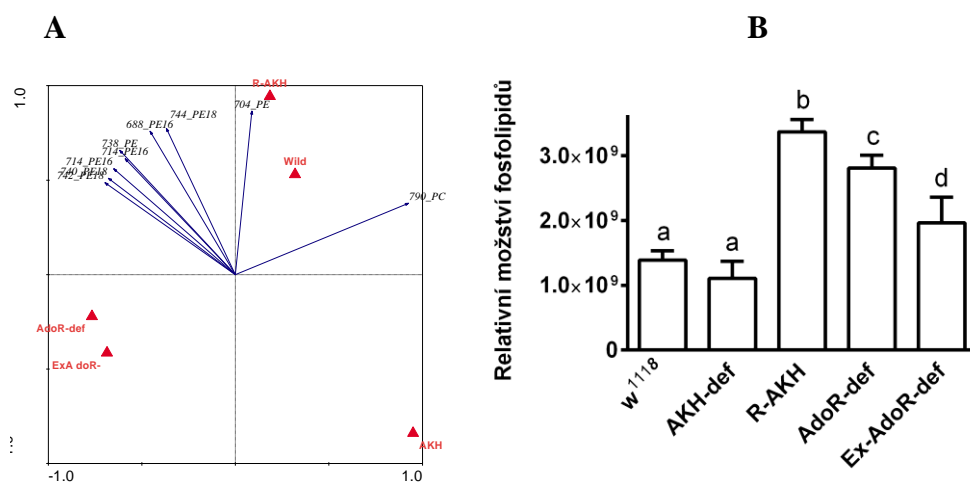
Měření obsahu lipidů u dospělců v první sérii pokusů ukázalo značné rozdíly mezi jednotlivými skupinami much u stanovení hladin triglyceridů (TG) nacházejících se především v tukovém tělese, diglyceridů (DG) nacházejících se hlavně v hemolymfě a fosfolipidů (PL) obsažených v buněčných membránách. Výsledky ukázaly, že hladiny TG (zásobních lipidů), (Obr. 2) víceméně odpovídají hladinám DG (lipidům cirkulujícím), (Obr. 3), kde vyšší hladina byla naměřena u skupiny w¹¹¹⁸ (kontrola), AKH-def, AdoR-def a Ex-AdoR-def, a nejnižší u R-AKH skupiny. Hladina PL (Obr. 4) byla naopak nejnižší u w¹¹¹⁸ a AKH-def., a vyšší u skupin R - AKH a AdoR-def .



Obr. 2. Stanovení triglyceridů. **A** – RDA analýza obsahu triglyceridů v těle much (výsledky získány HPLC/ESI-MS analýzou). **B** - relativní množství triglyceridů (TG) u různých skupin intaktních much (samci; průměr ± SD, n=4). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí statistického testu jednocestná ANOVA s Tukeyho post testem. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami na 5 % hladině významnosti jsou označeny různými písmeny.



Obr. 3. Stanovení diglyceridů. **A** – RDA analýza obsahu diglyceridů v tělech much (výsledky získány HPLC/ESI-MS analýzou). **B** - relativní množství diglyceridů (DG) u různých skupin intaktních much (samci; průměr \pm SD, $n=4$). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí statistického testu jednocestná ANOVA s Tukeyho post testem. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami na 5 % hladině významnosti jsou označeny různými písmeny.



Obr. 4. Stanovení fosfolipidů. **A** – RDA analýza obsahu fosfolipidů v těle much (výsledky získány HPLC/ESI-MS analýzou). **B** - relativní množství fosfolipidů (PL) u různých skupin intaktních much (samci; průměr \pm SD, $n=4$). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí statistického testu jednocestná ANOVA s Tukeyho post testem. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami na 5 % hladině významnosti jsou označeny různými písmeny.

4.1.2 Obsah celkových lipidů

Stanovením hladin celkových lipidů u dospělců (Obr. 5) před hladověním bylo podle očekávání zjištěno, že hladina u R-AKH samců byla (2,34 krát) u samic (3,4 krát) menší v porovnání s kontrolou. Podobné tomu bylo u skupiny AdoR-def, kdy u samců byla hladina neočekávaně (2,25 krát) nižší a u samic byla (2,15 krát) nižší v porovnání s kontrolou. Tyto hladiny byly porovnány s triglyceridy a diglyceridy. Hladina R-AKH byla u TG i DG podobná, ale AdoR-def se značně lišila a jeho hladina je u celkových lipidů znatelně nižší.

4.1.3 Obsah celkových lipidů během hladovění

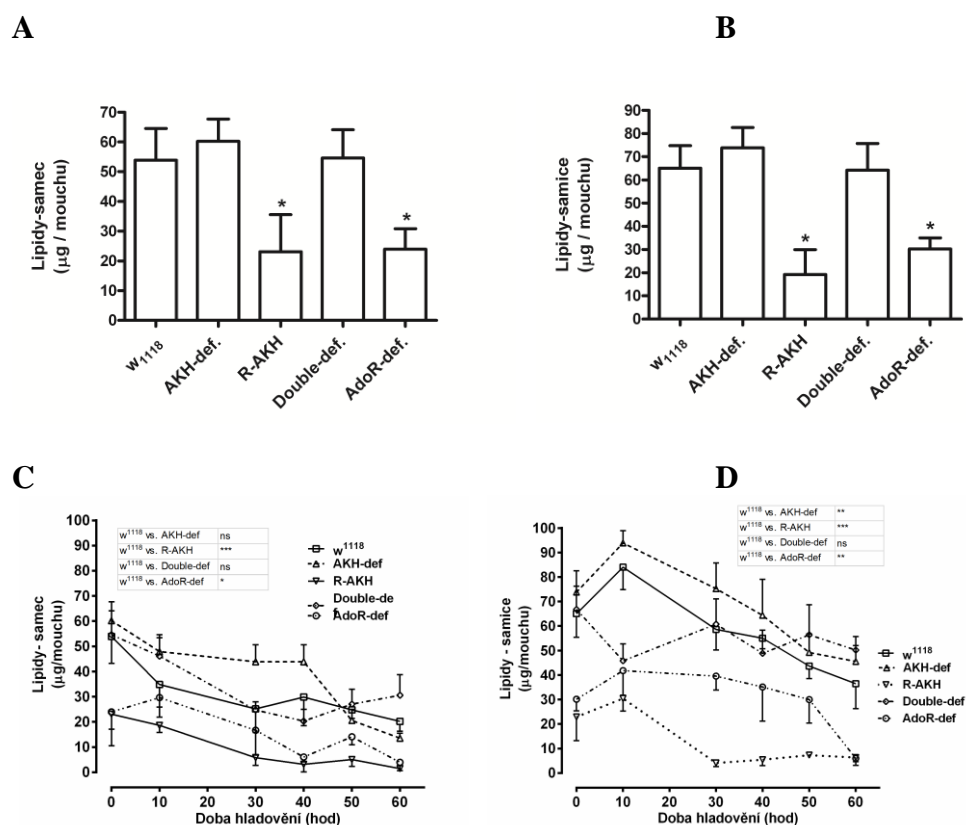
Stanovení hladin celkových lipidů u dospělců (Obr. 5) během hladovění mělo za cíl prokázat vliv přítomnosti/nepřítomnosti AKH/AdoR

na metabolismus lipidů u různě geneticky upravených skupin much. Následující měření jak u samců, tak u samic poskytlo zajímavé informace o spalování celkových lipidů u daných skupin much. Lze si všimnout, že hladina lipidů se na začátku testu u jednotlivých pokusných skupin podstatně lišila: u obou pohlaví byla nejvyšší u AKH-def a nejnižší u

R-AKH. S prodlužující dobou hladovění se hladina lipidů snižovala (Tab 1). Statisticky významné rozdíly při porovnání kontroly s ostatními skupinami much byly naměřeny u obou pohlaví u R-AKH a AdoR-def, a navíc u AKH-def u samic.

Samec	Celkové lipidy		Samice	Celkové lipidy	
w1118	2,67	↓	w1118	1,78	↓
AKH-def	4,45	↓	AKH-def	1,62	↓
R-AKH	15,51	↓	R-AKH	12,81	↓
Double-def	1,79	↓	Double-def	1,33	↓
AdoR-def	6,07	↓	AdoR-def	6,07	↓

Tab. 1. Kolikrát se hladina celkových lipidů u samců a samic snížila (↓) v porovnání se začátkem pokusu.



Obr. 5. Množství celkových lipidů (µg/mouchu) u různých skupin much: (µg/mouchu) u různých skupin much **A** – samci v čase 0, **B**-samice v čase 0 (průměr ± SD, n= 8). Statisticky významné rozdíly byly vyhodnoceny prostřednictvím jednocestné ANOVA s Dunnetovým post-testem. Statisticky významné rozdíly mezi skupinou w¹¹¹⁸ a ostatními skupinami na 5 % hladině významnosti jsou označeny hvězdičkou. **C** – samci během hladovění, **D** – samice během hladovění (průměr ± SD, n= 6). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny prostřednictvím Repeated measures analysis variance (RM ANOVA) testu s Dunnetovým post-testem (***) 0,1% hladina, ** 1% hladina, * 5% hladina, ns – statisticky nevýznamné).

