

Bakalářská diplomová práce

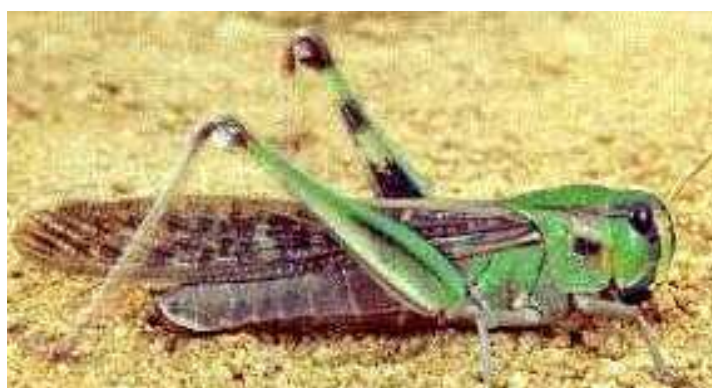
Biologická fakulta Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích



**Studium produktů prothorakálních žláz u saranče stěhovavé
(*Locusta migratoria L.*)**

Miroslava Lusková

2007



Vedoucí práce: doc. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.

Bakalářská diplomová práce

Miroslava Lusková (2007): Studium produktů prothorakálních žláz u saranče stěhovavé (*Locusta migratoria* L.). [Study of Prothoracic gland Products of Migratory Locust (*Locusta migratoria*). Bc. Thesis, in Czech.] – 28 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Prothoracic glands secrete ecdysteroids and protein products. The protein products of the prothoracic gland from the African migratory locust, *Locusta migratoria* were a subject of this study. The secretion of the proteins is enhanced during *in vitro* incubation by tris [tris(hydroxymethyl)aminomethan] while the content of non-secretory proteins remains without substantial changes.

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 - v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných biologickou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím literatury uvedené v seznamu literatury, který je součástí práce.

V Českých Budějovicích dne 7.5.2007

Lusková Miroslava

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Daliboru Kodříkovi, CSc. za odborné vedení, čas věnovaný konzultacím a cenné připomínky při vypracování této práce. Také bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Jiřímu Šulovi za pomoc při vypracování výsledků. Ze všeho nejvíce patří mé díky mým nejbližším, mé rodině a přátelům, za poskytnutí zázemí a morální podpory při vzniku této práce a během celého studia.

Obsah

1. Úvod.....	5
1.1. Endokrinní soustava hmyzu.....	5
1.1.1. Přehled hmyzích endokrinních žláz.....	5
1.2. Prothorakální žlázy	6
1.3. Ekdysteroidy.....	6
1.3.1. Ekdyson.....	7
1.3.2. Řízení syntézy ekdysteroidů.....	7
1.3.3. Funkce ekdysteroidů.....	8
1.4. Prothorakální žlázy u sarančí <i>Locusta migratoria</i>	9
2. Cíl práce.....	10
3. Materiál a metody.....	11
3.1. Chov saranče stěhovavé <i>Locusta migratoria</i>	11
3.2. Pitva prothorakálních žláz.....	11
3.3. Inkubace.....	11
3.4. Příprava vzorků na elektroforetickou analýzu bílkovin.....	11
3.5. Polyakrylamidová SDS elektroforéza.....	12
3.6. Použití dusičnanu stříbrného.....	13
3.7. Software a vypracování výsledků.....	13
4. Výsledky.....	14
4.1. Bílkoviny prothorakálních žláz.....	14
4.2. Vliv trisu na syntézu bílkovin v prothorakálních žlázách.....	15
4.3. Vliv trisu na vylučování bílkovin z prothorakálních žláz do media.....	19
5. Diskuse.....	23
5.1. Ovlivnění stimulace prothorakálních žláz.....	23
6. Závěr.....	24
7. Literatura.....	25

