

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Úloha adipokinetického hormonu
u octomilky obecné
Drosophila melanogaster

Bakalářská práce

Michaela Mochanová

Školitel: Prof. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.

České Budějovice 2015

Mochanová, M., 2015: Úloha adipokinetického hormonu u octomilky obecné *Drosophila melanogaster* [Role adipokinetic hormone in fruit fly *Drosophila melanogaster*.

Bc. Thesis, in Czech] Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 31 pp

Annotation

The aim of the thesis was evaluation of the adipokinetic hormone (AKH) effect on the fruit flies *Drosophila melanogaster* with AKH production deficiency, and adenosine receptor dysfunction. A nutrition level was measured in those flies to evaluate involvement of AKH and adenosine into the metabolic pathways. Results revealed that application of external Drome-AKH significantly increased the free glycidic level in the fly bodies. On the other hand only limited effect of hormonal treatment on other nutrients (lipids, proteins) was recorded. The role of adenosine was unclear, but its involvement cannot be excluded.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské 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, 24. 4. 2015

.....

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli Daliboru Kodříkovi za odborné vedení při práci, cenné rady a ochotu. Také bych chtěla poděkovat Aničce Žaloudkové za poskytování materiálu pro práci, Helence Štěrbové za trpělivost, její optimismus a velikou snahu pomoci, Miladě Zemanů, Martině Franků za podporu, dále pak mé rodině, která mně vždy dodávala odvahu a věřila mi.

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

1	ÚVOD.....	1
1.1	Obecná charakteristika adipokinetických hormonů.....	1
1.1.1	Endokrinní soustava hmyzu.....	1
1.1.2	Místo syntézy AKH.....	1
1.1.3	Mechanismus působení hormonů.....	2
1.1.4	Funkce AKH.....	3
1.2	Adenosin.....	4
1.2.1	Obecná charakteristika a základní funkce adenosinu.....	4
1.2.2	Tvorba a řízení hladiny adenosinu.....	4
1.2.3	Adenosinové receptory.....	6
1.3	Zapojení AKH a adenosinu do metabolismu glycidů.....	7
2	CÍLE PRÁCE.....	8
3	MATERIÁL A METODIKA.....	9
3.1	Studovaný modelový organizmus.....	9
3.2	Příprava vzorků pro měření živin.....	10
3.3	Aplikace roztoku hormonu Drome-AKH.....	10
3.4	Extrakce živin.....	10
3.4.1	Extrakce proteinů.....	10
3.4.2	Extrakce celkových glycidů a trehalózy.....	11
3.4.3	Extrakce glykogenu.....	11
3.4.4	Extrakce celkových lipidů.....	11
3.5	Stanovení základních živin.....	11
3.5.1	Stanovení proteinů BCA metodou.....	11
3.5.2	Stanovení celkových glycidů.....	12
3.5.3	Stanovení glykogenu.....	12
3.5.4	Stanovení trehalózy.....	13
3.5.5	Stanovení lipidů sulfo – fosfovanilínový test.....	13

3.5.6	Výsledky a jejich zpracování.....	14
4	VÝSLEDKY	15
4.1	Obsah živin u pokusných skupin intaktních much	15
4.2	Obsah živin u pokusných much ošetřených Drome-AKH.....	18
5	DISKUZE.....	22
6	ZÁVĚR.....	25
7	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	26
8	PŘÍLOHA.....	I
8.1	Příprava roztoků.....	I
8.2	Použité zkratky	IV

1 ÚVOD

1.1 Obecná charakteristika adipokinetických hormonů

Adipokinetické hormony (AKH) patří mezi hmyzí neuropeptidy, které kontrolují metabolické procesy, především uvolňování energie. Tyto krátké neuropeptidy jsou syntetizovány, ukládány a uvolňovány neurosekretorickými buňkami z corpora cardiaca (viz kap. 1.1.3) (Gäde a kol. 1997). Adipokinetické hormony patří do adipokinetického hormone/red pigment concentrating hormone (AKH/RPCH) rodiny, doposud jich bylo popsáno téměř 50 ze zástupců mnoha druhů hmyzu (Gäde 2009, Nässel a Winther 2010, Kodrík a kol. 2010) AKH obsahují 8-10 aminokyselin s pyroglutamátovým zbytkem blokujícím N-konec a amidovou skupinou blokující C-konec molekuly (Gäde a Goldsworthy 2003, Gäde a kol. 2008). Prvně byl tento hormon objeven u saranče stěhovavé (*Locusta migratoria migratorides*) a označen jako Locmi-AKH-I (Stone a kol. 1976). U druhu *D. melanogaster* je tento hormon nazván Drome-AKH o sekvenci: pGlu-Leu-Thr-Phe-Ser-Pro-Asp-Trp-NH₂ (Schaffer a kol. 1990, Noyes a kol. 1995).

1.1.1 Endokrinní soustava hmyzu

Vlastnostmi a funkcí je endokrinní soustava hmyzu srovnatelná s endokrinní soustavou obratlovců. Skládá se z několika žláz s vnitřní sekrecí. Jejich centrum, jež tvoří neurosekretorické buňky mozku, je spojeno s endokrinními žlázami corpora cardiaca (CC) a corpora allata (CA). Důležitou součástí endokrinní soustavy hmyzu jsou také prothorakální žlázy, které se nachází v prvním hrudním článku - prothorax. Ostatní žlázy představují neurosekretorické buňky ostatních ganglií, endokrinní buňky střeva, epitracheální buňky střeva a endokrinní buňky gonád.

1.1.2 Místo syntézy AKH

Adipokinetické hormony jsou syntetizovány v syntetickém laloku a ukládány v zásobním laloku corpora cardiaca (CC) (Isabel a kol. 2005, Lee a Park 2004), v malém množství jsou syntetizovány i v mozku (Kodrík a kol. 2015). CC se nachází v blízkosti aorty, slouží také jako neurohemální orgán pro hormony, které jsou syntetizovány v mozku a poté jsou z CC uvolňovány do hemolymfy. Hmyzí hormonální komplex mozek CC a CA se někdy přirovnává k hypothalamo-hypofyzární soustavě obratlovců (Gäde a Goldsworthy 2003,

Kodrík 2008). U zástupců Diptera a tedy i mouchy *D. melanogaster* žlázy CC, CA, prothorakální žlázy splývají v kruhovou žlázu, která se nachází na přední části aorty v blízkosti mozku (King a kol. 1966).

1.1.3 Mechanismus působení hormonů

Mechanismus působení hmyzích hormonů je stejný jako u obratlovců. Hormon slouží jako informační molekula přenášející informaci z endokrinní žlázy, v cílové tkáni hormon aktivuje nebo syntetizuje enzym. Enzymy poté katalyzují příslušné biochemické reakce. AKH jako peptidické hormony nejsou schopné volně projít přes buněčnou membránu, proto je jejich informace do buňky přenesena prostřednictvím specifických membránových receptorů. Mechanismus peptidických hormonů zahrnuje dvě dráhy (aktivační dráha přes adenylátcyklázu (A-cesta) a aktivační dráha přes fosfolipázu C).

1.1.3.1 Aktivační dráha přes adenylátcyklázu (A-cesta)

Peptidický hormon se naváže na receptor G-proteinu, (polypeptidový řetězec, jenž sedmkrát prostupuje lipidovou dvojvrstvou), který se aktivuje a následně rozpadne na dvě podjednotky. Alfa podjednotka aktivuje adenylátcyklázu zvyšující koncentraci cAMP (druhý posel), který buď aktivuje proteinkinázovou kaskádu, jež vede k aktivaci příslušného enzymu. Alternativně se cAMP dostane do jádra buňky, kde působením na DNA aktivuje transkripci pro příslušný enzym.

1.1.3.2 Aktivační dráha přes fosfolipázu C

Tato cesta je také zprostředkována pomocí G-proteinu podobně jako u A cesty (viz kap. 1.1.3.1). Aktivuje se však při ní fosfolipáza C (C-calcium), která štěpí inositolový fosfolipid na inositol-1, 4, 5-trifosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG). IP3 uvolňuje vápenaté ionty z endoplazmatického retikula do cytosolu, zatímco DAG pomáhá aktivovat protein kinázu C prostřednictvím vápenatých iontů. Protein kináza C pak aktivuje daný enzym.