4.1.4 Obsah glykogenu

Obsahy glykogenu u dospělců (Obr. 6) před hladověním se víceméně podobaly hladině lipidů s tím rozdílem, že jejich celková hladina je mnohem nižší než lipidů. Hladina glykogenu u samic skupiny R-AKH byla (1,52 krát) a u skupiny AdoR-def byla (1,78 krát) nižší oproti

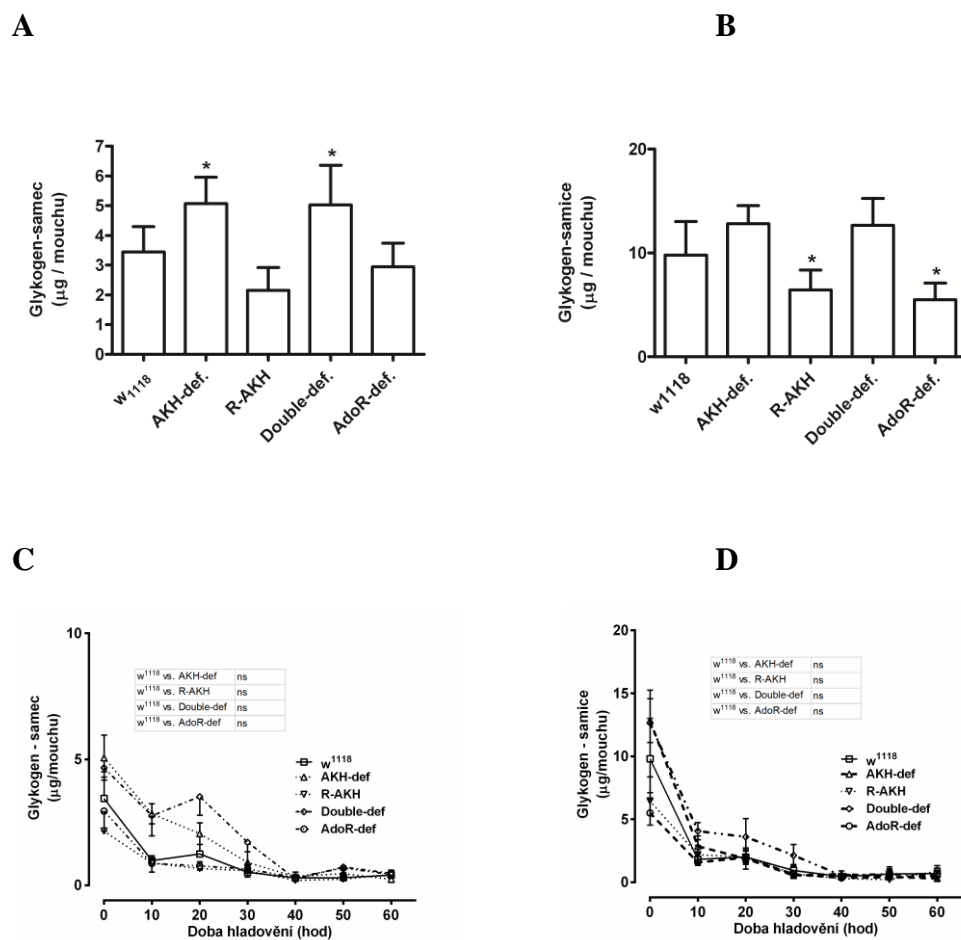
kontrole a naopak u samců skupiny AKH-def byla hladina (1,31 krát) a u skupiny Double-def (1,46 krát) vyšší než u kontrolní skupiny.

4.1.5 Obsah glykogenu během hladovění

Měření glykogenu u dospělců (Obr. 6) samců a samic během hladovění ukázalo rozdíly jeho hladiny na začátku testu u jednotlivých skupin, podobně jako tomu bylo u lipidů. Nejvyšší hladiny byly zjištěny u obou pohlaví u AKH-def a Double-def, nejnižší pak u R-AKH (samec) a AdoR-def (samice), přičemž celková hladina glykogenu byla u samic vyšší než u samců. Jak bylo možné očekávat, hladiny glykogenu během hladovění u všech skupin klesaly až téměř na hranici měřitelnosti (Tab. 2). Statistické testy neprokázaly rozdíly mezi kontrolou a ostatními skupinami.

Samec	Glykogen		Samice	Glykogen	
w1118	8,61	↓	w1118	13,97	↓
AKH-def	21,52	↓	AKH-def	42,11	↓
R-AKH	4,88	↓	R-AKH	7,28	↓
Double-def	9,72	↓	Double-def	22,81	↓
AdoR-def	6,83	↓	AdoR-def	10,48	↓

Tab. 2. Kolikrát se hladina glykogenu u samců a samic snížila (↓) na konci pokusu v porovnání se začátkem.



Obř. 6. Mnořství glykogenu ($\mu\text{g}/\text{mouchu}$) u rŕznŕch skupin much **A** – samci v ŕase 0, **B**-samice v ŕase 0 (prŕmŕř \pm SD, $n= 8$). Statisticky vŕznamnŕ rozdŕly byly vyhodnoceny prostřednictvŕm jednocestnŕ ANOVA s Dunnettovŕm post-testem. Statisticky vŕznamnŕ rozdŕly mezi skupinou w^{1118} a ostatnŕmi skupinami na 5 % hladinŕ vŕznamnosti jsou oznaĕeny rŕznŕmi pŕsmeny. **C** – samci bŕhem hladovŕnŕ, **D** – samice bŕhem hladovŕnŕ (prŕmŕř \pm SD, $n= 6$). Statisticky vŕznamnŕ rozdŕly mezi skupinami byly vyhodnoceny prostřednictvŕm Repeated measures analysis variance (RM ANOVA) testu s Dunnettovŕm post-testem (***) 0,1% hladina, ** 1% hladina, * 5% hladina, ns – statisticky nevŕznamnŕ).

4.1.6 Obsah volných glycidů

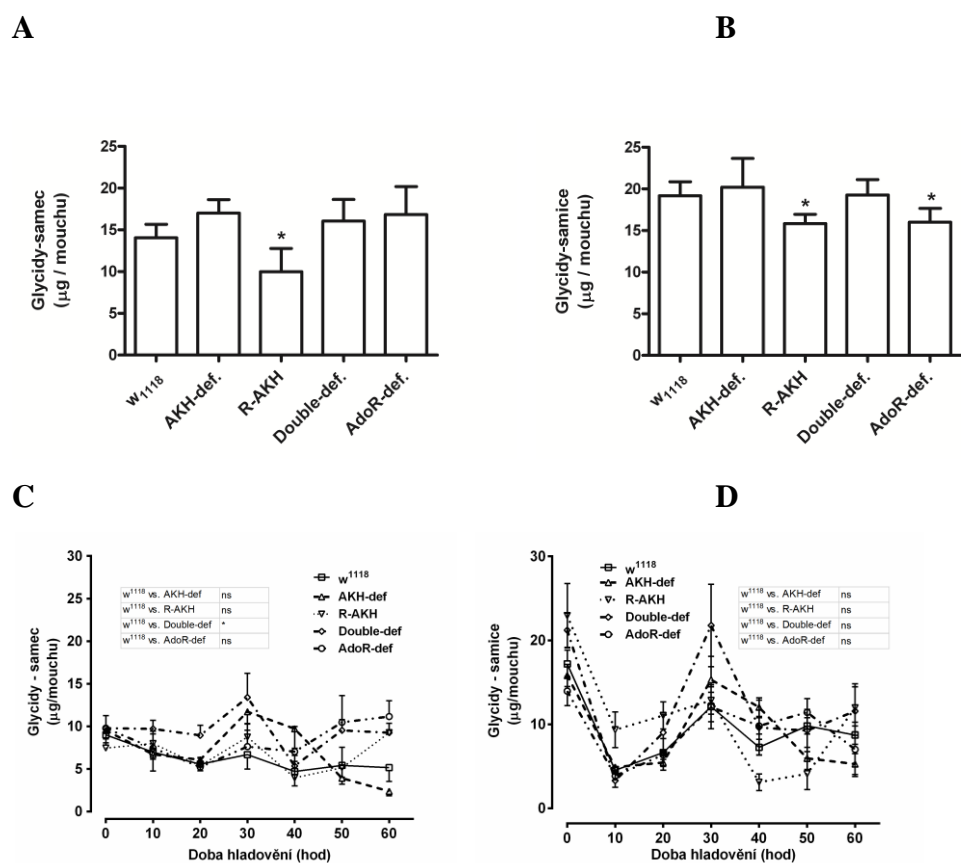
Stanovením hladiny celkových glycidů u dospělců (Obr. 7) na začátku pokusu bylo zjištěno, že hladina u R-AKH samců (1,41krát) i u samic (1,21 krát) je podstatně nižší oproti kontrole a u samic AdoR-def (1,2 krát) je také nižší oproti kontrole. Předpokládá se, přímého zapojení AKH nejen do metabolismu lipidů, ale i do metabolismu glycidů a tento výsledek, tomuto faktu vyhovuje.

4.1.7 Obsah volných glycidů během hladovění

Výsledky hladin volných glycidů u dospělců (Obr. 7) během hladovění nebyly tak jednoznačné: hladiny v průběhu hladovění značně kolísaly (Tab. 3) Klesající tendence hladiny glycidů byla pozorována u samců do 20 hodin, a u samic do 10 hodin od začátku pokusu. Poté bylo zaznamenáno zvýšení hladin v době 30 hodin. Statistické porovnáním kontroly w¹¹¹⁸ s ostatními skupinami much prokázalo významný rozdíl u samců skupiny Double-def, u ostatních skupin nebyly prokázány žádné významnější rozdíly.

Samec	Celkové glycidy		Samice	Celkové glycidy	
w1118	1,75	↓	w1118	1,97	↓
AKH-def	4,01	↓	AKH-def	3,00	↓
R-AKH	1,24	↑	R-AKH	1,92	↓
Double-def	1,06	↓	Double-def	1,83	↓
AdoR-def	1,14	↑	AdoR-def	1,99	↓

Tab. 3. Kolikrát se hladina celkových glycidů u samců a samic snížila (↓) na konci pokusu nebo zvýšila (↑) v porovnání se začátkem.



Obř. 7. Mnořství celkových glycidů (µg/mouchu) u řůzných skupin much **A** – samci v řase 0, **B** – samice v řase 0 (průměr ± SD, n= 6). Statisticky významné rozdíly byly vyhodnoceny prostřednictvím jednocestné ANOVA s Dunnetovým post-testem. Statisticky významné rozdíly mezi skupinou w¹¹¹⁸ a ostatními skupinami na 5 % hladině významnosti jsou oznařeny hvězdičkou. **C** – samci během hladovění, **D** – samice během hladovění (průměr ± SD, n= 6). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny prostřednictvím Repeated measures analysis variance (RM ANOVA) testu s Dunnetovým post-testem (*** 0,1% hladina, ** 1% hladina, * 5% hladina, ns – statisticky nevýznamné). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny prostřednictvím Repeated measures analysis variance (RM ANOVA) testu s Dunnetovým post-testem (*** 0,1% hladina, ** 1% hladina, * 5% hladina, ns – statisticky nevýznamné).