1. Úvod

1.1. Endokrinní soustava hmyzu

Evoluce endokrinní soustavy je úzce spojená se vznikem nervové soustavy. Nejstarší hormony vznikaly v nervových buňkách. Žlázy nezávislé na nervové soustavě jsou z vývojového hlediska podstatně mladší. Endokrinní soustava funguje relativně pomalu a jí řízené procesy mají dlouhodobější charakter zatímco nervová soustava se využívá při rychlé a pružné regulaci. Nervová soustava reguluje organismus pomocí akčního potenciálu a chemických látek, endokrinní soustava využívá jen chemické látky. Obě soustavy nefungují izolovaně, ale naopak tvoří integrovaný funkční systém. Soustava žláz s vnitřní sekrecí (endokrinní žlázy) produkuje hormony. Jsou to chemické látky, které přenášejí informace mezi buňkami. Roli hormonu realizuje uvnitř buňky enzym, který v buňce ovlivňuje specifické reakce. Mechanismus účinků hormonů je dvojího typu. Hormony aktivují již existující enzymy nebo vyvolají syntézu nových enzymů. V neurosekretorických buňkách jsou syntetizovány neurohormony, které se dostávají do hemolymfy přes neurohemální orgány. V endokrinních žlázách jsou právě hormony nejen syntetizovány, ale jsou z nich uvolňovány do krve nebo hemolymfy. U bezobratlých je mnoho peptidických neurohormonů (u obratlovců jen dva), ale nacházíme zde zase málo pravých hormonů. U bezobratlých a obratlovců jsou stejné základní stavení jednotky hormonů: aminokyseliny, peptidy, bílkoviny, steroidy. Nejdokonalejší endokrinní soustava mezi bezobratlými se vyvinula u koryšů a u hmyzu.

1.1.1. Přehled hmyzích endokrinních žláz

Centrem hormonální soustavy u hmyzu jsou neurosekretorické buňky mozku (mediální nebo laterální), které jsou spojeny nervovými vlákny s corpora alata (přilehlá tělíska) a corpora cardiaca (kardiální tělíska). Tento komplex produkuje hormony, které mají buď přímo výkonnou funkci nebo řídí další endokrinní žlázy. Corpora alata produkují juvenilní hormon a corpora cardiaca převážně adipokinetický hormon. Dalším důležitým endokrinním centrem jsou prothorakální žlázy. Kromě těchto žláz je hmyzí endokrinní soustava doplněna několika skupinami buněk (tkání), které také produkují hormony. Patří sem neurosekretorické buňky ostatních ganglií, endokrinní buňky střeva, epitracheální žlázy a gonády.

1.2. Prothorakální žlázy

Tyto žlázy byly poprvé popsány v roce 1762 Lyonetem, který si ale nebyl jist, zda se jejich produkty opravdu účastní svlékání a metamorfózy. Tomaya je znovu objevil v roce 1902 u larev bource morušového, ale pojmenování „prothorakální žlázy“ navrhl až v roce 1930.

Buňky prothorakálních žláz mají původ v ektodermální tkáni embrya. Jsou to párové orgány jejichž buňky jsou u Hemimetabol malé. U motýlů tvoří nepevný shluk buněk široce rozprostřený v prothoraxu, který může dosahovat až k hlavové oblasti. U housenek můry *Hyalophora cecropia* žlázy tvoří volný shluk buněk (47x22 μm u čtvrtého instaru) rozprostřený kolem tracheální větve blízko prothorakálního stigma (Nation, 2002). U všech druhů sarančí se nacházejí v zadní části hlavy. U Holometabol jsou prothorakální žlázy velké a polyploidní. U švába žlázy tvoří tvar písmene „X“. U Diptera prothorakální žlázy spolu s corpora alata a corpora cardiaca tvoří kruhovou žlázu. Buňky žláz jsou inervovány z prothorakálního ganglia, mozku a také ze suboesophageálního ganglia.

Regulace činnosti prothorakálních žláz je složitá a byla nejvíce studována u *Bombyx mori* a *Manduca sexta* (Dedos a kol., 1999). Primárně jsou tyto žlázy regulované PTTH (prothoracicotropní hormon), ale fyziologický význam mnohonásobných molekulových forem PTTH není doposud znám.

Prothorakální žlázy byly identifikovány jako hlavní zdroj hmyzích ekdysteroidů (Hoffmann a Koolman., 1974). Bylo zjištěno, že prothorakální žlázy vylučují do hemolymfy také některé proteiny (Šafránek a Williams, 1980), u nichž se předpokládá, že by se mohly podílet na ekdysteroidogenezi.