1.1.3.3 Mobilizace lipidů a glycidů

Cílovým orgánem adipokinetických hormonů je tukové těleso, ve kterém jsou uloženy energetické zásoby. Hmyz získává energii v první řadě z lipidů (ve formě DAG)

a z glykogenu ve formě trehalózy. Pouze někteří brouci a zástupci řádu Diptera získávají energii spalováním prolinu na alanin (Auerswald a Gäde 1999, Scaraffia a Wells 2003). Mobilizace lipidů je zajištěna klasickou A cestou (viz kap. 1.1.3.1), která aktivuje enzym lipázu. Ta štěpí triacylglyceroly (TAG) na DAG, které jsou přenášeny lipoforinovými nosiči (komplex se nazývá HDLp – high density lipophorin). DAG jsou transportovány do místa potřeby, nejčastěji do pracujícího svalu, kde jsou pak jeho mastné kyseliny štěpeny beta-oxidací za uvolnění energie (Van der Horst a kol. 2001). Mobilizace glycidů je zprostředkována klasicky přes fosfolipázu C (viz kap. 1.1.3.2). Fosfolipáza C spouští proteinkinázovou kaskádu, která aktivuje glykogen fosforylázu, jež štěpí glykogen na glukózu. Z glukózy je následně syntetizována trehalóza, která je uvolňována do hemolymfy a přepravována k cílovým buňkám např. svalu, kde je opět přeměněna na glukózu, která slouží jako zdroj energie (Gäde a Auerswald 2003, Arrese a kol. 1999).

1.1.4 Funkce AKH

Hlavní funkcí AKH je nepochybně kontrola energetického metabolismu hmyzu. Tyto hormony však mají pleiotropní účinky a jsou zapojeny do mnoha dalších dějů. Obecně se chovají jako typické stresové hormony, kdy stimulují katabolické děje (mobilizace lipidů, glycidů a prolinu) (Van der Horst a kol. 2001, Vroemen a kol. 1998) a tím činí energii dostupnější. Na biochemické hladině AKH aktivují adenylát cyklázu a lipázu (Spencer a Candy 1976), fosfolipázu C (Vroenen a kol. 1997), glykogen fosforylázu (Van Marrewijk a kol. 1980), dále aktivují antioxidační mechanismy (Kodrík a kol. 2007, Bednářová a kol. 2013), zvyšují kapacitu lipoproteinových přenašečů (Kanost a kol. 1990), inhibují syntézu RNA (Kodrík a Goldsworthy 1995), proteinů (Carlisle a Loughton 1979) a lipidů (Gokuldas a kol. 1988). Na fyziologické úrovni 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), pohyb (Pener a kol. 1997, Socha a kol. 1999) a inhibují vývoj vajíčka (Lorenz 2003). Dokáží také řídit chování octomilky vyvolané hladověním (Lee a Park 2004). Z funkčního hlediska jsou AKH podobné glukagonu, který je produkován Langerhalsovými ostrůvky pankreatu obratlovců. Funkcí glukagonu je zvyšování koncentrace glukózy v krvi za běžných fyziologických i stresových podmínek (Jones a kol. 2012). Kontrola hladiny cukrů v hmyzí hemolymfě není tak přesná a hmyz může tolerovat větší výkyvy koncentrací těchto metabolitů (Chapman 1998).

1.2 Adenosin

1.2.1 Obecná charakteristika a základní funkce adenosinu

Adenosin (Ado) patří mezi purinové nukleosidy, které jsou základní složkou nukleových kyselin. Adenosin je přítomen ve všech živých organizmech. Je složen z adeninu a ribózy a je hlavní složkou AMP. Ado je klíčový buněčný metabolit, který fyziologicky řídí homeostázu kyslíku, energie, nervové funkce, metabolismus tuku i glycidů a imunitní reakce (Jacobson a Gao 2009). Ado signalizace je také zapojena do různých patologických stavů jako jsou neurologická, kardiovaskulární a zánětlivá onemocnění (Trincavelli a kol. 2010). Uvolnění Ado vyžaduje nukleosidový membránový transport (Jacobson a Gao 2009). Ado je součástí mnoha metabolických drah, které jsou přítomny uvnitř (intracelulárně) i vně (extracelulárně) buňky (Fredholm 2010). Při řízení fyziologických procesů např. v mozku a srdci Ado snižuje aktivitu těchto tkání (např. snížením srdečního rytmu, vazodilataci). Hraje také důležitou roli jako extracelulární posel, obzvláště v mozku, který exprimuje vysokou koncentraci adenosinových receptorů (AdoR), kde je Ado zapojený do normálních, ale i patologických stavů mozku (např. regulace spánku, probuzení, neuroprotektce, epilepsie). Antagonistou AdoR, který aktivitou připomíná adenosin, je kofein (Fredholm a kol. 1999). Doba působení Ado je velmi krátká (1-10 sekund) (Jacobson a Gao 2009). Úloha Ado jako signální molekuly je v mnoha případech k nerozeznání od hormonů. Proto je někdy nazýván jako stresovým hormonem (Hasko a kol. 2002). Za normálních podmínek je koncentrace Ado v buňkách a tkáních v rozmezí od 20 do 200 nM a při stresující události se může zvýšit až na mikromoly (Fredholm 2010, Kučerová a kol. 2012).

1.2.2 Tvorba a řízení hladiny adenosinu

Za normálních podmínek je adenosin tvořen nepřetržitě intracelulárně stejně jako extracelulárně. Produkce intracelulárního Ado je zprostředkována rozpadem extracelulárních adeninových nukleotidů ($ATP \rightarrow Ado$). Tato reakce je zprostředkována intracelulární 5'-nukleotidásou, která defosforilyluje AMP nebo SAH (S-adenosyl-homocysteine) hydrolýzou. Ado syntetizovaný intracelulárně je transportován do extracelulárního prostoru usnadněnou difúzí, která účinně vyrovnává hladinu intracelulárního a extracelulárního Ado prostřednictvím specifických obousměrných transportérů. 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'-nucleotidase) na adenosin. Hladina Ado v mozku je vyšší během bdění než ve spánku. Hladina Ado se zvýší stonásobně vlivem oxidativního stresu a ischemie. Jakmile hladina intracelulárních adeninových nukleotidů klesne, následkem nadměrné spotřeby energie intracelulární hladina Ado prudce vzroste. Při ischemii nebo hypoxii dojde k poklesu intracelulárního ATP, který je doprovázen shromažďováním 5'-AMP a následně Ado. Nukleosid je následně transportován do extracelulárního prostoru prostřednictvím výše uvedených transportérů. Když je hladina intracelulárního Ado vysoká, Ado jednoduše difunduje ven z buněk. Při tomto mechanismu dochází k přímému uvolnění intracelulárního ATP, který je extracelulárně přeměněn ATPázou (ecto-ATPase) a ATP difosfohydrolázou (ecto-ATP-diphospho hydrolase= ecto apyrase) na AMP. AMP je defosforylován 5'-nukleotidázou (ecto-5'-nucleotidase) na Ado (Fredholm a kol. 2001).

1.2.3 Adenosinové receptory

Ado receptory jsou rozděleny do čtyř skupin (Tab. 1). Patří mezi receptory spřažené s G proteinem a jsou zapojeny do různých transdukčních mechanismů (Fredholm a kol. 2001). Receptory A2A a A2B aktivují adenylátcyklázu. A1 a A3 adenylátcyklázu inhybují (Fredholm 1994).

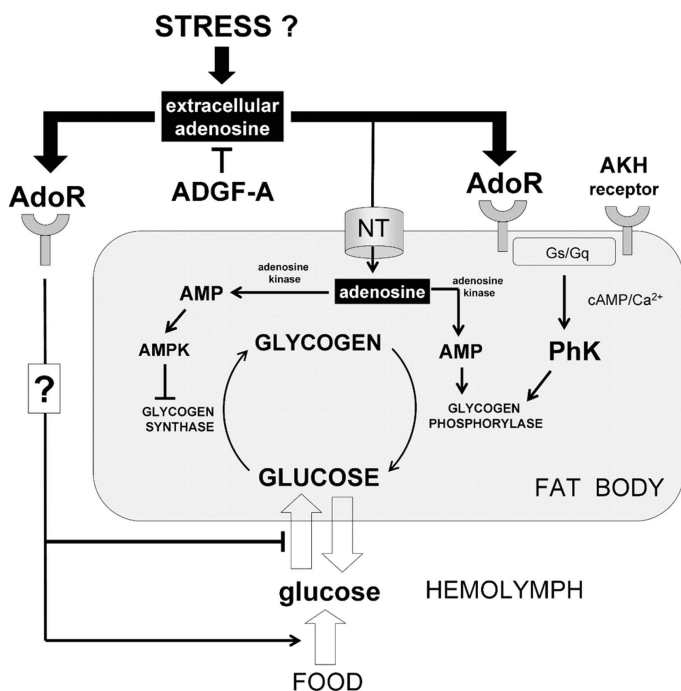
Tab. 1. Přehled a funkce Ado receptorů.