4.1.8 Obsah rozpustných a nerozpustných proteinů

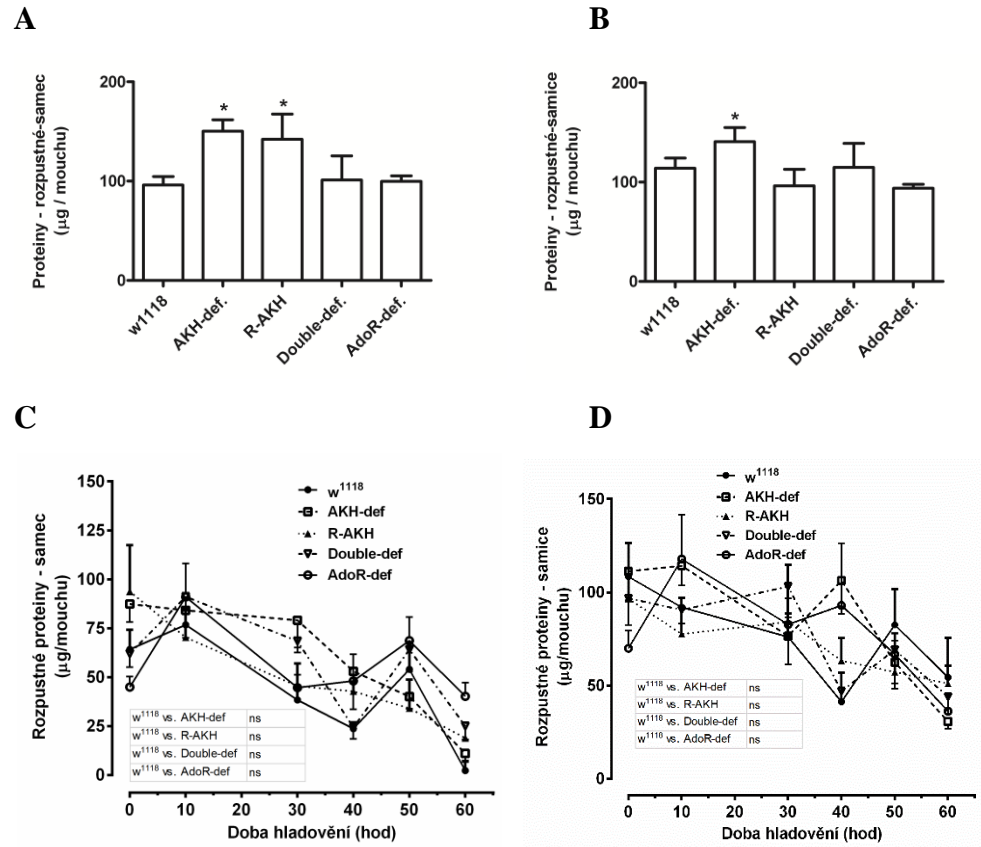
Hladiny rozpustných (Obr. 8) a nerozpustných (Obr. 9) proteinů u dospělců ukázaly tyto rozdíly (Obr. 8). Rozpustné proteiny u samců skupiny AKH-def byly (1,57 krát) i u samic (1,23 krát) vyšší oproti kontrole. A u samců skupiny R-AKH byla hladina (1,48 krát) vyšší. V porovnání s nerozpustnými proteiny (Obr. 9), byla hladiny nejnižší samic (1,52 krát) skupiny R-AKH. A u samců skupiny AKH-def byla hladina (1,48 krát) vyšší oproti kontrole. Nepředpokládá se, že by AKH byly přímo zapojené do metabolismu proteinů, lze si však všimnout, že u skupiny AKH-def u smců i samic je hladina proteinů zvýšena, ale u skupiny R-AKH hladiny kolísají (tj. u samic jsou hladiny vyšší a u samců je to naopak).

4.1.9 Obsah proteinů během hladovění

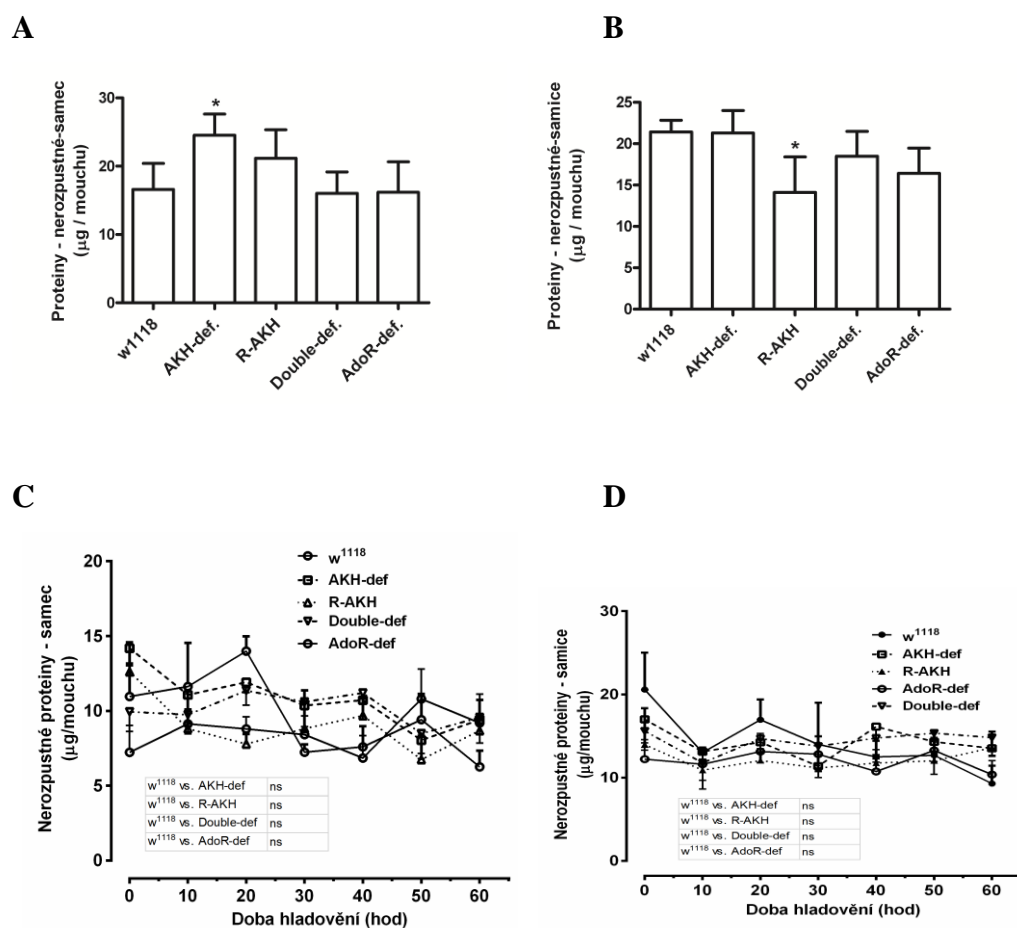
Jako poslední ze série měření obsahů živin během hladovění byl monitorován obsah rozpustných (Obr. 8) a nerozpustných (Obr. 9) bílkovin u imag *D. melanogaster*. Získané výsledky nebyly zcela jednoznačné – hladiny proteinů během sledovaného období kolísaly. Je však zřejmé, že obsahy rozpustných proteinů u samců a samic mají klesající tendenci, oproti tomu hladiny nerozpustných proteinů zůstávaly po celou dobu hladovění na více méně stejné úrovni (Tab. 4). Statistickým porovnáním kontroly w^{1118} s ostatními skupinami much se neprokázaly významnější změny.

Samec	Rozpustné proteiny		Nerozpustné proteiny	
w1118	1,18	↓	1,75	↓
AKH-def	8,00	↓	1,51	↓
R-AKH	4,95	↓	1,45	↓
Double-def	2,47	↓	1,04	↓
AdoR-def	1,12	↓	1,27	↑
Samice	Rozpustné proteiny		Nerozpustné proteiny	
w1118	1,99	↓	2,21	↓
AKH-def	3,63	↓	1,26	↓
R-AKH	1,89	↓	1,26	↓
Double-def	2,20	↓	1,05	↓
AdoR-def	1,93	↓	1,18	↓

Tab. 4. Kolikrát se hladina rozpustných a nerozpustných proteinů u samců a samic snížila (↓) na konci pokusu nebo zvýšila (↑) v porovnání se začátkem.



Obr. 8. Množství rozpustných proteinů (µg/mouche) u různých skupin much **A** – samci, **B** – samice, (průměr ± SD, n= 5). Statisticky významné rozdíly mezi skupinou w¹¹¹⁸ a ostatními skupinami na 5 % hladině významnosti jsou označeny hvězdičkou. **C** – samci během hladovění, **D** – samice během hladovění (průměr ± SD, n= 6). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny prostřednictvím Repeated measures analysis variance (RM ANOVA) testu s Dunnetovým post-testem (*** 0,1% hladina, ** 1% hladina, * 5% hladina, ns – statisticky nevýznamné).



Obr. 9. Množství nerozpustných proteinů ($\mu\text{g} / \text{mouchu}$) u různých skupin much, **A** – samci v čase 0, **B** – samice v čase 0, (průměr \pm SD, $n = 5$). Statisticky významné rozdíly byly vyhodnoceny prostřednictvím jednocestné ANOVA s Dunnetovým post-testem. Statisticky významné rozdíly mezi skupinou w^{1118} a ostatními skupinami na 5 % hladině významnosti jsou označeny hvězdičkou. **C** – samci během hladovění, **D** – samice během hladovění (průměr \pm SD, $n = 6$). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny prostřednictvím Repeated measures analysis variance (RM ANOVA) testu s Dunnetovým post-testem (***) 0,1% hladina, ** 1% hladina, * 5% hladina, ns – statisticky nevýznamné).