1.3. Ekdysteroidy

Tyto svlékací hormony se vyskytují u monofyletické skupiny živočichů *Ekdysozoa*, zahrnující *Cephalorhyncha*, *Nematomorpha*, *Nematoda*, *Onychophora*, *Tardigrada*, *Chaetognatha* a *Arthropoda*. Ekdysteroidy jsou lipofilní steroidní hormony, které díky své rozpustnosti v tucích snadno pronikají přes membránu do buňky a nepotřebují tedy specifický membránový receptor. Steroidní hormony v cytoplazmě reagují se specifickými bílkovinami - hormonálními receptory. Ekdysteroidové receptory jsou proteiny o molekulové hmotnosti asi 100 kDa a vyskytují se v buňce v extrémně nízké koncentraci. Přibližně 1000 molekul receptoru na buňku. Vzniklý komplex přechází do jádra buňky, kde reaguje s nehistonovou částí chromatinu. Pak dojde k disociaci komplexu na dvě podjednotky: jedna zůstane vázána na bílkovinu a druhá reaguje s DNA, kde tvoří iniciační místo pro RNA-polymerázu.

Dochází k transkripci příslušného genu a vzniklá mRNA přejde do cytoplazmy, kde se na ribozomech syntetizuje enzym.

Svlékačí hormony se vylučují hlavně v prothorakálních žlázách, ale také v gonádách, epidermis, tukovém tělese, Malpigických trubicích a snad i v jiných tkáních. Z prothorakálních žláz jsou exocytózou uvolňovány do hemolymfy. Celý proces syntézy je spuštěn na základě stimulů z mozku prostřednictvím PTTH. Koncentrace ekdysteroidů v hemolymfě je kontrolována kombinací biosyntézy, odbourávání a exkrece. Poměr těchto procesů je koordinován a kolísá během vývoje (v době snížené biosyntézy jsou metabolismus a exkrece zvýšeny a naopak).

U některých druhů hmyzu se vyvinula závislost parazitoidů na hostitelských ekdysteroidech. Příkladem toho je parazitoid *Biosteres longicaudatus* a karibská octomilka *Anastrepha suspensa* (Lawrence, 1986). Parazitoid neprodukuje vlastní svlékačí hormon, ale využívá svlékačí hormon hostitele. Parazitoid se nesvléká dokud hostitel nezačne sekretovat ekdyson k iniciaci své vlastní transformaci larvy na kuklu (Gelman a kol., 2000).

Mimochodem, ekdysteroidy byly také nalezeny u rostlin (Lafont a Horn, 1989). Fytoekdysteroidy slouží rostlinám jako ochrana proti herbivornímu hmyzu - jako toxiny nebo antifeedanty.

1.3.1. Ekdyson

Nejznámější zástupce ekdysteroidů je ekdyson. Steroidní hormon s obvyklým čtyřkruhovým jádrem (steranem), ketoskupinou na B kruhu a pěti hydroxylovými skupinami. Prothorakální žlázy neuchovávají ekdysteroidy, ale rychle je vylučují do hemolymfy. Ekdyson má pravděpodobně svou vlastní hormonální aktivitu, ale ve většině případů je ihned přeměněn pod kontrolou enzymu 20-hydroxymonooxygenaza na 20-hydroxyekdyson. Enzym 20-hydroxymonooxygenaza je přítomen ve většině hmyzích tkáních mimo prothorakálních žláz. Speciálně Malpigické trubice, střevo a tukové těleso jsou na tento enzym bohaté.

1.3.2. Řízení syntézy ekdysteroidů

Tento děj je vykonáván pomocí PTTH, který je produkován neurosekretorickými buňkami v mozku. PTTH je přenášen ve formě granulí do neurohemálního orgánu, z kterého je uvolňován do cirkulující hemolymfy. Tímto orgánem je u většiny druhů hmyzu párová žláza corpora cardiaca, jinde jsou to corpora allata (CA) (Aguí a kol., 1980).