Receptor	G protein	Mechanismus působení
A1	G _i a G _o	Inhibuje adenylátcyklázu Aktivuje GIRKs Inhibuje Ca ²⁺ kanály Aktivuje PLC
A2A	G _s ^c a G _{olf}	Aktivuje adenylátcyklázu, Inhibuje Ca ²⁺ kanály Aktivuje Ca ²⁺ kanály (?)
A2B	G _s ^c	Aktivuje adenylátcyklázu Aktivuje PLC
A3	G _{i3} a G _q	Aktivuje PLC Inhibuje Adenylátcyklázu Zvyšuje intracelulární Ca ²⁺

Vysvětlivky: PLC - fosfolipáza C, GIRKs – draselné kanály ovládané G-proteinem

1.3 Zapojení AKH a adenosinu do metabolismu glycidů

Metabolismus glycidů má u hmyzu, tak jako i u jiných živočichů, zásadní postavení v celkovém energetickém metabolismu. Na jeho řízení se podílí řada faktorů – důležitou roli hrají také adipokinetické hormony a adenosin. Úloha AKH v tomto procesu je popsána v kap. 1.1.3.3, adenosin pravděpodobně ovlivňuje metabolismus glycidů dvěma možnými mechanismy (Obr. 1): přes adenosinový receptor (AdoR) a přes adenosinové transportéry. Je zřejmé, že jak AKH, tak i adenosinová signalizace využívají podobné mechanismy – jejich receptory jsou spojené s Gs a Gq proteiny a jejich signální reakce zvyšují hladiny cAMP a vedou k uvolňování vápníku. Je možné, že AdoR by mohl sloužit jako další receptor pro AKH v jeho aktivaci glykonenolytických procesů v buňkách tukového tělesa (Žuberová a kol. 2010). Dále bylo zjištěno, že AdoR je u *D. melanogaster* exprimován v kruhové žláze, kde se nachází také buňky produkující AKH, nicméně přímá zastupitelnost obou faktorů je dosud neznámá (Žuberová a kol. 2010).



Obr. 1. Model působení extracelulárního adenosinu na metabolismus cukrů. (Žuberová a kol. 2010)

Vysvětlivky: ADGF-A – adenosin deaminázový růstový faktor A, AdoR – adenosinový receptor, AKH- adipokinetický hormon, AMP – adenosin monofosfát, AMPK – aktivovaná AMP proteinkináza, G_s/G_q – G proteinové receptory přidružené k AdoR a AKH receptoru za produkci cAMP (G_s) nebo aktivovaná fosfolipáza C uvolňující Ca²⁺ (G_s), NT – nukleosidový transport, PhK - fosforyláza-kináza

2 CÍLE PRÁCE

- Určit hladinu základních živin u imag mušky *D. melanogaster* s poruchami produkce AKH a poruchami receptoru pro adenosin.
- Posoudit účinek aplikace Drome-AKH na dané mouchy.
- Pokusit se zjistit, zda mezi účinkem adenosinu a AKH na hladinu živin existují nějaké vztahy.

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 přímo nebo nepřímo je ovlivňovat. Takové poznatky mohou být někdy v budoucnosti prakticky použitelné například v zemědělství, kde mohou přispět ke kontrole populací škodlivých druhů hmyzu.

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Studovaný modelový organizmus

Octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*)

Octomilky chované v naší laboratoři pocházejí z komerčně dostupných linií z *Drosophila* centra (Bloomington, Indiana, USA), nebo byly připraveny Dr. Romanem Sidorovem a Dr. Michalem Žurovcem z Entomologického ústavu Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích. Octomilky byly od vajíčka po dospělce chovány ve skleněných zkumavkách na speciální potravě- příprava potravy viz Příloha. Zkumavky s mouchami byly uchovávány v termostatech při teplotě 25 °C a fotoperodě 12:12. Životní cyklus octomilky (vajíčko – první instar – druhý instar – třetí instar – kukla – imago) trvá přibližně 10 až 14 dní a v jedné zkumavce se jich mohou chovat stovky. Pokusy byly prováděny pouze na samcích, z důvodů eliminace případných komplikací souvisejících s ovariálním cyklem samic (3 dny po vylíhnutí).

Na pokusy byly použity tyto linie much: White, AKH-deficientní (AKH-def), Rescue-AKH (R-AKH) s obnovou AKH produkci, AdoR-deficientní (AdoR-def), AdoR-Exelixis-deficientní (ExAdoR-def):

- 1) Moucha **White**, (Bloomington # 1118) sloužila jako kontrola k ostatním liniím much, které byly používány v pokusech.
- 2) Moucha AKH-deficientní (**AKH-def**) s mutací genu pro syntézu adipokinetického hormonu na III. chromozomu. Zárodečná linie AKH-def mouchy 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) Moucha Rescue-AKH, zachráněný AKH-def, (**R-AKH**) byla vykřížená z AKH-def mouchy, u které byla navíc na II. chromozomu navozena ektotopická exprese genu AKH (AKH-overexpres). Výsledný genotyp mouchy byl $w; UAS - AKH^{+} = w^{+}; AKH-def / w; act - G4 = w^{+}; AKH-def$.
- 4) Moucha Adenosin Receptor-deficientní (**AdoR-def**) s mutací v genu pro adenosinový receptor na III. chromozomu. Výsledný genotyp mouchy byl $w; +; AdoR-def / w; +;$

AdoR-def. Moucha byla připravena homologní rekombinací (Doležalová a kol. 2007).

- 5) Moucha Exelixis-AdoR-deficientní (**ExAdoR-def**) nesla mutaci v genu pro adenosinový receptor na III. chromozomu, která byla připravena jiným způsobem než AdoR-def. Výsledný genotyp mouchy byl $w^+; +; \text{ExAdoR-def}$ (malá delece v sekvenci adenosinového receptoru) / $w^+; +; \text{Dj (3R) ExAdoR-def}$ (velká delece v sekvenci adenosinového receptoru).

3.2 Příprava vzorků pro měření živin

Pokusné octomilky byly usmrceny mrazem v $-20\text{ }^\circ\text{C}$, přeneseny do mikrozkušavek poté po jedné zváženy na analytických vahách (Explorer, Ohaus, max – 62 g, d – 0,01 mg) a v mikrozkušavkách uloženy v $-20\text{ }^\circ\text{C}$ na další zpracování. Pokud to bylo možné, byly vzorky po celou dobu manipulace uchovávány na ledu.

3.3 Aplikace roztoku hormonu Drome-AKH

V některých pokusech byly pokusné mouchy ošetřeny syntetickým AKH z *D. melanogaster*, Drome-AKH (viz kap. 1.1). Pro aplikaci hormonu byly mouchy znehybněny chladem a jednotlivě přeneseny do mikrozkušavek, zváženy (viz kap. 3.2) a poté krátce ponořeny do roztoku Drome-AKH v 20% roztoku metanolu v Ringerově roztoku o koncentraci 3 pmol/ μl - příprava viz Příloha. Kontrolní mouchy byly namáčeny pouze v 20% roztoku metanolu v Ringerově roztoku (= kontrolní roztok) – příprava viz Příloha. Poté byly mouchy lehce osušeny a dvě hodiny ponechány působení hormonu. Po uplynutí této doby byly usmrceny mrazem a uschovány při $-20\text{ }^\circ\text{C}$ pro další použití.

3.4 Extrakce živin

3.4.1 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, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 3 minuty v centrifuze Hettich EBA 12 R) a bylo odebráno 50 μl supernatantu na stanovení ve vodě rozpustných bílkovin. Zbýlý pelet byl dále extrahován ve 100 μl 1 % tritonu v 0,2M Tris-HCl pufru (pH 7,8). Pro stanovení ve vodě nerozpustných bílkovin bylo použito 50 μl takto získaného supernatantu (Stoscheck 1990).

3.4.2 Extrakce celkových glycidů a trehalózy

Každá moucha byla individuálně zhomogenizována jehlovým sonikátorem ve 100 μ l 70% etanolu a poté byl vzorek stočen (10 000 g, 4 $^{\circ}$ C, 3 minuty). Supernatant byl přenesen do jiné mikrozkuřavky a zbylý pelet znovu extrahován stejným způsobem. Oba supernatanty byly spojeny a odpařeny ve vakuové centrifuze (Speed Vac Jouan RC 10.22). Zbylý pelet byl použit pro extrakci na stanovení glykogenu (Carol a kol. 1956).

3.4.3 Extrakce glykogenu

Sedimenty po extrakci glycidů byly znova homogenizovány jehlovým sonikátorem ve 100 μ l, 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8 - příprava viz Příloha. Vzorky byly poté stočeny (10 000 g, 4 $^{\circ}$ 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).

3.4.4 Extrakce celkových lipidů

K extrakci pro stanovení celkových lipidů byla opět každá moucha jednotlivě zhomogenizována jehlovým sonikátorem, v 150 μ l směsi chloroform: metanol, 2 : 1 (Folch a kol. 1957, Košťál a Šimek 1998). Vzorek byl pak stočen (10 000 g, 4 $^{\circ}$ 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).