4.2 Hladina AKH

Pro stanovení hladin hormonu Drome-AKH (Obr. 10) v CNS much byl použit kompetitivní ELISA test. Na první pohled byly viditelné rozdíly mezi danými skupinami: u jedinců s deficiencí produkce Drome-AKH

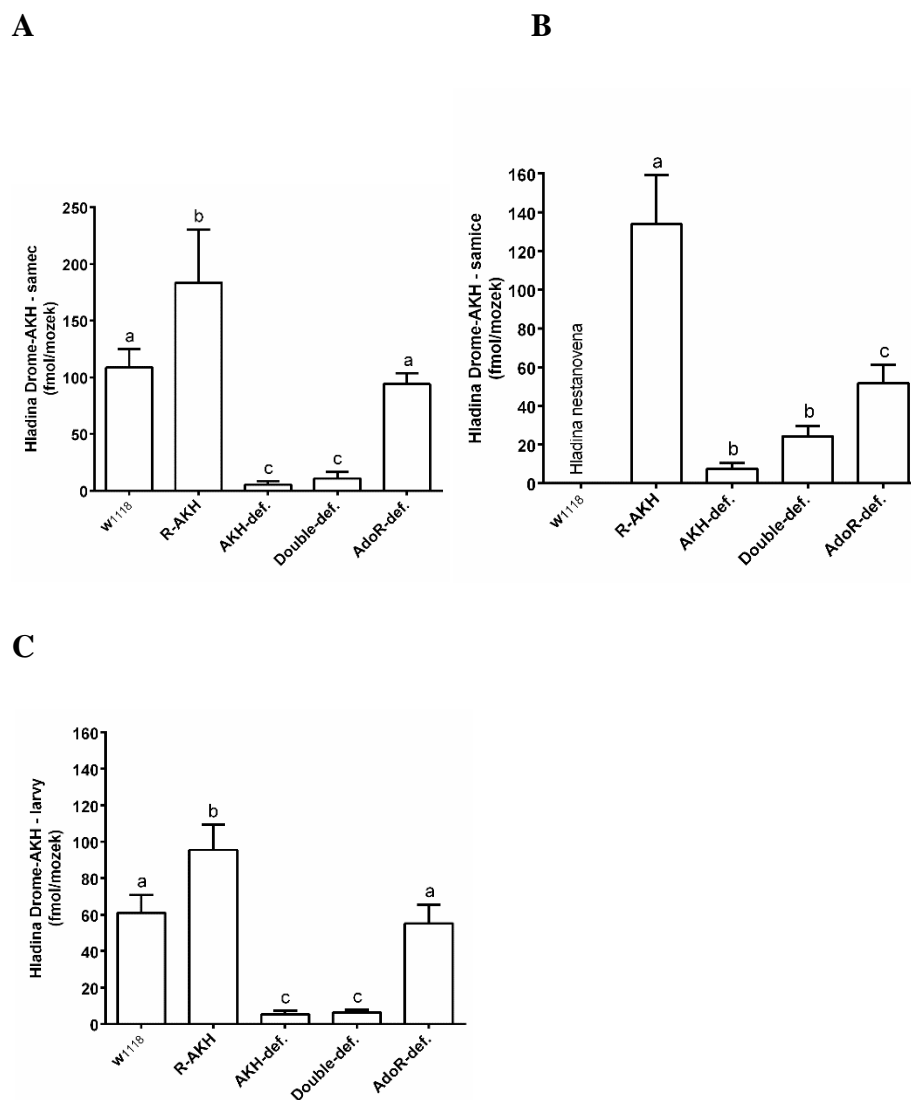
(AKH-def a Double-AKH) byla hladina na hranice citlivosti daného testu nebo i pod ní, takže hodnoty uvedené v grafech jsou pouze teoretické výpočty. Nejvyšší hladiny byly naměřeny u R-AKH u samců, samic tři dny po svléknutí i u larev ve třetím instaru. U samců a larev nebyly mezi skupinou w^{1118} a AdoR-def zaznamenány významnější rozdíly. V tabulce 5 a 6 jsou zaznamenány rozdíly hladin mezi larvami, samci a samicemi.

Larvy vs Samci	Drome-AKH		Larvy vs Samice	Drome-AKH	
w1118	1,78	↓	w1118	-	-
R-AKH	1,92	↓	R-AKH	1,40	↓
AdoR-def	1,71	↓	AdoR-def	1,06	↑

Tab. 5. Kolikrát se hladina snížila (↓) nebo zvýšila (↑) porovnáním larev se samci a samicemi.

Samci vs samice	Drome-AKH	
w1118	-	-
R-AKH	1,37	↓
AdoR-def	1,82	↓

Tab. 6. Kolikrát se hladina snížila (↓) porovnáním samců se samicemi.



Obr. 10. Množství Drome-AKH (fmol / mozek) u různých skupin much **A** – samci, **B** – samice, **C** – larvy (průměr ± SD, n= 8). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí statistického testu jednocestná ANOVA s Tukeyho post testem. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými skupinami na 5 % hladině významnosti jsou označeny různými písmeny.

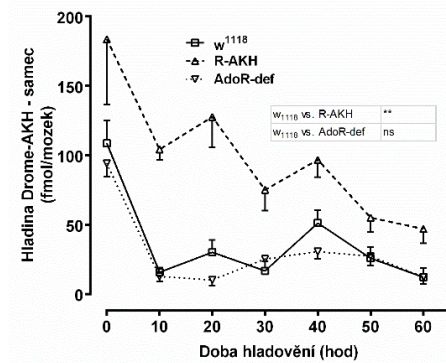
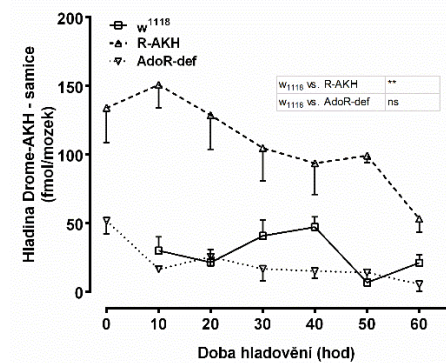
4.2.1 Hladina AKH během hladovění

Pro úplnější obraz metabolických změn během hladovění u daných skupin much byly v další sérii pokusů monitorovány změny hladiny Drome-AKH (Obr. 11) u imag skupin, které produkovaly funkční Drome-AKH, tj. kontrola, AdoR-def a R-AKH . Hladina AKH byla na první

pohled u skupiny R-AKH vyšší než u ostatních skupin (kontrola, AdoR-def) a jak bylo možno očekávat, během hladovění u samců i samic měla klesající tendenci (Tab. 7). Statistické testy prokázaly významný rozdíl mezi kontrolou a skupinou R-AKH.

Samec	Drome-AKH		Samice	Drome-AKH	
w1118	8,96	↓	w1118	-	-
R-AKH	3,91	↓	R-AKH	2,52	↓
AdoR-def	7,65	↓	AdoR-def	9,34	↓

Tab. 7. Kolikrát se hladina u samců a samic snížila (↓) na konci pokusu v porovnání se začátkem.

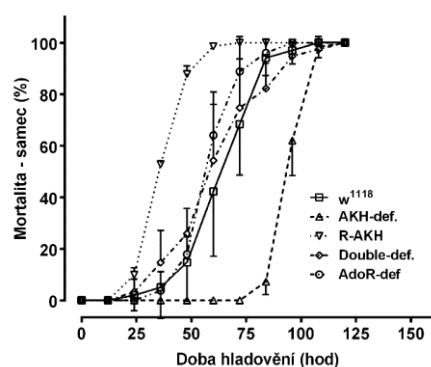
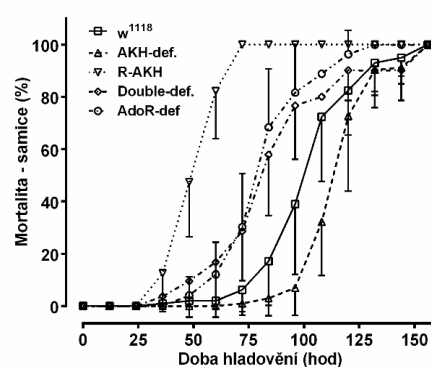
A**B**

Obr. 11. Množství Drome-AKH (fmol / mozek) u různých skupin much **A** – samci, **B** – samice (průměr ± SD, n= 8). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny prostřednictvím Repeated measures analysis variance (RM ANOVA) testu s Dunnetovým post-testem (***) 0,1% hladina, ** 1% hladina, * 5% hladina, ns – statisticky nevýznamné).

4.3 Ostatní charakteristiky

4.3.1 Mortalita během hladovění

V dalších testech byla stanovena mortalita u dospělců během hladovění, kdy bylo v 12 hodinových intervalech monitorováno množství uhynulých much (Obr. 12). Testy ukázaly zajímavé výsledky: u obou pohlaví byly vůči hladovění nejvíce odolné mouchy AKH-def (bez funkčního AKH) a nejcitlivější mouchy R-AKH (s nejvyšší hladinou AKH). Dále se ukázalo, že samice přežívají hladovění déle než samci. Statistické srovnání výsledků je shrnuto v tabulce 8 a 9.

A**B**

Obř. 12. Mnořství mřtvých jedinců (průměr \pm SD, $n = 10$) v průběhu pokusu: **A** – samci, **B** – samice. Statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a ostatními skupinami byly vyhodnoceny pomocí analýzy přeřivání. Ke zjiřtění rozdílu mezi jednotlivými skupinami byl použit Gehan-Wilcoxonův test s Bonferroniho korekcí ($P = 0,013$). Výsledky jednotlivých porovnání jsou zapsány v tabulce 8 a 9, kde $P < 0,013$ je statisticky průkazné.