Je známo, že PTTH existuje ve dvou různých molekulárních formách: relativně malé peptidy okolo 4,4 kDa a velké formy s molekulární hmotností okolo 22 kDa (Bollenbacher a

kol., 1983). Později bylo prokázáno, že velké formy mají až okolo 30 kDa. Malé formy PTTH jsou známy jako bombyxin, protože byly izolovány z *B. mori*. Velký PTTH indukuje prothorakální žlázy k produkci ekdysteroidů (Kawakami, 1990).

1.3.3. Funkce ekdysteroidů

Ekdysteroidy hrají hlavní roli v regulaci hmyzího růstu, při svlékání embryí a larev, v řízení metamorfózy (Gilbert a kol., 1989). Tři vývojová stádia v životním cyklu hmyzu se ukázala být pod kontrolou ekdysteroidů: embryonální vývoj, post-embryonální vývoj během několika larválních stádiích (zahrnující fázi kukly u Holometabol) a období rozmnožování (Hoffmann a Lagueux, 1985). Ekdysteroidy ovlivňují také metabolické procesy, diapauzu a stimulují proteosyntézu.

V období svlékání a larválně-imaginální přeměny dochází k velkému kolísání titru ekdysteroidů v hemolymfě, což je časově korelováno se svlékacím procesem. U Holometabol i Hemimetabol dochází k prudkému nárůstu titru ekdysteroidů na začátku každého larválního svlékání (titr ekdysteroidů roste před apolýzou staré kutikuly) dosahuje maxima v době nebo krátce po apolýze a klesá na nízkou úroveň po ekdysi. Hladina titru ekdysteroidů podléhá také circadiánním změnám, které souvisí s circadiánním uvolňováním PTTH z mozku.

U metamorfózy Hemimetabol se uvolňuje jedna velká dávka ekdysteroidů. U většiny Lepidoptera se ekdysteroidy vylévají ve dvou dávkách. První dávka obsahuje ekdyson i 20-hydroxyekdyson (1:1) a slouží k nastartování vývoje larvy v kuklu. Během druhé dávky se vylučuje ekdyson a 20-OH-E v poměru 1:5. Larva se začne svlékat. Po jejím zakuklení dojde k velkému vylití ekdysteroidů pro imaginární vývoj.

U dospělců *S. gregaria* se titr ekdysteroidů v hemolymfě liší u soliterních a gregarijních jedinců. Vyšší hodnoty titru ekdysteroidů byly zaznamenány u soliterních jedinců (Tawfik a kol., 1996). Ekdysteroidy mohou také působit na produkci agregačních feromonů, které byly identifikovány u gregarijních nymf *S. gregaria* (Torto a kol., 1996).

Jestliže kukla prodělává diapauzu, nárůst titru ekdysteroidů v hemolymfě je pozdržen až do doby, kdy diapauze skončí (Sakutai a kol., 1991).

Ekdysteroidy se podílejí také na řízení rozmnožování u samců i samic. U samic jsou produkovány ováriemi a odtud ve formě konjugátů ukládány do zrajících vajíček. Kolísání množství konjugátů a změny ve složení ekdysteroidů během embryogeneze naznačují, že ekdysteroidy kontrolují embryonální procesy. Obsah konjugátů se snižuje v první polovině embryonálního vývoje *S. gregaria*. V druhé polovině je obsah konjugátů redukován z původních 80% na 45-55%, zatímco obsah volných ekdysteroidů roste z původních 5% na

30-40%. Ke konci embryonálního vývoje pokles množství konjugátů koreluje s líhnutím vajíček (Tawfik a kol., 1999). Vlastní embryonální ekdysteroidy se u *S. gregari*, kde zahrnují 26-hydroxyekdyson, 22,26-dihydroxyekdyson, vyskytují zřídka nebo úplně chybí (Lagueux a kol., 1979). Prothorakální žlázy u sarančí jsou formovány již v době blastokineze (Roonwal, 1936) a mohou tak být zdrojem ekdysteroidů nalezených v druhé polovině embryogeneze.