3.5 Stanovení základních živin

3.5.1 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 (Stoscheck 1990).

Ke stanovení obsahu proteinů ve vzorcích byl použit kit firmy Sigma-Aldrich. Do připravených vzorků (viz kap. 3.4.1) na stanovení rozpustných (50 μ l) a nerozpustných proteinů (50 μ l) 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 $^{\circ}$ C, 30 minut, Block Heater SBH 130 D). Po zahřátí byly vzorky ochlazeny a ekvivalent 200 μ l byl použit na stanovení proteinů. Absorbance vzorků byla měřena na mikrotitrační destičce na ELISA čteče

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 o objemu 50 µl byly použity na vlastní stanovení (Stoscheck 1990).

3.5.2 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. 3.4.2) byl rozpuštěn v 80 µl destilované vody 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 slepý vzorek 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 na ELISA čtečce. (Carol a kol. 1956).

3.5.3 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. 3.4.3) 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 pelet

rozpuštěn v 80 μ l destilované vody z čehož bylo 40 μ l odebráno na stanovení glykogenu pomocí anthronového činidla (viz kap. 3.5.2) (Ohtsu a kol. 1992).

3.5.4 Stanovení trehalózy

Trehalóza je neredukující disacharid, který je typickou transportní formou glycidů u hmyzu. Stanovení trehalózy bylo prováděno pomocí Trehalose assay kit (Megazyme) podle návodu příloženého k tomuto kitu a podle Isabel a kol. (2005). Odpařený vzorek (viz kap. 3.4.2) byl rozpuštěn v 10 μ l destilované vody. Poté bylo do vzorku přidáno 10 μ l reakčního činidla 2 – příprava viz Příloha, směs promíchána na vortexu a zahřáta v blokovém termostatu (40 °C, 30 minut). Po ochlazení bylo do vzorku přidáno 25 μ l reakčního činidla 3 – příprava viz Příloha a po promíchání následovala inkubace směsi po dobu 5 minut při pokojové teplotě. V dalším kroku bylo do vzorku přidáno 10 μ l 2M imidazolového pufru, pH 7,0, po promíchání odebráno 27,5 μ l do nové zkumavky a přidáno 12,5 μ l destilované vody. Trehalóza ve vzorku byla stanovena pomocí anthronového činidla (viz kap. 3.5.2). Spolu se vzorky byly připraveny kontroly (kontrola 1 – glukóza 1,44 mg/ml, kontrola 2 – trehalóza 7,2 mg/ml, kontrola 3 – glukóza, trehalóza, 1:1), které sloužily jako důkaz správného odstranění redukujících cukrů při zpracování vzorků.

3.5.5 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: nenasycené 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. 3.4.4) 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. 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 slepý vzorek - koncentrovaná kyselina sírová. Absorbance byla měřena na mikrotitrační destičce na ELISA čtečce při 546 nm.

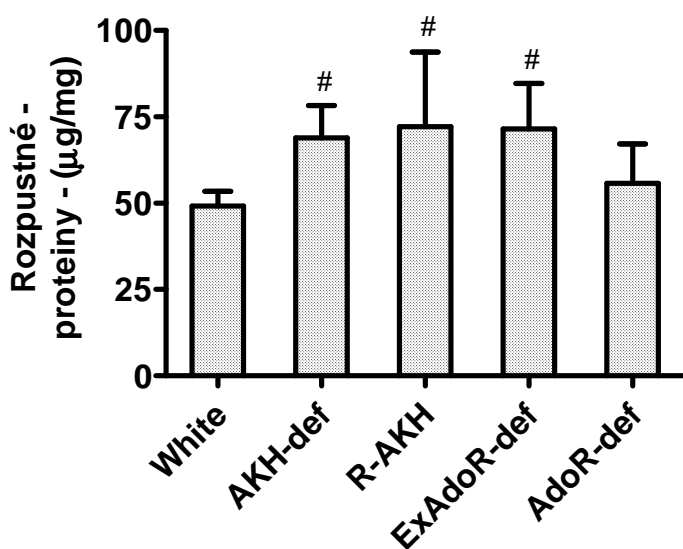
3.5.6 Výsledky a jejich zpracování

Pro výpočet obsahu daných živin ze standartních křivek a grafické a statistické zpracování byl použit program Prism (GraphPad Software, version 4, CA, USA). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti byly vyhodnoceny prostřednictvím Studentova t-testu a pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnettovým post-testem. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnota průměru \pm směrodatná odchylka. Počet měření v jednotlivých pokusech $n= 8$.

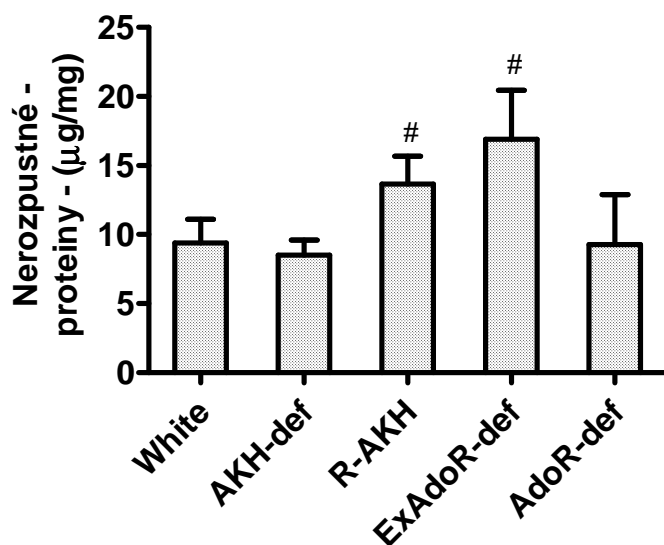
4 VÝSLEDKY

4.1 Obsah živin u pokusných skupin intaktních much

V první sérii pokusů jsem stanovila hladiny základních živin u much s poruchami produkce AKH a poruchami adenosinového receptoru bez ošetření hormonem. Výsledky ukázaly, že hladina rozpustných proteinů v jejich těle byla několikanásobně vyšší než hladina proteinů nerozpustných. V rámci rozpustných proteinů (Obr. 2) dosahovala jejich hladina u mouchy AKH-def, R-AKH a ExAdoR-def asi 1,5 násobku hladiny kontrolní skupiny White. Podobně bylo tomu i u nerozpustných proteinů (Obr. 3), statisticky významné navýšení oproti kontrole White 1,5 a 1,8 násobné jsem zaznamenala u R-AKH a ExAdoR-def.

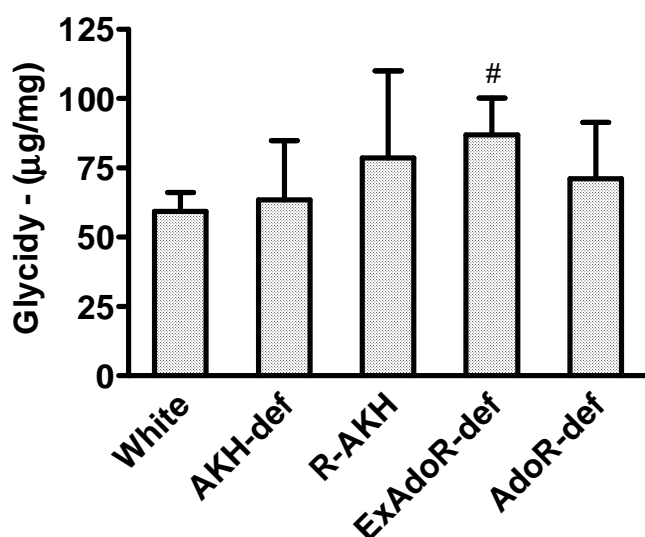


Obr. 2. Množství rozpustných proteinů (µg/mg hmotnosti těla) u různých skupin intaktních much (průměr ± SD, n= 8). Statisticky významné rozdíly mezi skupinou White a ostatními skupinami, byly vyhodnoceny pomocí jednocestné ANOVA s Dunnettovým post-testem na 5% hladině významnosti (označeno #).



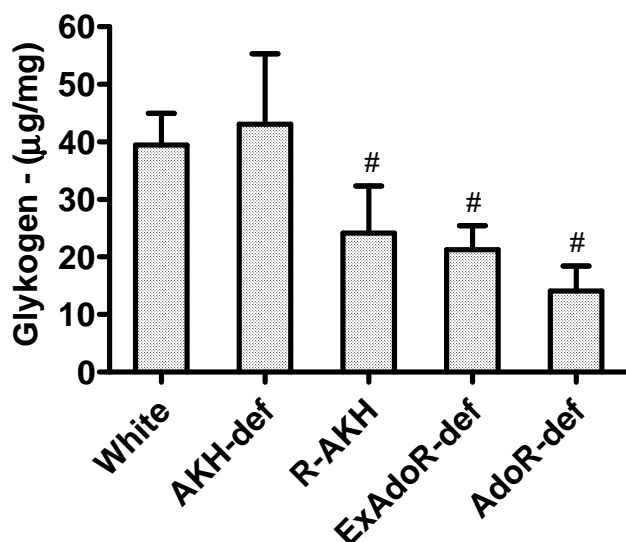
Obr. 3. Množství nerozpustných proteinů (µg/mg hmotnosti těla) u různých skupin intaktních much (průměr ± SD, n= 8). Statisticky významné rozdíly mezi skupinou White a ostatními skupinami, byly vyhodnoceny pomocí jednocestné ANOVA s Dunnettovým post-testem na 5% hladině významnosti (označeno #).