Porovnání skupin	χ^2	P
w^{1118} x AKH-def	136,90	<0,0001
w^{1118} x R-AKH	115,00	<0,0001
w^{1118} x Double-def	0,15	ns
w^{1118} x AdoR-def	11,69	0,0006

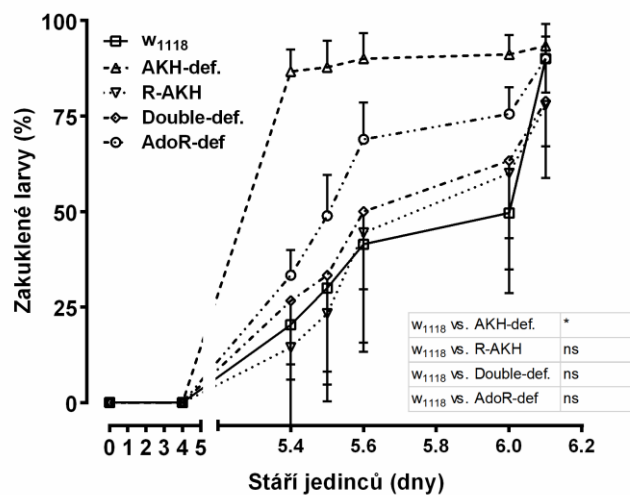
Tab. 8. Výsledky porovnání jednotlivých skupin samic s kontrolní skupinou, kde hladina významnosti P byla upravena dle Bonferroniho korekce ($P = 0,013$).

Porovnání skupin	χ^2	P
w ¹¹¹⁸ x AKH-def	48,29	<0,0001
w ¹¹¹⁸ x R-AKH	235,00	<0,0001
w ¹¹¹⁸ x Double-def	60,58	<0,0001
w ¹¹¹⁸ x AdoR-def	57,33	<0,0001

Tab. 9. Výsledky porovnání jednotlivých skupin samců s kontrolní skupinou, kde hladina významnosti P byla upravena dle Bonferroniho korekce (P = 0,013).

4.3.2 Rychlost vývoje jedinců

Následující pokus ukázal rozdíly v délce vývoje daných skupin od prvního instaru do kukly (Obr. 13). Jeho výsledky naznačily, že u AKH-def larev začalo kuklení statisticky významně dříve než u kontrolní skupiny w¹¹¹⁸.



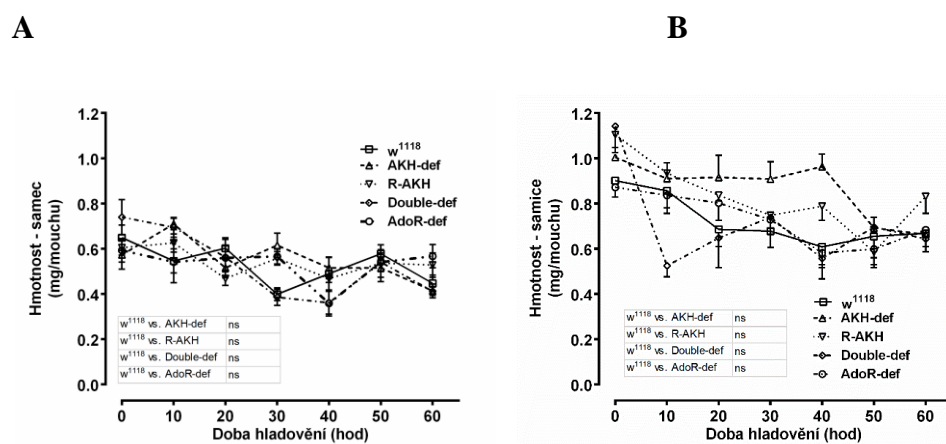
Obr. 13. Vývoj jedinců od prvního instaru v kuklu v čase (průměr ± SD, n= 3). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny prostřednictvím Repeated measures analysis variance (RM ANOVA) testu s Dunnetovým post-testem (*** 0,1% hladina, ** 1% hladina, * 5% hladina, ns – statisticky nevýznamné)

4.3.3 Změny hmotnosti těla během hladovění

Vážením dospělých much během hladovění (Obr. 14) v daných intervalech bylo zjištěno, že rozdíly v jejich hmotnosti nejsou statisticky průkazné, ale při porovnání daných výsledků došlo, ke snížení hmotnosti na konci pokusu (Tab. 10).

Samec	Hmotnost		Samice	Hmotnost	
w1118	1,44	↓	w1118	1,35	↓
AKH-def	1,39	↓	AKH-def	1,52	↓
R-AKH	1,14	↓	R-AKH	1,33	↓
Double-def	1,80	↓	Double-def	1,78	↓
AdoR-def	1,04	↓	AdoR-def	1,28	↓

Tab. 10. Kolikrát se hmotnost u samců a samic snížila (↓) na konci pokusu v porovnání se začátkem.



Obr. 14. Hmotnost much hladovějících v čase u různých skupin much **A** – samci, **B** – samice (průměr ± SD, n= 10). Statisticky významné rozdíly mezi skupinami byly vyhodnoceny prostřednictvím Repeated measures analysis variance (RM ANOVA) testu s Dunnetovým post-testem (*** 0,1% hladina, ** 1% hladina, * 5% hladina, ns – statisticky nevýznamné).

5 Diskuze

Mnoho druhů hmyzu se musí během svého života občas vypořádávat s nedostatkem potravy. V období, kdy je přísun živin omezen, musí žít ze zásob, které si nashromáždili během období hojnosti. Během hladovění se hmyz začne fyziologicky adaptovat na tyto podmínky a jeho metabolismus se přepne do programu pro přežití, který mu pomáhá překonat toto těžké období (Rion a Kawecki 2007). Místem uložení energetických zásob se u hmyzu stal specifický orgán zvaný tukové těleso. Hlavními substráty bohatými na energii se staly triglyceridy a glykogen (zásobní forma glukózy), které jsou dále štěpeny, transportovány a využívány v době, kdy je to potřebné (Attardo a kol. 2005).

Mobilizace těchto zásobních živin je řízena především adipokinetickým hormonem (AKH). Jeho působením na buňky tukového tělesa dochází ke štěpení glykogenu a triglyceridů a uvolňování výsledných metabolitů do hemolymfy – nejčastěji v podobě trehalózy a diglyceridů. U některých druhů hmyzu dochází také k produkci prolinu (Gäde a Auerswald 2002, Gäde a Auerswald 2003, Gäde a kol. 1997), který je pak využíván tkáněmi jako zdroj energie. Abych přispěla k poznatkům o této problematice, použila jsem k pokusům mouchy s poruchou produkce AKH a adenosinového receptoru a pokusila se zjistit jejich zapojení do řízení metabolismu u *D. melanogaster*. Měření triglyceridů (Obr. 2) a diglyceridů (Obr. 3) přineslo zajímavé výsledky. Hladina triglyceridů víceméně odpovídá hladině diglyceridů, což naznačuje jejich přímou souvislost. Lze si všimnout, že hladina obou těchto látek je u R-AKH mutanta značně snížena, což bylo pravděpodobně způsobeno overexpresí genu pro AKH, což zřejmě udržovalo metabolismus na vyšší úrovni a zapříčinilo tak rychlejší spalování tuků. Tuto skutečnost potvrzuje práce (Lee a Park 2004), ve které byla použita podobná moucha s navozenou overexpresí AKH (EE-AKH), u které také docházelo k nadměrné degradaci triglyceridů stejně jako u R-AKH. Situace je však zřejmě komplikovanější, protože u much s ablací neuronů (CD-AKH) produkujících AKH, byla hladina triglyceridů srovnatelná s kontrolou,

ačkoliv se dala očekávat jejich vyšší hladina. Podobné výsledky byly zjištěny v mé práci, protože u AKH-def much, které jsou srovnatelné s CD-AKH mouchou (Leea Park 2004) byla také zjištěna hladina TG a DG na úrovni příslušných kontrol. Je proto pravděpodobné, že hladinu TG a DG hlídá ještě i jiný mechanismus. Skupina AdoR-def, neprokázala jasný vliv na hladinu TG ani DG. U těchto much bylo zaznamenáno statisticky významné navýšení hladiny PL (i když fakticky nepřilíš velké) – PL se nachází především v buněčných membránách (Obr. 4). Hladina PL je u AKH-def srovnatelná s kontrolou, což naznačuje, že nepřítomnost AKH nemá na PL vliv. R-AKH naopak zvyšuje hladinu PL, což je možná dáno kompenzací hladiny TG. Nesmíme zapomenout, že měření DG, TG a PL bylo prováděno pouze na samcích.

Tukové těleso u *D. melanogaster* obsahuje velké množství lipidů, které jsou rapidně spotřebovávány během hladovění – o detailech zapojení AKH však není mnoho údajů (Zink a kol. 1999), je to zřejmě tím, že *Drosophila* je na pokusy používající přímou aplikaci externího AKH poněkud malá. Nicméně vliv AKH na metabolismus lipidů byl prokázán u značného počtu hmyzu jako je saranče stěhovavé (*Locusta moratoria*; Goldsworthy 1983), ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) (Kodrík a kol. 2000, 2002) a u dalších druhů hmyzu. Hladiny lipidů u intaktních i hladovějících much (Obr. 5) více méně odpovídaly očekávaným výsledkům. Hladina lipidů u R-AKH byla snižena, a u AKH-def naopak zvýšená, což potvrzuje přímé zapojení AKH do metabolismu lipidů u *Drosophila*. Hladiny lipidů u ostatních much včetně AdoR-def se pohybují mezi těmito dvěma skupinami, což potvrzuje fakt, že účinek adenosinu na metabolismus lipidů není zcela jasný.

Hladiny glykogenu (Obr. 6) víceméně odpovídaly hladinám lipidů. Avšak tyto rozdíly, zjištěné na začátku hladovění se stíraly a během sledovaného období docházelo k setrvalému poklesu hladiny glykogenu u všech použitých skupin much. To ukazuje na jejich význam v energetickém krytí požadavků v organismu během hladovění bez ohledu na hormonální pozadí. Je zajímavé, že hladina glykogenu byla u samců

znatelně nižší než u samic. To jistě souvisí s přípravou samic na vitellogenézu a produkci vajíček.