O vlivu na samčí pohlavní ústrojí je mnohem méně důkazů. Je ale známo, že samci mají nižší hladinu ekdysteroidů než samice, existují však i výjimky. V předposledním instaru *S. gregaria* je maximum koncentrace ekdysteroidů 3.0-4.0 µg/ml 20-hydroxyekdysonu u samic a 2.5-3.0 µg/ml 20-hydroxyekdysonu u samců. V posledním instaru je nejvyšší koncentrace 1,5-2,0 µg/ml u obou pohlaví (Tawfik a kol., 1996). Samčí ekdysteroidy ovlivňují tvorbu spermatoforu a spermatogenezi. Po kopulaci dochází ke zvýšení hladiny ekdysteroidů.

1.4. Prothorakální žlázy u sarančí *Locusta migratoria*

Syntetická aktivita prothorakálních žláz se během vývoje *L. migratoria* mění. Kolísání produkce ekdysonu prothorakálními žlázami v předposledním (délka 5 dní) a posledním (délka 7 dní) instaru je paralelní se změnami titru ekdysonu v hemolymfě, do které se ekdyson vylučuje. Bazální sekrece ekdysonu je nejnižší v předposledním IV. (množství ekdysonu 0,017–0,06 ng na žlázu) a v posledním V. instaru ihned po svlečení. Nejvíce ekdysonu bylo zaznamenáno v V/5-7 (maximální hodnoty okolo 0.25 ng na žlázu) (Neuwirth a kol., 2005). (Značení vývojového stádia: římská číslice odpovídá larválnímu instaru a arabská označuje den od posledního svlečení).

Jsou-li prothorakální žlázy inkubovány *in vitro* spolu s mozky, produkce ekdysonu se zvýší až 30krát. Největší množství ekdysonu se získalo ze žláz IV/2.-3. a V/5.-6 (Li a kol., 1997).

Experimentálně se prokázalo, že sekrece ekdysteroidů prothorakálními žlázami *in vitro* u *L. migratoria* je zvýšena po přidání trisu [tris(hydroxymethyl)aminomethan] (Neuwirth a kol., 2005). Stimulační účinek trisu se pohybuje v rozmezí dvojnásobku až šestnáctinásobku kontrolní bazální sekrece v závislosti na stáří jedince. Nejvyšší rozdíl mezi trisem vyvolanou produkcí ekdysonu a bazální nestimulovanou sekrecí je ve stádiu IV/2 (produkce maximálně 0,2 ng ekdysonu na žlázu, ale konečná stimulace je více než šestnáctinásobná). Na rozdíl tomu stimulační aktivita je nízká na konci předposledního i posledního instaru (Neuwirth a kol., 2005).

Stimulační efekt trisu na prothorakální žlázy u sarančí je spojen s Ca^{2+} ionty. Poté co se podařilo prokázat nezbytnost vápenatých iontů pro PTTH vyvolanou ekdysteroidogenezi

(Smith a kol., 1985), byla předmětem studia myšlenka uvolnění vápníku z vnitrobuněčných zdrojů (Girgenrath, Smith., 1996). Stimulační efekt trisu na sekreci ekdysteroidů prothorakálními žlázami u sarančí určuje Ca^{2+} ionty jako význačné druhé posly v kaskádě jejich regulace (Neuwirth a kol., 2005). Uvolnění vápníku z endoplazmatického retikula je vyvoláno až po trisem stimulovaném vstupu mimobuněčného Ca^{2+} do buněk, který je uskutečňován L typem napěťově řízených kanálů přítomných ve vnější membráně prothorakálních žláz (Neuwirth a kol., 2005). L typ napěťově řízeného kanálu je aktivován silnou depolarizací a je blokován dihydropyridinovými nebo phenylalkylaminovými deriváty. Přidávání trisu do kultivačního média zvýšilo obsah Ca^{2+} iontů v prothorakálních žlázách přímo úměrně s koncentrací trisu (Neuwirth a kol., 2005). Trisem stimulovaná produkce ekdysonu v prothorakálních žlázách nebyla pozorována v bezvápeném mediu nebo za přítomnosti inhibitorů L typu Ca^{2+} kanálů: kadmia, verapamilu. Pozitivní role vápenatých iontů uložených v endoplasmatickém retikulu byla také potvrzena použitím antagonistů inositoltrifosfátových receptorů (ovlivňují uvolňování Ca^{2+} z vnitrobuněčných zdrojů, například endoplazmatického retikula) thapsigarginu a heparinu.