Hodnoty glycidů se u sledovaných much dramaticky nelišily (Obr. 4). Mezi jednotlivými skupinami byla pouze jediná, která se významně odlišovala od kontrolních much White: hladina glycidů u ExAdoR-def byla tato hladina navýšena asi 1,5 krát.



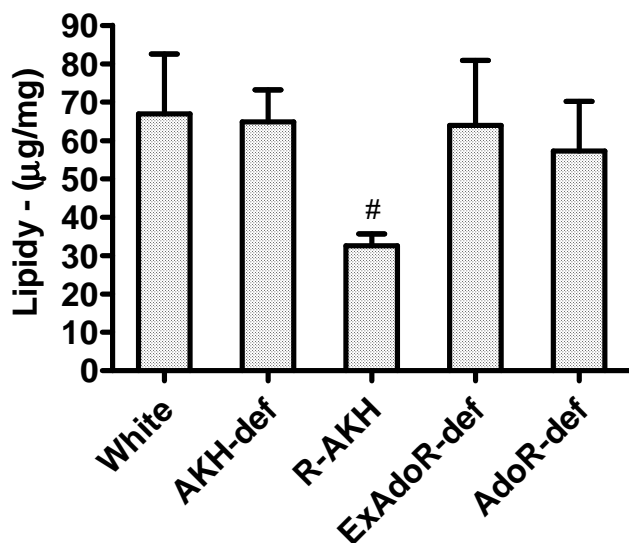
Obr. 4. Množství celkových glycidů (µg/mg hmotnosti těla) u různých skupin intaktních much (průměr ± SD, n= 8). Statisticky významné rozdíly mezi skupinou White a ostatními skupinami, byly vyhodnoceny pomocí jednocestné ANOVA s Dunnettovým post-testem na 5% hladině významnosti (označeno #).

Podstatně se lišily hodnoty obsahů glykogenu mezi jednotlivými skupinami (Obr. 5). Obsah glykogenu u AKH-def a kontrolních White much byl v zásadě podobný, ale u ostatních much byla tato hladina statisticky průkazně snížena. U much R-AKH 1,9 krát, ExAdoR-def 2 krát, AdoR-def 2,8 krát ve srovnání s kontrolní skupinou White.



Obr. 5. Množství glykogenu ($\mu\text{g}/\text{mg}$ hmotnosti těla) u různých skupin intaktních much (průměr \pm SD, $n=8$). Statisticky významné rozdíly mezi skupinou White a ostatními skupinami, byly vyhodnoceny pomocí jednocestné ANOVA s Dunnettovým post-testem na 5% hladině významnosti (označeno #).

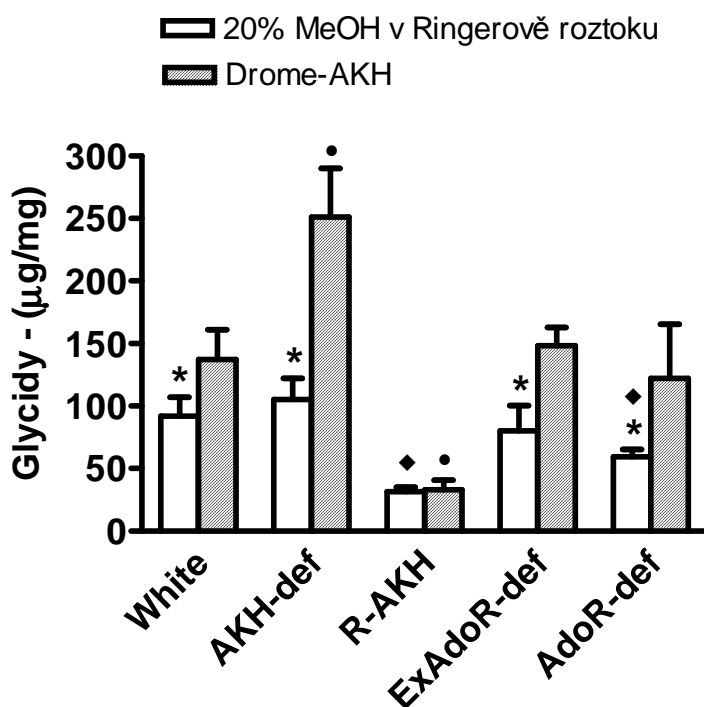
Zajímavý výsledek přineslo srovnání obsahů lipidů mezi jednotlivými pokusnými skupinami much (Obr. 6). Hladina lipidů u AKH def much byla až 2 krát nižší než u kontrolní skupiny White a u všech ostatních skupin much.



Obr. 6. Množství lipidů ($\mu\text{g}/\text{mg}$ hmotnosti těla) u různých skupin intaktních much (průměr \pm SD, $n=8$). Statisticky významné rozdíly mezi skupinou White a ostatními skupinami, byly vyhodnoceny pomocí jednocestné ANOVA s Dunnettovým post-testem na 5% hladině významnosti (označeno #).

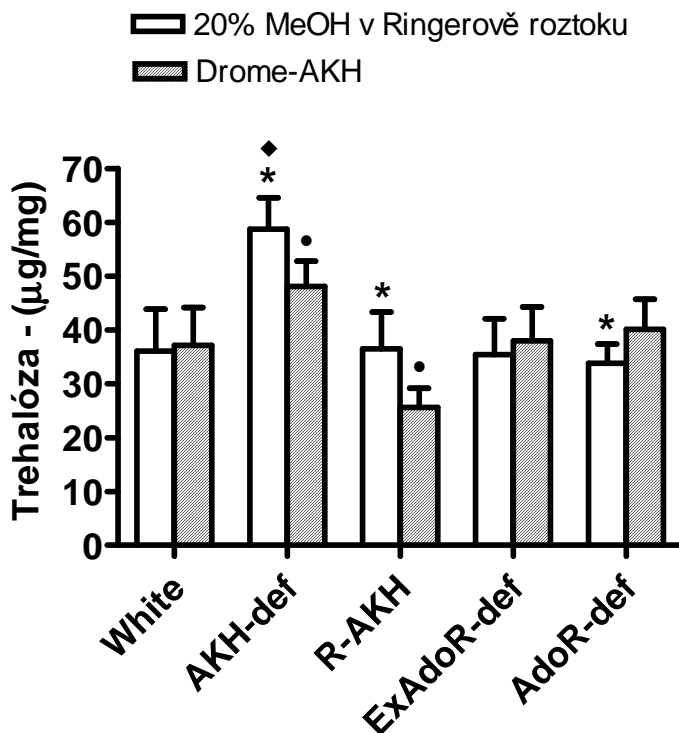
4.2 Obsah živin u pokusných much ošetřených Drome-AKH

V další sérii pokusů jsem se pokusila zhodnotit vliv aplikace Drome-AKH na stav živin u much jednotlivých pokusných skupin. Téměř u všech studovaných skupin se prokázal jasný vliv AKH na zvýšení obsahu celkových glycidů (Obr. 7). Výjimku tvořily R-AKH mouchy, u kterých jsem nezaznamenala žádnou změnu v obsahu glycidů, respektive hladina zůstala velmi nízká i po aplikaci Drome-AKH. U ostatních skupin much byl obsah glycidů statisticky významně navýšen. Tento jev se týká kontrolních much White 1,5 krát, u AKH-def 2,4 krát, u ExAdoR-def 1,8 krát a AdoR-def 2,1 krát. Srovnání hladiny glycidů mezi jednotlivými skupinami much po hormonálním ošetření dále ukázalo (jednocestná ANOVA), že tato hladina je významně vyšší u AKH-def (1,8 krát) a významně nižší u R-AKH (4,1 krát) much ve srovnání s Drome-AKH ošetřenými kontrolami White. Ošetření kontrolním roztokem ve stejném testu ukázalo významné rozdíly u R-AKH (2,9krát) a AdoR-def (1,7 krát), kdy došlo ke snížení hladiny glycidů (opět ve srovnání s kontrolním roztokem ošetřenými kontrolami White).