Hladina celkových glycidů byla na začátku pokusu nižší u skupiny R-AKH a to u samců i samic, což pravděpodobně souvisí se zvýšeným metabolismem glycidů vlivem zvýšené hladiny AKH (Obr. 7). Během hladovění kolísala hladina glycidů v závislosti na spotřebě zásobních živin a také v závislosti na potřebě udržet hladinu krevním cukrů (cukrů cirkulujících v hemolymfě), i když je všeobecně známo, že hmyz dokáže tolerovat i velké výkyvy hladin cukrů v hemolymfě a nemá tak sofistikované řízení jejich hladiny, jako je tomu např. u savců. U *Bombyx mori* a *Manduca sexta* bylo prokázáno prudké snížení koncentrace glukózy v hemolymfě již pár hodin od začátku hladovění (Dahlman 1973, Thompson, 2000). Tento podobný jev (Obr 7) lze vidět u hladiny celkových cukrů u samic, kdy došlo k prudkému snížení hladiny glycidů do 10 hodin. U samců došlo také k poklesu hladiny, ale ne tak prudkému. Poté opět došlo ke zvýšení hladiny celkových glycidů. Podobný jev byl zaznamenán u hladiny celkových glycidů v posledním larválním stádiu *M. sexta* (Gies a kol. 1988).

V metabolismu bílkovin se nepředpokládá, že by AKH hrál u *D. melanogaster* významnější roli. Během hladovění nebyly zjištěny žádné překvapivé výsledky (Obr. 8, 9). Došlo ke snížení hladiny rozpustných proteinů (nacházejících se, především, v hemolymfě) během sledovaného období, zatímco u nerozpustných bílkovin se jejich hladiny měnila jen málo. Celkový obsah bílkovin byl u samic vyšší než u samců. Vliv AKH na metabolismus bílkovin byl prokázán jen u některých zástupců hmyzu jako je např. moucha *Glossina morsitans*. U některých brouků a zástupců dvoukřídlého hmyzu bylo prokázáno, že prolin je jejich hlavním energetickým substrátem (Gäde a Auerswald 2002).

Uvolňování AKH je u organismu závislé na potřebě energie. Drome-AKH je syntetizován a skladován v buňkách corpora cardiaca. Po uvolnění do hemolymfy je transportován do cílové tkáně, kde se váže na G-protein receptor (GPCR) označovaný jako AKHR. To vyvolá vnitrobuněčnou

signální kaskádu, která aktivuje příslušné enzymy a zajistí uvolnění cukrů (trehalózy a glukózy) a lipidů ve formě DG z tukového tělesa do hemolymfy (Gäde a Auerswald 2003; Lorenz a Gäde 2009). Měřením hladin Drome-AKH (Obr. 10) bylo zjištěno, že u skupiny AKH-def a Double-def, nedošlo k detekci hormonu Drome-AKH a to ani u dospělců a ani u larev. Jinak řečeno tyto mouchy produkovaly pouze nefunkční AKH. Ten nereaguje s použitou polyklonální protilátkou, která rozeznává pouze kompletní molekulu Drome-AKH (Zemanová a kol. 2016). Měření dále přineslo očekávané výsledky – hladina Drome-AKH byla navýšena u R-AKH much s nadměrnou produkcí hormonu AKH (Sajwan a kol. 2015), hladina AKH u AdoR-def much byla srovnatelná s kontrolou. Hladiny Drome-AKH během hladovění (Obr. 11) byly sledovány pouze u skupin s normální produkcí Drome-AKH. Tyto hladiny během sledovaného období klesaly, což lze zřejmě vysvětlit poklesem celkových živin v těle pokusných much, snižováním jejich metabolismu a jejich celkovým vyčerpáním. Předpokládá se, že exprese AKH je citlivá na koncentrace cukrů v hemolymfě. Dále je známo, že výší-li se vnitrobuněčná hladina vápníku, dojde k následnému uvolnění hormonu (Kim a Rulifson 2004, Braco a kol. 2012). Toto tvrzení však nemůžeme potvrdit ani vyvrátit.

Dle výsledků vývoje jedinců od prvního larválního instaru (Obr. 13), došlo u AKH-def mouchy k dřívějšímu zakuklení oproti ostatním skupinám. Opačný jev ve vývoji jedinců u R-AKH, kdy by docházelo ke zpomalení vývoje, nebyl pozorován. Při nedostatku dalších dat lze jen těžko této fenomém vysvětlit. Bude však asi souviset s celkovým ovlivněním metabolismu, schopností akumulovat a štěpit živiny a dalšími metabolickými aspekty. Zajímavý vliv může mít i fakt, že u AKH deficientní mouchy dochází k obezitě, aniž by se moucha přejídala (Gáliková a kol. 2017).

Jako další aspekt vlivu AKH na metabolismus byl zkoumán rozdíl mezi dobou přežití jednotlivých mutantů (Obr. 12). U *D. melanogaster* se předpokládá, že ztrátou AKH, dochází k prodloužení přežití (Kim

a Rulifson 2004, Isabel a kol. 2005). Výsledky daného pokusu nám jasně ukázaly, že AKH-def mutant přežívá déle. U samců je rozdíl znatelnější oproti samicím. Naopak u skupiny R-AKH došlo k relativně brzkému uhynutí u samic i samců, což potvrzuje práce (Sajwan a kol. 2015). Toto zjištění přináší důkaz o tom, že AKH má vliv na délku přežívání. U samců si můžeme všimnout, že mezi w^{1118} a skupinou Double-def a Ador-def není rozdíl (výsledky této práce; Zemanová a kol. 2016). Tento fenomén je z evolučního hlediska zvláštní, nicméně z hlediska hormonálního řízení metabolismu není až tak překvapivý. Jedinci bez AKH mají zřejmě problémy rychle mobilizovat v případě potřeby energetické zdroje, které jsou tak ve větší míře uchovávány v zásobě a v době hladovění pak déle vydrží. Můžeme jen spekulovat, že tato strategie nebyla dlouhodobě výhodná.

U Double-def. mutanta, který má mutaci jak v genu pro adenosin, tak v produkci deficientního Drome-AKH, není zcela jasné, proč daná skupina přežívala stejně dlouho jako kontrolní skupin. Mohlo by to být zapříčiněné složitým genetickým pozadím této mouchy a kompenzačními mechanismy. Zuberova a kol. (2010) předpokládala, že u AdoR-def skupin by mohl adenosinový receptor plnit stejnou funkci jako receptor pro AKH, při mobilizaci glycidů z tukového tělesa. Práce Zemanové a kol. (2016) i výsledky této studie však ukázaly, že AKH a adenosinová signalizace fungují s velkou pravděpodobností nezávisle na sobě. U samic skupiny AdoR-def a Double-def můžeme pozorovat, že doba přežití se liší, v porovnání s kontrolou. Také toto zjištění nelze jednoznačně vysvětlit. Porovnáním hmotností much během hladovění (Obr. 14) nebyly prokázány jasné rozdíly mezi skupinami. To naznačuje komplikované vztahy v intermediárním metabolismu a pravděpodobnost využívání alternativních drah s různými kontrolními mechanismy.

Výsledky měření této práce poukazují na možné účinky AKH a adenosinu u much *D. melanogaster*, které měly navozeny mutace v AKH a adenosinovém receptoru. Byl zaznamenán vliv AKH na metabolismus zásobních živin a cukrů vliv na vývoj jedince, délku přežití a produkci

Drome-AKH, vliv adenosinu nebyl jednoznačně stanoven. Interakce mezi AKH a adenosinovým receptorem nebyla prokázána.

6 Závěr:

- AKH je zapojeno do metabolismu zásobních živin během hladovění.
- Hladina Drome-AKH u skupiny R-AKH je zvýšená, u AKH-def a Double-def klesá pod detekční citlivost stanovení.
- Absencí funkčního AKH (AKH-def) dochází k prodloužení života, nadprodukcí AKH (R-AKH) dochází k opačnému efektu.
- AKH může mít vliv na vývoj jedince.
- Zapojení adenosinu do signalizace AKH nebylo prokázáno.

7 Seznam citované literatury

- Arrese EL, Flowers MT, Gazard JL, Wells MA. 1999: Calcium and cAMP are second messengers in the adipokinetic hormone-induced lipolysis of triacylglycerols in *Manduca sexta* fat body. *Journal of Lipid Research* 40 (3), 556–564
- Arrese EL, Soulages JL 2010: Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology* 55, 207–225
- Attardo GM, Hansen IA, Raikhel AS 2005: Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Bio-chemistry and Molecular Biology* 35 (7), 661–675
- Auerswald L, Gäde G 1999: Effects of metabolic neuropeptides from insect corpora cardiaca on proline metabolism of the *African fruit bee-tle*, *Pachnoda sinuata*. *Journal of Insect Physiology* 45 (6), 535–543
- Azeez OI, Meintjes R, Chamunorwa JP 2014: Fat body, fat pad and adipose tissue in invertebrates and vertebrates: the nexus. *Lipids in Health and Disease* 71, 1–13
- Bednářová A, Kodrík D, Krishnan N 2013: Adipokinetic hormone exerts its anti-oxidative effects using a conserved signal-transduction mechanism involving both PKC and cAMP by mobilizing extra- and in-tracellular Ca^{2+} stores. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology* 158 (3), 142–149
- Beenackers AM Th, Van der Horst DJ, Van Marrewijk WJA 1984: Insect flight metabolism. *Insect Biochemistry* 14 (3), 243–260