2. Cíl práce

Cílem mé práce bylo inkubovat prothorakální žlázy z posledního (V.) instaru *L. migratoria* *in vitro* a analyzovat bílkoviny produkované do média. Dalším cílem bylo zjistit, zda lze tuto *in vitro* produkci bílkovin modifikovat aplikací trisu [tris(hydroxymethyl)aminomethan] do inkubačního média.

3. Materiál a metody

3.1. Chov saranče stěhovavé *Locusta migratoria*

Saranče byly umístěny v drátěných klecích o rozměrech 40 x 40 x 40 cm zhruba stovka na jednu klec. Teplota byla udržována okolo 30⁰C a byl zaveden světelný režim 18 hodin světla a 6 hodin tmy (18 L:6 D). Jedinci byli krmeni trávou, nastrouhanou mrkví, zelím, ovesnými vločkami, senem a mimo vegetační období vzrostlou pšenicí. Celý vývojový cyklus jedince trvá 28 – 32 dní. Během této doby se vystřídá 5 instarů. Dospělé samice kladly vajíčka do kelímků s navlhčenou vysterilizovanou půdou. Pro pitvu byly použity nymfy z posledního V. instaru. Ve čtvrtém instaru se jedincům začínají formovat křídla.

3.2. Pitva prothorakálních žláz

Pitva těchto žláz není jednoduchá, navzdory tomu, že jejich délka je přibližně 3 mm, protože jsou průhledné a velice tenké. U sarančí jsou lokalizovány v zadní části hlavy. Po odříznutí hlavy těsně za hlavovou schránkou, byla hlavička umístěna na preparační misku pod binokulární lupu, upevněna entomologickými špendlíky a zalita hmyzím fyziologickým roztokem (*Ringerův fyziologický roztok). Žlázy byly opatrně vytahovány z hlavy jedince, nesměly být přetrženy a poté byly přeneseny do skleněných mikrozkušavek a následovala inkubace v médiu.

3.3. Inkubace

Větší množství prothorakálních žláz (20 párů) bylo inkubováno při 30⁰C po dobu 6 hodin za sterilních podmínek ve 400 µl Graceho media nebo ve 400 µl 50mM trisu [tris(hydroxymethyl)aminomethan] v Graceho mediu. K inkubaci byly použity mikrozkušavky o průměru 7 mm s plochým dnem; překrytím mikrozkušavek hliníkovou fólií se zabránilo odpařování média.

3.4. Příprava vzorků na elektroforetickou analýzu bílkovin

Po ukončení inkubace byly žlázy vyloveny z media a rozpuštěny ve vzorkovém pufru pro elektroforetické dělení**. Inkubační medium bylo nutno před elektroforetickou analýzou odsolit. Dělo se tak na kolonkách Sep Pak C18 (Waters) na přístroji Supelco následujícím způsobem:

- Aktivace kolony 5-10 ml 100% roztoku B (60% acetonitril/ 0,1% TFA- trifluoroctová kyselina). Při aktivaci promýváme kolonu nasazenou na injekční stříkačku po

kapkách 2-3 ml roztoku, počkáme přibližně 2 min. Pak po kapkách promýváme zbytek roztoku. Kolona během přípravy nesmí vyschnout a nesmí se do ní dostat vzduchová bublina. Toto schéma platí i pro ostatní přípravné kroky.

- Promýváme a ekvilibrujeme 5-10ml 100% roztoku A (0,11% TFA ve vodě).
 - Stejně po kapkách promyjeme kolonu roztok se vzorkem.
 - Vzorek vytékající z kolony jímáme a promyjeme kolonou ještě jednou, aby se na kolonu navázaly všechny v mediu přítomné bílkoviny.
 - Zbytky nenavázaných komponent vyjeme 5-10 ml 100% roztoku A.
 - Nakonec na kolonu navázané bílkoviny vymyjeme 100% roztokem B (1-2 ml) a 100% roztokem acetonitrilu (1-2 ml).
 - Odsolené médium dáme odpařit do vakuové centrifugy (Speed-Vac).
- Vzorky byly uchovány až do následného použití při -20°C .