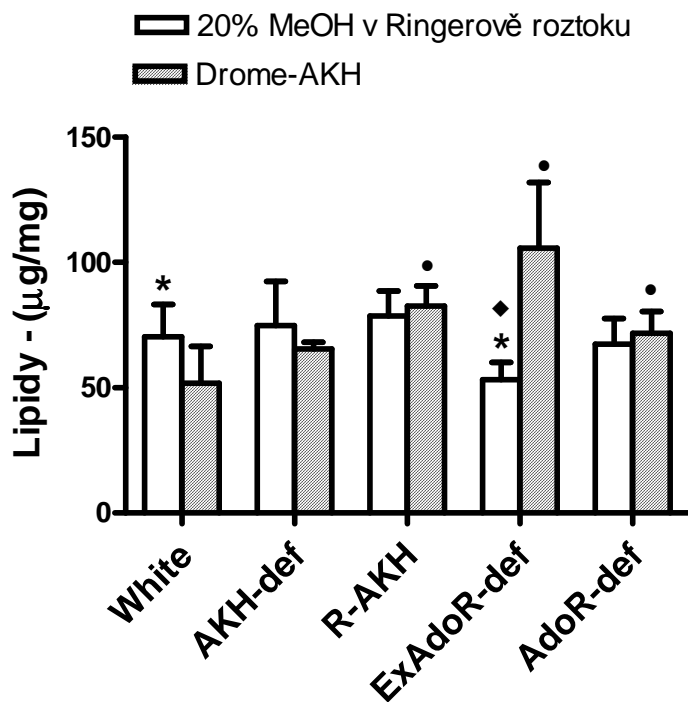
Obr. 7. Množství glycidů ($\mu\text{g}/\text{mg}$ hmotnosti těla) u různých skupin much ošetřených Drome-AKH a 20% roztokem metanolu v Ringerově roztoku (= kontrolní roztok) (průměr \pm SD; $n=8$). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti mezi hormonálně ošetřenými jedinci a příslušnými kontrolami ošetřenými 20% roztokem metanolu v Ringerově roztoku (= kontrolní roztok) byly vyhodnoceny pomocí Studentova t-testu a jsou označeny hvězdičkou; statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti mezi geneticky manipulovanými skupinami a kontrolou White byly vyhodnoceny pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnettovým post testem a jsou pro hormonálně ošetřené skupiny kolečkem a pro skupiny ošetřené kontrolním roztokem označeny čtverečkem.

Oproti výsledkům s celkovými glycidy nebyly výsledky hladiny trehalózy tak jednoznačné. Hladiny trehalózy byly podstatně nižší a pouze u tří sledovaných skupin jsem zaznamenala zřetelnou změnu po aplikaci hormonu, u AKH-def (1,2 krát) a u R-AKH (1,4 krát) much snížení, a AdoR-def (1,2 krát) much naopak mírné navýšení (Obr. 8). ANOVA testy, které srovnávaly kontrolní mouchy White s ostatními skupinami po ošetření hormonem resp. kontrolním roztokem, prokázaly pouze následné změny: Drome-AKH ošetření – zvýšení u AKH-def (1,5 krát) a snížení u R-AKH (1,6 krát); a ošetření kontrolním roztokem – zvýšení (1,6 krát) u AKH-def skupiny.



Obr. 8. Množství trehalózy ($\mu\text{g} / \text{mg}$ hmotnosti těla) u různých skupin much ošetřených Drome-AKH a 20% roztokem metanolu v Ringerově roztoku (= kontrolní roztok) (průměr \pm SD; $n= 8$). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti mezi hormonálně ošetřenými jedinci a příslušnými kontrolami ošetřenými 20% roztokem metanolu v Ringerově roztoku (= kontrolní roztok) byly vyhodnoceny pomocí Studentova t-testu a jsou označeny hvězdičkou; statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti mezi geneticky manipulovanými skupinami a kontrolou White byly vyhodnoceny pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnettovým post testem a jsou pro hormonálně ošetřené skupiny kolečkem a pro skupiny ošetřené kontrolním roztokem označeny čtverečkem.

Sledování změn v obsahu lipidů v těle sledovaných skupin much (Obr. 9) také nepřineslo dramatické výsledky. Drome-AKH ošetření významně snižovalo (1,4 krát) hladinu lipidů u kontrolních much White a významně zvyšovalo (2 krát) hladinu u ExAdoR-def much. ANOVA test prokázal významné zvýšení hladiny lipidů u R-AKH (1,7 krát), ExAdoR-def (2 krát) a AdoR-def (1,4 krát) much po jejich ošetření Drome-AKH ve srovnání s White; u much ošetřených kontrolním roztokem jsem zaznamenala významné snížení hladiny lipidů (1,3 krát) pouze u ExAdoR-def much.



Obr. 9. Množství lipidů ($\mu\text{g}/\text{mg}$ hmotnosti těla) u různých skupin much ošetřených Drome-AKH a 20% roztokem metanolu v Ringerově roztoku (= kontrolní roztok) (průměr \pm SD; $n = 8$). Statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti mezi hormonálně ošetřenými jedinci a příslušnými kontrolami ošetřenými 20% roztokem metanolu v Ringerově roztoku (= kontrolní roztok) byly vyhodnoceny pomocí Studentova t-testu a jsou označeny hvězdičkou; statisticky významné rozdíly na 5% hladině významnosti mezi geneticky manipulovanými skupinami a kontrolou White byly vyhodnoceny pomocí testu jednocestná ANOVA s Dunnettovým post testem a jsou pro hormonálně ošetřené skupiny kolečkem a pro skupiny ošetřené kontrolním roztokem označeny čtverečkem.

5 DISKUZE

Analýza živin u studovaných intaktních skupin much nepřinesla jednoznačné výsledky. Jak se dalo očekávat, zjištěné kolísání hladin bílkovin zřejmě odráží momentální stav u daných skupin a nezdá se, že by použité genetické manipulace jejich hladinu jednoznačně ovlivňovaly. To platí i pro hladinu lipidů, která byla s výjimkou skupiny s obnovou produkci AKH (R-AKH) na stejné úrovni; hladiny živin u těchto much neodpovídaly očekávání, důvody jsou diskutovány níže. Jistou zákonitost lze pozorovat u much AdoR-def, s mutací v genu pro adenosinový receptor, u kterých došlo k poklesu obsahu glykogenu, což částečně odpovídá zjištění Žuberové a kol. (2010), které ukazuje, že adenosin zasahuje do metabolismu cukrů. Jasnější výsledky vyplynuly z pokusů, ve kterých jsem pokusné mouchy ošetřila dávkou Drome-AKH. Ty především potvrdily fakt, že glycidy jsou u *D. melanogaster* hlavním zdrojem energie (Nässel a Winther, 2010). Glycidy jsou ukládány v tukovém tělese ve formě glykogenu, který může být odbouráván v případě potřeby až na trehalózu, která je transportována hemolymfou do místa potřeby (Reyes-Dela Torre a kol. 2012). Tato mobilizace je regulována celou kaskádou enzymatických reakcí spouštěných navázáním AKH na receptor (Gäde a Auerswald 2003, Arrese a kol. 1999). V souladu s tímto mé výsledky ukázaly, že u octomilky aplikace AKH vedla ke zvýšení hladiny celkových glycidů v těle mouchy (Obr. 7). K takovému nárůstu hladiny cukrů došlo u všech skupin much kromě R-AKH. Hladina cukrů u R-AKH je v porovnání s ostatními skupinami několikanásobně nižší a nedošlo k žádnému nárůstu obsahu glycidů ani po ošetření hormonem. Tento výsledek neodpovídá očekávání a lze ho jen těžko přímo vysvětlit. Je však možné, že jeho podstata spočívá v komplikovaném genetickém pozadí: mouchy R-AKH byly získány dalším křížením AKH-def mutanta a byla u nich navozena ektopická overexprese AKH (detaily viz Sajwan a kol., 2015). Tento fakt nabízí možnost, že buňky těla reagují na nadprodukcí AKH kontraproduktivně. Podobný fenomén byl pozorován u ruměnice pospolné (*P. apterus*) (Kodrík a kol. 2000) a plošnice bavlníkové (*Dysdercus cingulatus*) (Socha a kol. 2004), u kterých účinek aplikace AKH na mobilizaci lipidů klesá po překročení optimální dávky hormonu. O příčině neúčinnosti AKH při vyšších dávkách lze jen spekulovat: v úvahu připadá např. omezení funkce receptorů, inaktivace hormonu nebo jiné negativní zpětné vazby. Zajímavý je fakt, že u AKH-def much byl glykemický nárůst po aplikaci AKH nejvýraznější. To bylo zřejmě způsobeno nepřítomností vlastního funkčního AKH a tedy zvýšenou citlivostí k jeho exogenní aplikaci. U much s poruchou adenosinového receptoru ExAdoR-def i AdoR-def,