- Bouret S, Levin BE, Ozanne SE 2015: Gene-environment interactions controlling energy and glucose homeostasis and the developmental origins of obesity. *Physiological Reviews*.95 (1), 47–82
- Braco JT, Gillespie EL, Alberto GE, Brenman JE, Johnson EC 2012: Energy-dependent modulation of glucagon-like signaling in *Drosophila* via the AMP-activated protein kinase. *Genetics* 192 (2), 457–466
- Carlisle JA, Loughton BG 1979: Adipokinetic hormone inhibits protein synthesis in *Locusta*. *Nature* 282, 420–421
- Carol NV, Longley RW, Roe JH 1956: The determination of glycogen in liver and muscles by use of anthron reagent. *Journal of Biological Chemistry* 220 (2), 583–586
- Chapman RF 1998: *The Insects, Structure and Function*, fourth ed. Cambridge University Press, Cambridge
- Cortés D, Guinzberg R, Villalobos-Molina R, Piña E 2009: Evidence that endogenous inosine and adenosine-mediated hyperglycaemia during ischaemia-reperfusion through A3 adenosine receptors. *Autonomic and Autocoid Pharmacology* 29 (4), 157–164
- Cunha RA 2001: Adenosine as a neuromodulator and as a homeostatic regulator in the nervous system: Different roles, different sources and different receptors. *Neurochemistry International* 38 (2), 107–125
- Dahlman DL 1973: Starvation of the *tobacco Hornworm, Manduca sexta*.
1. Changes in Hemolymph Characteristics of 5th-Stage Larvae. *Annals of the Entomological Society of America* 66 (5), 1023–1029

- Dolezalova E, Nothacker H-P, Civelli O, Bryant PJ, Zurovec M 2007: *A Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37 (4), 318–329
- Dunn, O. J. 1961. Multiple comparisons among means. *Journal of the American Statistical Association* 56, 52–64.
- Ferreira, JM, Paes-de-Carvalho R 2001: Long-term activation of adenosine A(2a) receptors blocks glutamate excitotoxicity in cultures of avian retinal neurons. *Brain research* 900 (2), 169–176
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH 1957: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509
- Fredholm BB 2010: Adenosine receptors as drug targets. *Experimental Cell Research* 316 (8), 1284–1288
- Fredholm BB, Bättig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau EE (1999): Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews* 51(1), 83–133
- Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Linden J, Müller CE 2011: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors — An update. *Pharmacological Reviews* 63 (1), 1–34
- Gäde G 1996: The revolution in insect neuropeptides illustrated by the adipokinetic hormone/redpigment-concentrating hormone family of peptides. *Zeitschrift für Naturforschung* 51 (9–10), 607–617

- Gäde G 2009: Peptides of the adipocinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family: a new take on biodiversity. *Annals of the New York Academy of Science*, 1163, 125–13
- Gäde G, Auerswald L 2002: Beetles' choice – proline for energy output: control by AKHs. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 132 (1), 117–129
- Gäde G, Auerswald L 2003: Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *General and Comparative Endocrinology* 132 (1), 10–20
- Gäde G, Goldsworthy GJ 2003: Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. *Pest Management Science* 59 (10), 1063–1075
- Gäde G, Hoffmann KH, Spring JH 1997: Hormonal regulation in insect: facts, gaps and future directions. *Physiological Reviews* 77 (4), 963–1032
- Gäde G, Marco HG 2013: *Handbook of Biologically Active Peptides* (Second Edition), Chapter 28 – AKH/RPCH Peptides, 185–190
- Gäde G, Šimek P, Marco HG 2015: Two novel tyrosine-containing peptides (Tyr(4)) of the adipokinetic hormone family in beetles of the families *Coccinellidae* and *Silphidae*. *Amino Acids* 47, 2323–2333

- Gáliková M, Klepsatel P, Xu Y, Kühnlein RP 2017: The obesity-related Adipokinetic hormone controls feeding expression of neuropeptide regulators of *Drosophila* metabolism. *European Journal of Lipid Science and Technology* 119, 1–1
- Gan SD, Patel KR 2013: Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology* 133(9), 1–3
- Gies A, Fromm T, Ziegler R 1988: Energy metabolism in starving larvae of *Manduca sexta*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*. 91(A), 549–555
- Gokuldas M, Hunt PA a Candy DJ 1988: The inhibition of lipid synthesis in vitro in the locust, *Schistocerca gregaria*, by factors from corpora cardiaca. *Physiological Entomology* 13 (1), 43–48
- Goldsworthy GJ 1983: The Endocrine Control of Flight Metabolism in *Locusts*. *Advances in Physiology* 17, 149–204
- Goldsworthy G, Chandrakant S, Opoku-Ware K 2003: Adipokinetic hormone enhances nodule formation and phenoloxidase activation in adult locusts injected with bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Insect Physiology* 49 (8), 795–803
- Goldsworthy GJ, Opoku-Ware K a Mullen LM 2002: Adipokinetic hormone enhances laminarin and bacterial lipopolysaccharide-induced activation of the prophenoloxidase cascade in the *African migratory locust*, *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology* 48 (6), 601–608

- Hasko G, Deitch EA, Szabó C, Nemeth ZH Vizi ES 2002: Adenosine: a potential mediator of immunosuppression in multiple organ failure. *Current Opinion in Pharmacology* 2 (4), 440–444
- Hudson JW, Golding GB, Crerar MM 1993: Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase. *Journal of Molecular Biology* 234 (3), 700–721
- Husain K Somani SM 2005: Interaction of exercise and adenosine receptor agonist and antagonist on rat heart antioxidant defense system. *Molecular and Cellular Biochemistry* 270 (1–2), 209–214
- Isabel G, Martin JR, Chidami S, Veenstra JA, Rosay P 2005: AKH-producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioral changes in *Drosophila*. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 228 (2), 531–538
- Jacobson KA, Gao ZG 2006: Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nature Review Drug Discovery*. 5 (3), 247-264
- Jacobson KA a Gao ZG 2009: Adenosine. In: *Intercellular communication in the nervous system* (Ed: Malenka RC), Elsevier, Boston, MA. 627–638
- Jones BJ, Tan T, Bloom SR 2012: Minireview: Glucagon in stress and energy homeostasis. *Endocrinology* 153 (3), 1049–1054
- Kim SK, Rulifson EJ 2004: Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila* corpora cardiaca cells. *Nature*. 431, 316–320

- King RC, Aggarwal SK, Bodenstein D 1996: The comparative submicroscopic morphology of the ring gland of *Drosophila melanogaster* during the second and third larval instars. *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie* 73 (2), 272–285
- Knight JA, Anderson S, Rawle JM 1972: Chemical Basis of the Sulfophospho-vanillin reaction for estimating total serum lipids. *Clinical Chemistry*, 18 (3), 199–202
- Kodrík D 2008: Adipokinetic hormone function that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology* 33 (3), 171–180
- Kodrík D, Bednářová A, Zemanová M, Krishnan N 2015: Hormonal Regulation of Response to Oxidative Stress in Insects – An Update. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (10), 25788–25811
- Kodrík D a Goldsworthy GJ 1995: Inhibition of RNA synthesis by Adipokinetic Hormones and Brain Factor(s) in Adult Fat body of *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology* 41 (2), 127–133
- Kodrík D, Krishnan N a Habušťová O 2007: Is the titer of adipokinetic peptides in *Leptinotarsa decemlineata* fed on genetically modified potatoes increased by oxidative stress? *Peptides* 28 (5), 974–980
- Kodrík D, Marco HG, Šimek P, Socha R, Štys P, Gäde G 2010: The adipokinetic hormones of Heteroptera: A comparative study. *Physiological Entomology* 35 (2), 117–127
- Kodrík D, Socha R, Šimek P, Zemek R, Goldsworthy GJ 2000: A new member of the AKH/RPCH family that stimulates locomotory activity in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30 (6), 489–498

- Kodřík D, Socha R, Zemek R 2002: Topical application of *Pyra*-AKH stimulates lipid mobilization and locomotion in the flightless, bug *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Physiological Entomology* 27 (1), 15–20
- Kodřík D, Stašková T, Jedličková V, Weyda F, Závodská R, Pflegerová J 2015: Molecular characterization, tissue distribution, and ultrastructural localization of adipokinetic hormones in the CNS of the firebug *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Insecta). *General and Comparative Endocrinology* 210, 1–11
- Košťál V, Šimek P 1998: Changes in fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerols after cold-acclimation of an aestivating insect prepupa. *Journal of Comparative Physiology B* 168, 453–460.
- Krishnan N, Kodřík D 2012: Endocrine control of oxidative stress in insect. *Oxidative Stress in Vertebrates and Invertebrates: Molecular Aspects of Cell Signaling* (eds Farooqui AA), 261–270
- Kucerova L, Broz V, Fleischmannova J, Santruckova E, Sidorov R, Dolezal V, Zurovec M 2012: Characterization of the *Drosophila* adenosine receptor: the effect of adenosine analogs on cAMP signaling in *Drosophila* cells and their utility for *in vivo* experiments. *Journal of Neurochemistry* 121, 383–395
- Laurentin A, Edwards CA 2003: A microtiter modification of the anthrone–sulfuric acid colometric assay for glucose–based carbohydrates. *Analytical Biochemistry* 315 (1), 143–145

- Lee G, Park JH 2004: Hemolymph sugar homeostasis and starvation induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167 (1), 311–323
- Lepš J, Šmilauer P 2000: Mnohorozměrná analýza ekologických dat. České Budějovice. Biologická fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. 102p
- Lindemans M, Janssen T, Beets I, Temmerman, L, Meelkop E, Schoofs L 2011: Gonadotropin-releasing hormone and adipokinetic hormone signaling systems share a common evolutionary origin. *Frontiers in Endocrinology (Lausanne)* 2, 16
- Lorenz MW 2003: Adipokinetic hormone inhibits the formation of energy stores and egg production in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 136 (2), 197–206
- Lorenz MW, Gäde G 2009: Hormonal regulation of energy metabolism in insects as a driving force for performance. *Integrative and Comparative Biology* 49 (4), 380–392.
- Maggirwar SB, Dhanraj DN, Somani SM, Ramkumar V 1994: Adenosine acts as an endogenous aktivátor of the cellular antioxidant defense systém. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 201 (2), 508–515
- Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M 2009: Nucleoside transporter proteins. *Current Vascular Pharmacology* 7 (4), 426–434
- Nässel DR, Winther AME 2010: *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in Neurobiology* 92 (1), 42–104