3.5. Polyakrylamidová SDS elektroforéza

Elektroforéza bílkovin podle Laemmliho (1970) probíhala na 10% akrylamidovém gelu. Elektroforetické dělení probíhalo na přístroji Bio Rad model PROTEAN II. Pro vlastní separaci bílkovin byl užit vertikální SDS-polyakrylamidový gel o délce 16 cm a tloušce 0,75 mm. Dělení probíhalo přibližně 6 hodin v dělicím pufru (0,025 M tris, 0,192 M glycin a 0,1 % SDS).

Nejdříve bylo mezi ethanolem očištěná elektroforetická skla naléváno 20 ml spodního 10% (dělicího) gelu. Složení: 30% akrylamid (6,66 ml), 1% bisakrylamid (2,6 ml), 1M tris pH 8,7 (7,46 ml), H₂O (2,86 ml), 20% SDS (100 μl), TEMED (6,66 μl), 10% amonium persulfát (66,6 μl). Roztok byl poté převrstven 3mm vrstvou butanolu a ponechán asi 1 hodinu polymerizovat. Po zpolymerizování byl butanol odstraněn proudem destilované vody a odsán filtračním papírem. Poté byly nality 4 ml svrchního 5% (zaostřovacího) gelu. Složení: 30% akrylamid (0,66 ml), 1% bisakrylamid (1,04 ml), 1M Tris pH 6,8 (0,50 ml), 20% SDS (20 μl), H₂O (1,76 ml), TEMED (2 μl), 10% amonium persulfát (20 μl). Ihned po nalití svrchního gelu byl mezi skla zasunut hřeben, čímž se vytvořily jamky pro aplikaci vzorků. Pro nanášení 20 μl vzorků a 7 μl standartu byla použita injekční stříkačka (firma Hamilton), která byla po každém nanesení důkladně promyta destilovanou vodou. Byl užit standart M4 firmy SERVA. Jeho molekulové hmotnosti: 92,5; 67,0; 45,0; 29,0 kDa. Po nanesení vzorků elektroforéza běžela 6 hodin, nejprve při napětí 50 V (1 hodina). Postupně bylo napětí zvyšováno až na 220

V. Po skončení elektroforézy byl gel minimálně 1 hodinu barven v roztoku Coomassie Brilliant Blue R*** a přes noc odbarvován v odbarvovacím roztoku****. Po dostatečném odbarvení byla provedena reakce s dusičnanem stříbrným podle Kirkeby a kol. (1993).

3.6. Použití dusičnanu stříbrného

Dostatečně odbarvený gel barvíme podle daného postupu:

- 10 min v 40% ethanolu, 10% kyselině octové
- 5 min v 0,5% glutaraldehydu, 0,01% formaldehydu
- 20 min v 96% ethanolu
- 20 min v 50 ml destilované vody
- 2,5 min ve 0,05% Fermerově zeslabovači (30% ferrikyanid draselný, 10% uhličitan sodný, 60% thiosíran sodný)
- 30 min v 50 ml destilované vody
- 20 min v 0,1% dusičnanu stříbrném v destilované vodě
- 5 min v 2,5 % uhličitanu sodném v destilované vodě
- 3 x 2,5 min v 2,5 uhličitanu sodném v 0,02% formalinu
- 5 min v 1% kyselině octové

Mezi sedmým a desátým krokem promýváme destilovanou vodou.

*Ringerův fyziologický roztok: NaCl (7,5 g), KCl (0,1 g), CaCl₂ · 2H₂O (0,2 g), MgCl₂ · 6H₂O (0,4 g), NaHCO₃ (0,2 g). Vše rozpuštěno v 1 l H₂O a sterilizováno 2h při 100 °C.