jsem zaznamenala podobný účinek. Jak již bylo uvedeno, jistý vliv Ado na metabolismus cukrů byl popsán v práci Žuberové a kol. (2010), kdy u octomilky s mutací v genu pro adenosin deaminázový růstový faktor A (ADGF-A), který vede ke zvýšení hladiny Ado, docházelo k hyperglykémii v hemolymfě. Tento efekt byl uskutečňován Ado signalizací přes Ado receptor. Podobnost účinků Ado a AKH hormonů, jako antagonistů insulínu, byla nalezena i u savčího glukagonu. Savčí glukagon mobilizuje energetické zásoby a účastní se při regulaci hladiny glukózy v krvi (American Diabetes Association 2010). Navzdory očekávání, hladiny trehalózy, hlavního transportního cukru u hmyzu, neodrážejí vztahy získané ze stanovení celkových cukrů. Proč tomu tak je, lze jen spekulovat. Faktem je, že trehalóza jako transportní cukr se nachází především v hemolymfě. Stanovením hladin jak trehalózy, tak celkových cukrů v celých tělech much (a tedy i v buňkách) mohlo dojít k určitému zkreslení výsledků, které tak již přesně nepostihovaly podíl na předpokládané mobilizaci cukrů po hormonálním ošetření. Vliv působení AKH na hladinu trehalózy tedy nebyl jednoznačný, ale hladina trehalózy u AKH-def much byla průkazně vyšší než u kontrol (Obr. 7) a to i bez hormonálního zásahu. To je opačný výsledek než uvádí ve své práci Sajwan a kol. (2015) - autoři zde prokázali, že obsah trehalózy u AKH-def much je statisticky významně nižší oproti kontrolám. Musíme však vzít v úvahu, že v této práci byla hladina trehalózy stanovována v hemolymfě larev třetího instaru. Dále není vyloučeno, že reakce uvolňování a spotřeby glycidů za přítomnosti nebo absence AKH se mohou lišit u larev a imag. Navíc je známo, že hladina glycidů včetně trehalózy se mění i mezi larválními instary (Žuberová a kol. 2010).

Měření hladiny lipidů po aplikaci AKH neukázalo žádné dramatické změny, což potvrzuje, že hlavním energetickým zdrojem u octomilky jsou glycidy. Nicméně, spalování lipidů jako hlavní energetický substrát a jeho stimulace přes AKH jsou u hmyzu běžné. Hyperlipemický efekt exogenně podávaného AKH byl prokázán u saranče stěhovavé (*L. migratoria*) (Goldsworthy 1983), ruměnice pospolné (*P. apterus*) (Kodřík a kol. 2000, 2002), ploštice bavlníkové (*D. cingulatus*) (Socha a kol. 2004) a dalších druhů hmyzu, u kterých je aktivace lipidů preferovaná metabolická dráha. K mobilizaci lipidů je zapotřebí stimulace hormonem AKH přes AKH receptor, který spustí kaskádu enzymatických reakcí vedoucích k přeměně triacylglycerolů (TAG) na diacylglyceroly (DAG) – hlavní transportní formu tuků, které jsou pak přemísťovány do místa spotřeby v závislosti na požadavcích organismu (Van der Horst a kol. 2001).

Je zřejmé, že pro hmyzí energetický metabolismus jsou důležité především cukry a tuky. Pouze někteří brouci a zástupci řádu Diptera získávají energii spalováním prolinu na alanin (Auerswald a Gäde 1999, Gäde a Auerswald 2002, Scaraffia a Wells 2003). Prolin je vyráběn z alaninu a z acetyl-CoA. Acetyl-CoA je běžný energetický substrát pocházející z různých zdrojů. Vhojně míře je získán beta-oxidací mastných kyselin z lipidových zásob tukového těla. Jelikož se zdá, že u octomilky jsou hlavním energetickým zdrojem cukry, proto jsem neočekávala významnější změny v obsahu proteinů v těle sledovaných much. Což výsledky prokázaly.

Výsledky měření hladiny glycidů u much s deficiencí produkce AKH i adenosinového receptoru po externě aplikované dávce Drome-AKH ukázaly, že tato hladina se mění podobně (Obr. 7). Rozsah pokusů nedovoluje udělat podrobnější závěry o možnostech nějaké bližší interakce obou faktorů nebo případného propojení signálních drah. Výsledky však dávají základ pro podrobnější studium této problematiky.

6 ZÁVĚR

U octomilek s ovlivněnými geny pro AKH a adenosinový receptor byly sledovány obsahy různých druhů živin v jejich tělech a reakce much na ošetření Drome-AKH. Při tom bylo zjištěno:

- Obsah základních živin – proteinů, glycidů a lipidů – u intaktních skupin much příliš neodráží dopady manipulací v genech pro AKH a adenosinový receptor. Pouze u ExAdoR-def, AdoR-def a R-AKH došlo k významnému poklesu hladiny glykogenu.
- Aplikace externího Drome-AKH u všech skupin s výjimkou R-AKH významně zvyšovala hladinu celkových glycidů, což naznačuje jejich zásadní úlohu pro celkový metabolismus.
- Výsledky s mouchami R-AKH byly nejednoznačné, což pravděpodobně odráží jejich komplikované genetické pozadí.
- Sledování metabolismu glycidů much po hormonálním ošetření naznačuje, že interakce mezi AKH a adenosinovou signalizací nelze vyloučit.

7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- American Diabetes Association 2010: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 33, S62–S69
- 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, 556–564
- Auerswald L, Gäde G 1999: Effects of metabolic neuropeptides from insect corpora cardiaca on proline metabolism of the African fruit beetle, *Pachnoda sinuata*. *Journal of Insect Physiology* 45, 535–543
- 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 intracellular Ca^{2+} stores. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology* 158, 142–149
- 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, 583–586
- Doležalová E, Nothacker HP, Civelli O 2007: A *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37, 318–329
- 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, 1284–1288
- Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M 1994: Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacological Reviews* 46, 143–156
- Fredholm BB, Izjerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J 2001: International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors. *Pharmacological Reviews* 53, 527–552
- 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, 83–153

- Gäde G 2009: Peptides of the Adipokinetic Hormone/ Red Pigment-Concentrating Hormone Family A New Take on Biodiversity. Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology, Annals of the New York Academy of Science 1163, 125–136
- Gäde G, Auerswald L 2002: Beetles' choice--proline for energy output: control by AKHs. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 132, 117–129
- Gäde G, Auerswald L 2003: Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. General and Comparative Endocrinology 132, 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, 1063–1075
- Gäde G, Hoffmann KH, Spring JH 1997: Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. Physiological Reviews 77, 963–1032
- Gäde G, Marco HG, Šimek P, Audsley N, Clark KD, Weaver RJ 2008: Predicted versus expressed adipokinetic hormones, and other small peptides from the corpus cardiacum-corpora allatum: a case study with beetles and moths. Peptides 29, 1124–1139
- Gokuldas M, Hunt PA, Candy DJ 1988: The inhibition of lipid synthesis in vitro in the locust, *Schistocerca gregaria*, by factors from corpora cardiaca. Physiological Entomology 13, 43–48
- Goldsworthy GJ 1983: The endocrine control of flight metabolism in locusts. Advances in Insect Physiology 17, 149–204
- Goldsworthy GJ, Opoku-Ware K, 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, 601–608
- Goldsworthy GJ, Chandrakant S, Opoku-Ware K 2003: Adipokinetic hormone enhances nodule formation and phenoloxidase activation in adult locust injected with bacterial lipopolysaccharide. Journal of Insect Physiology 49, 795–803
- Hasko G, Deitch EA, Szabó C, Némethi ZH, Vizib ES 2002: Adenosine: a potential mediator of immunosuppression in multiple organ failure. Current Opinion in Pharmacology 2, 440–444
- Chapman RF 1998: The Insects, Structure and Function, 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge

- 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, 531–538
- Jacobson KA a Gao ZG 2009: Adenosine. In: *Intercellular communication in the nervous system* (Ed: Malenka RC),. Elsevier, Boston, MA. pp.627–638
- Jones BJ, Tan T, Bloom SR 2012: Minireview: glucagon in stress and energy homeostasis. *Endocrinology* 153, 1049–1054
- Kanost MR, Kawooya JK, Law JH, Ryan RO, Heusden MC van, Ziegler R 1990: Insect haemolymph proteins. *Advance in Insect Physiology* 22, 299–396
- King RC, Aggarwal SK, Bodenstern D 1966: The comparative submicroscopic morphology of the ring gland of *Drosophila melanogaster* during the second and third larval instars. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 73, 272–285
- Knight JA, Anderson S, Rawle JM 1972: Chemical Basis of the Sulfo-phospho-vanillin Reaction for Estimating Total Serum Lipids. *Clinical Chemistry*, 18, 199–202
- Kodrík D 2008: Adipokinetic hormone function that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology* 33, 171–180
- Kodrík D, 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, 127–133
- Kodrík D, Krishnan N, Habušťová O 2007: Is the titer of adipokinetic peptides in *Leptinotarsa decemlineata* fed on genetically modified potatoes increased by oxidative stress. *Peptides* 28, 974–980
- Kodrík D, Marco HG, Šimek P, Socha R, Štys P, Gäde G 2010: The adipokinetic hormones of Heteroptera: A comparative study. *Physiological Entomology* 35, 117–127
- Kodrík D, Socha R 1999: A Mediterranean population of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) exhibit swing morph-related differences in adipokinetic response. *European Journal of Entomology* 96, 327–330
- 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, 489–498
- Kodrík D, Socha R, Zemek R 2002: Topical application of Pya-AKH stimulates lipid mobilization and locomotion in the flightless, bug *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Physiological Entomology* 27, 15–20