- Noyes BE, Katz FN, Schaffer MH 1995: Identification and expression of the *Drosophila* adipokinetic hormone gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* 109 (2), 133–141
- Nyce JW 1999: Insight into adenosine receptor function using antisense and gene-knockout approaches. *Trends in Pharmacological Science* 20 (2), 79–
- Ohtsu T, Kimura MT a Hori SH 1992: Energy storage during reproductive diapause in the *Drosophila melanogaster* species group. *Journal of Comparative Physiology* 162 (3), 203–208
- O' Shea M, Witten J a Schaffer M 1984: Isolation and characterization of two myoactive neuropeptides: further evidence for an invertebrate peptide family. *Journal of Neuroscience* 4 (2), 521–529
- Park Y, Kym Y-J, Adams ME 2002: Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proceedings of the National Academy of the United States of America* 99 (17), 11423–11428
- Passier PC, Vullings HG, Diederer JH, Vander Horst DJ 1997: Trehalose inhibits the release of adipokinetic hormones from the corpus cardiacum in the African migratory locust, *Locusta migratoria* , at the level of the adipokinetic cells. *Journal of Endocrinology*. 153 (2), 299–305

- Pener Ayali A, Golenser E 1997: Adipokinetic Hormone and Flight Fuel Related Characteristics of Density-Dependent *Locust* Phase Polymorphism: A Review. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 117 (4), 513–524
- Rion S, Kawecki TJ 2007: Evolutionary biology of starvation resistance: what we have learned from *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology* 20 (5), 1655–1664
- Rose JB, Coe IR 2008: Physiology of nukleoside transporters: back to the future. *Physiology* 23, 41–48
- Sajwan S, Sidorov R, Stašková T, Žaloudíková A, Takasu Y, Kodrík D, Žurovec M 2015: Targeted mutagenesis and functional analysis of adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 6: 79–86
- Satake S, Kawabe Y, Mizoguchi A 2000: Carbohydrate metabolism during starvation in the silkworm *Bombyx mori*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 44 (2), 90–98
- Scaraffia PY, Wells MA 2003: Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. *Journal of Insect Physiology* 49 (6), 591–601
- Scarborough RM, Jamieson GC, Kalisz F, Kramer SJ, McEnroe GA, Miller CA, Scooley DA 1984: Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 81 (17), 5575–5579

- Schaffer MH, Noyes BE, Slaughter CA, Thorne GC, Gaskell SJ 1990: The fruitfly *Drosophila melanogaster* contains a novel charged adipokinetic-hormone-family peptide. *Biochemical Journal* 269 (2), 315–320
- Sebastiao AM, Ribeiro JA 2000: Fine-tuning neuromodulation by adenosine. *Trends in Pharmacological Sciences* 21 (1), 341–346
- Seifter S, Dayton S, Novic B a Muntwiler E 1950: The Estimation of glycogen with the anthrone reagent. *Archives of biochemistry and biophysics* 25 (1), 191–200
- Schneedorferová I, Tomčala A, Valterová I 2015: Effect of heat treatment on the n-3/n-6 ratio and content of polyunsaturated fatty acids in fish tissues. *Food Chemistry* 176, 205–211
- Socha R, Kodrík D a Zemek R 1999: Adipokinetic Hormone Stimulates Insect Locomotor Activity. *Naturwissenschaften* 86 (2), 85–86
- Sousa T, Pinho D, Morato M, Marques-Lopes J, Fernandes E, Afonso J, Oliveira S, Carvalho F, Albino-Teixeira A 2008: Role of superoxide and hydrogen peroxide in hypertension induced by an antagonist of adenosine receptors. *European Journal of Pharmacology* 588 (2–3), 267–276
- Spencer IM a Candy DJ 1976: Hormonal control of diacyl glycerol mobilization from fat body of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry* 6 (3), 289–296
- Stoscheck CM 1990: Quantitation of proteins. In. *Methods in Enzymology* 182, 50–68

- Thompson SN 2000: Pyruvate cycling and implications for regulation of gluconeogenesis in the insect, *Manduca sexta* L. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 274 (3), 787–793
- Van Der Horst DJ, Van Marrewijk WA, Diederens JHB 2001: Adipokinetic hormones of insect: release, signal transduction, and responses. *International Review of Cytology* 211, 179–240
- Van Marrewijk WJA, Van Den Broek ATM a Beenackers AMT 1980: Regulation of glycogenolysis in the locust fat body during flight. *Insect Biochemistry* 10 (6), 675–679
- Velasco BD, Shen J, Go S, Hartenstein V 2004: Embryonic development of the *Drosophila* corpus cardiacum, a neuroendocrine gland with similarity to the vertebrate pituitary, is controlled by sine oculis and glass. *Developmental Biology* 274 (2), 280–294 (*Obrázek*)
- Vroemen SF, Van der Horst DJ, Van Marrewijk WJA 1998: New insights into adipokinetic hormone signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 141 (1–2), 7–12
- Vroemen SF, Van Marrewijk WJ, De Meijer J Van Broek AT, Van der Horst DJ 1997: Differential induction of inositol phosphate metabolism by three adipokinetic hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology* 130 (1–2), 131–139
- Zemanová M, Stašková T, Kodrík D 2016: Role of adipokinetic hormone and adenosine in the anti-stress response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 91-92, 39-47

Zinke I, Kirchner C, Chao LC, Tetzla MT, Pankratz MJ 1999: Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of pumpless, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system. *Development*. 126 (23), 5275–5284

Zöllner N, Kirsch K 1962: Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfo-phosphovanillin-Reaktion. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin* 135, 545–561

Zuberova M, Fenckova M, Simek P, Janeckova L, Dolezal T 2010: Increased extracellular adenosine in *Drosophila* that are deficient in adenosine deaminase activates a release of energy stores leading to wasting and death. *Disease Models and Mechanisms*. 3 (11–12), 773–78

8 Příloha

8.1 Příprava roztoků

Tris-HCl pufr, pH 7,8,

- Kvantitativně připravit 1 litr roztoku, upravit pH s HCl (rozpuštědlo destilovaná voda).
- 0,1 M Tris-HCl pH 7,8 = 1, 211g; 0,2 M Tris-HCl pH 7,8 = 2,422g

Anthronové činidlo

- Kvantitativně připravit roztok anthronu v 100 ml 72% H₂SO₄.
- 150 mg anthronu, 72% H₂SO₄

Fosfovanilínové činidlo

- Kvantitativně připravit 1 l roztoku fosfovanilínového činidla.
- 1,98 g vanilinu, H₃PO₄, destilovaná voda

Metoda přípravy fosfovanilínového činidla

Rozpustit 1,98 g vanilinu v 668 ml kyseliny fosforečné (H₃PO₄), zahřát roztok na 60 °C a poté ochladit a doplnit destilovanou vodou na 1 l. Vytvoří se žlutý roztok, který se nechá stát v temnu a chladnu alespoň 1 týden.

Agaróza

- Kvantitativně připravit 100 ml 0,5% agarózy
- 0,5 g agarózy, destilovaná voda, 10 % methylparaben

Metoda přípravy 0,5% agarózy

Smíchat 0,5 g agarózy v 100 ml destilované vody a následně uvařit v mikrovlnné troubě. Poté směs ochladit za stálého míchání a přidat 2 ml konzervačního prostředku 10% methylparaben.

Methylparaben

- Kvantitativně připravit 9 ml 10% methylparabenu v čistém etanolu
- 1g methylparabenu rozpustit v 9 ml etanolu

Speciální potrava s pomerančovým džusem

- Kvantitativně připravit 100 ml speciální potravy s džusem
- 5 g agaru, 100 ml destilované vody, 3,3 g cukru, 33 ml pomerančového džusu, 10%

Metoda přípravy speciální potrava s pomerančovým džusem.

Smíchat 5 g agaru se 100 ml destilované vody, 3,3 g cukru, 33 ml pomerančového džusu a následně směs uvařit v mikrovlnné troubě. Poté směs ochladit za stálého míchání a přidat konzervační prostředek 2 ml 10% methylparabenu. Připravená rozlít do plastových Petriho misek a nechat ztuhnout.

Coating buffer

- Kvantitativně připravit 300 ml Coating bufferu
- 1,272 g Na_2CO_3 , 1,512 g NaHCO_3 , destilovaná voda

Metoda přípravy coating bufferu

Rozpustit Na_2CO_3 , NaHCO_3 v 280ml destilované vody, upravit pH na 9,6 a doplnit vodu do 300 ml

Washing buffer (koncentrovaný zásobní roztok; 10x WB)

- Kvantitativně připravit 500 ml zásobního roztoku 10x WB
- 43,82g NaCl , 2,08g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,74g Na_2HPO_4 , destilovaná voda

Metoda přípravy 10x WB

Rozpustit 43,82g NaCl , 2,08g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 0,74g Na_2HPO_4 v 380 ml destilované vody, upravit pH na 7,5 a poté doplnit destilovanou vodu do 500 ml

Washing buffer (WB⁺)

- Kvantitativně připravit 500 ml WB⁺
- 10x zásobní roztok (WB), destilovaná voda, (TWEEN = washing detergent)

Metoda přípravy (WB⁺)

Rozředit 10x zásobní roztok (WB). Pro přípravu 500 ml se přidá 50 ml (WB) do 450 ml vody a poté se přidá 500 μ l Tween (TWEEN = washing detergent)

Washing buffer (WB⁻)

- Kvantitativně připravit 500 ml WB⁻
- 10x zásobní roztok (WB), destilovaná voda

Rozředit 10x zásobní roztok (WB). Pro přípravu 500 ml se přidá 50 ml (WB) do 450 ml vody.

Blocking buffer – BSA (bovine serum albumin, fraction V.)

- Kvantitativně připravit 3% BSA
- BSA (bovine serum albumin, fraction V.), destilovaná voda

Metoda přípravy 3% BSA

3g BSA rozpustit v 100 ml destilované vody