- Kodrík D, Stašková T, Jedličková V, Weyda F, Závodská R, Pfliegerová 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.
- Kučerová L, Brož V, Fleischmannová J, Šantrůčková J, Sidorov R, Doležal V, Žurovec 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, 143–145
- Lee G, Park JH 2004: Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 311–323
- 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, 197–206
- Nässel DR, Winther AME 2010: *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Progress in Neurobiology* 92, 42–104
- Noyes BE, Katz FN, Schaffer MH 1995: Identification and expression of the *Drosophila* adipokinetic hormone gene. *Molecular and Cellular Endocrinology* 109, 133–141
- O' Shea M, Witten J, Schaffer M 1984: Isolation and characterization of two myoactive neuropeptides: further evidence for an invertebrate peptide family. *Journal of Neuroscience* 4, 521–529
- Ohtsu T, Kimura MT, Hori SH 1992: Energy storage during reproductive diapause in the *Drosophila melanogaster* species group. *Journal of Comparative Physiology* 162, 203–208
- Pener MP, 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, 513–524

- Reyes-Dela Torre A, Peña-Rangel MT, Riesgo-Escovar 2012: Carbohydrate Metabolism in *Drosophila*: Reliance on the disaccharide Trehalose. In: Carbohydrates – Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology, (Ed: Riesgo-Escovar a kol.) 318–338
- 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* 1–8 In press.
- Scaraffia PY, Wells MA 2003: Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. *Journal of Insect Physiology* 49, 591–601
- Scarborough RM, Jamieson GC, Kalish F, Kramer SJ, McEnroe GA, Miller CA, Scooley DA 1984: Isolation and primary structure of two peptide 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, 5575–5579
- Seifter S, Dayton S, Novic B, Muntwiler E 1950: The Estimation of glycogen with the Anthrone Reagent. *Archives of biochemistry and biophysics* 25, 191–200
- 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, 315–320
- Socha R, Kodrík D, Šimek P, Patočková M 2004: The kind of AKH-mobilized energy substrates in insects can be predicted without a knowledge of the hormone structure. *European Journal of Entomology* 101, 29–35
- Socha R, Kodrík D, Zemek R 1999: Adipokinetic Hormone Stimulates Insect Locomotor Activity. *Naturwissenschaften* 86, 85–86
- Spencer IM, Candy DJ 1976: Hormonal control of diacylglycerol mobilization from fat body of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. *Insect Biochemistry* 6, 289–296
- Stone JV, Mordue W, Batley KE, Morris HR 1976: Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature* 263, 207–211
- Stoscheck CM 1990: Quantitation of proteins. In: *Methods in Enzymology*. Academic Press, Inc. 182, 50–68
- Trincavelli ML, Daniele S, Martini C 2010: Adenosine receptors: what we know and what we are learning. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 10, 860–877
- Van der Horst DJ, Van Marrewijk WJA, 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 AThM, Beenackers AMT 1980: Regulation of glycogenolysis in the locust fat body during flight. *Insect Biochemistry* 10, 675–679
- Vroemen SF, Van der Horst DJ, Van Marrewijk WJA 1998: New insights into adipokinetic hormone signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 141, 7–12
- Vroenen SF, Van Marrewijk WJA, De Meijer J, Van Broek AThM, Van der Horst DJ 1997: Differential induction of inositol phosphate metabolism by three adipokinetic hormones. *Molecular and Cellular Endocrinology* 130, 131–139
- Zöllner N, Kirsch K 1962: Über die quantitative Bestimmung von Lipoide (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfo-phosphovanillin-Reaktion. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin* 135, 545–561
- Žuberová M, Fencková M, Šimek P, Janečková L, Doležal 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, 773–784

8 PŘÍLOHA

8.1 Příprava roztoků

Ringerův roztok (fyziologický roztok)

- Kvantitativně připravit 1 litr roztoku (rozpuštědlo dH₂O).
 - 7,5 g NaCl; 0,1 g KCl; 0,2 g CaCl₂ · 2H₂O; 0,4 g MgCl₂ · 6H₂O

Kontrolní roztok

- Kvantitativně připravit 100 ml roztoku metanol v Ringerově roztoku.
 - 20 ml metanolu, 80 ml Ringerova roztoku

Roztok Drome-AKH

- Hormon Drome-AKH o koncentraci 184,646 pmol/μl naředit na roztok o koncentraci 3 pmol/μl. Naředit kontrolním roztokem.

Tris-HCl pufr, pH 7,8,

- Kvantitativně připravit 1 litr roztoku, upravit pH s HCl (rozpuštědlo dH₂O).
 - 0,1 M Tris-HCl pH 7,8= 1, 211g; 0,2 M Tris-HCl pH 7,8= 2,422g

Reakční činidlo 1

(50mM NaOH)

- Kvantitativně připravit 1 litr roztoku (rozpuštědlo dH₂O).
 - 2 g NaOH

Reakční činidlo 2

- Kvantitativně připravit roztok z reakčního činidla 1 a borohydrátu na potřebné množství.
 - 10 mg borohydrátu, 1 ml 50mM NaOH

Reakční činidlo 3

- Kvantitativně připravit 1 litr roztoku ledové kyseliny octové (rozpuštědlo dH₂O).
 - 11,6 ml ledové kyseliny octové

Anthronové činidlo

- Kvantitativně připravit roztok anthronu v 100 ml 72% H_2SO_4 .
 - 150 mg anthronu, 72% H_2SO_4

Fosfovanilínové činidlo

- Kvantitativně připravit 1 l roztoku fosfovanilínového činidla.
 - 1,98 g vanilinu, H_3PO_4

Metoda přípravy fosfovanilínového činidla

- Rozpustit 1,98 g vanilinu v 668 ml kyseliny fosforečné (H_3PO_4), 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.

Příprava diety pro octomilky

1) Použitý materiál

- Kukuřičná mouka – 120 g v 1,4 l vody
- Agar – 15 g
- Cukr – 75 g
- Instantní kvasnice 60 g
- Konzervant (10% methylparaben v etanolu) – 50 ml

2) Metoda přípravy diety

- Vypéct zkumavky (2 hodiny při 180 °C); vypéká se souběžně s vařením, kukuřičnou mouku vařit v 1,2 l vody 1 hodinu při teplotě 95 °C, agar rozmíchat v 300ml vody, po hodině do rozvařené mouky přidáme rozpuštěný agar, cukr a kvasnice. Vaříme další hodinu při stejné teplotě, před koncem druhé hodiny snížit teplotu na 50 °C a přidat konzervant a důkladně promíchat. V tomto kroku je dieta připravena na rozlití (asi 20 minut před koncem vaření je dobré vyndat vypečené zkumavky a nechat trochu zchladit. Nenalévat dietu do úplně studených zkumavek, voda kondenzuje na povrchu diety. Jedna dávka 1,5 l diety je cca 160 zkumavek).

8.2 Použité zkratky

ADGF-A	adenosin deaminázový růstový faktor A
Ado	adenosin
Ador	adenosinový receptor
AdoR-def	linie Adenosin Receptor-deficientních much
AKH	Adipokinetický hormon
AKH-def	linie AKH-deficientní much
AMP	adenosin monofosfát
AMPK	aktivovaná AMP proteinkináza
Drome-AKH	Adipokinetický hormon u <i>Drosophila melanogaster</i>
ExAdoR-def	linie Exelixis-AdoR-deficientních much
GIRKs	draselné kanály ovládané G-proteinem
G _s /G _q	G proteinové receptory
NT	nukleosidový transport
PhK	fosforyláza-kináza
CC	corpora cardiaca
PLC	fosfolipáza C
R-AKH	linie much Rescue-AKH, zachráněný AKH-def
White	kontrolní linie much
CA	corpora alata
AKH/RPCH	adipokinetický hormon/red pigment concentrating hormone
IP3	inositol-1, 4,5-trifosfát
DAG	diacylglycerol
TAG	triacylglycerol
HDLp	high density lipophorin
BCA	bicinchoninová kyselina