**Vzorkový pufr pro elektroforetické dělení: 50 µl H₂O, 45 µl store solution, 5 µl beta-merkapt ethanolu a 5 µl BPD (bromphenolblue) na 100 µl pufru

***Barvicí roztok : 0,07 % Coomassie blue R, 7,5% ledová CH₃COOH, 50% MeOH ve vodě

****Odbarvovací roztok : 45,5% MeOH, 9% CH₃COO ve vodě

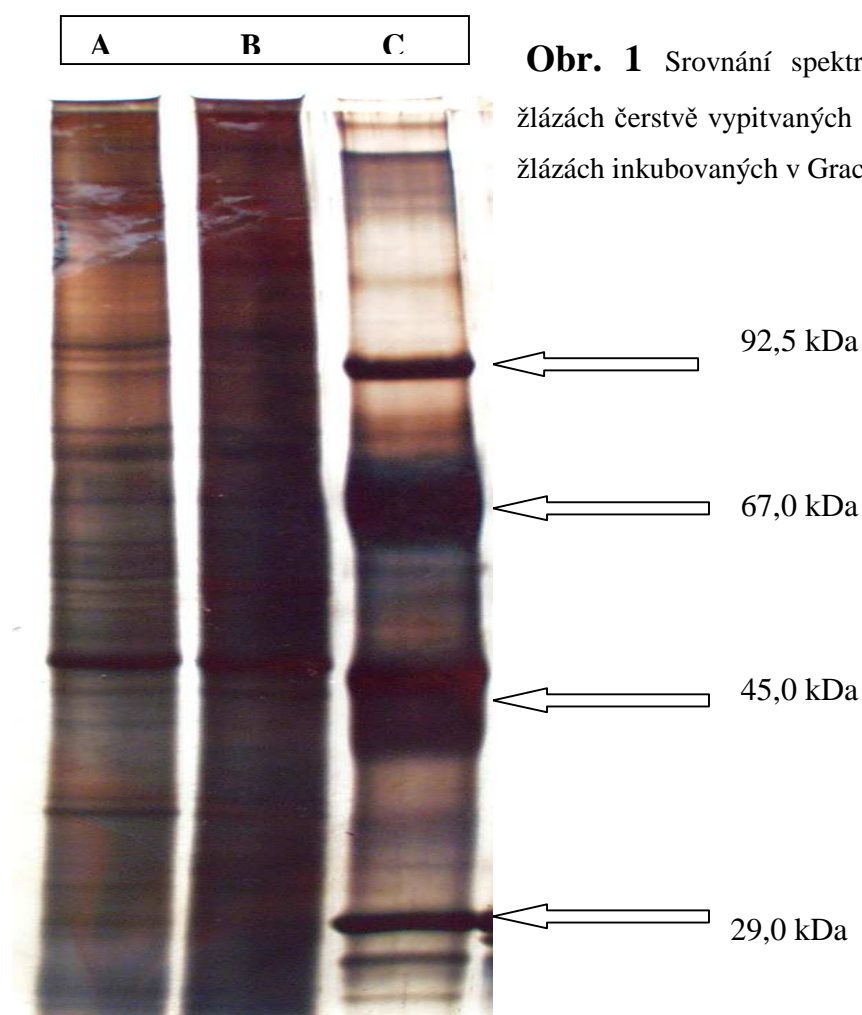
3.7. Software a vypracování výsledků

Fotografie gelů byly upraveny v programu Photofiltr (Antonio Da Gruz). Grafy byly konstruovány v programu Prism, verze 4 (San Diego USA) a výsledky byly vyhodnoceny pomocí softwaru QuantiScan verze 3.0, Biosoft 1996-2004.

4. Výsledky

4.1. Bílkoviny prothorakálních žláz

Cílem úvodních experimentů bylo zjistit, zda se mění zastoupení bílkovin v prothorakálních žlázách během jejich inkubace v Graceho mediu. Obrázek 1 srovnává spektrum bílkovin z prothorakálních žláz čerstvě vypitvaných z pokusných jedinců a bílkovin obsažených ve žlázách kultivovaných po dobu 6 hodin v Graceho mediu. Při celkovém pozorování obou spekter, se nezdá, že by v obou případech byly zřejmé podstatné rozdíly v obsahu a zastoupení bílkovin.

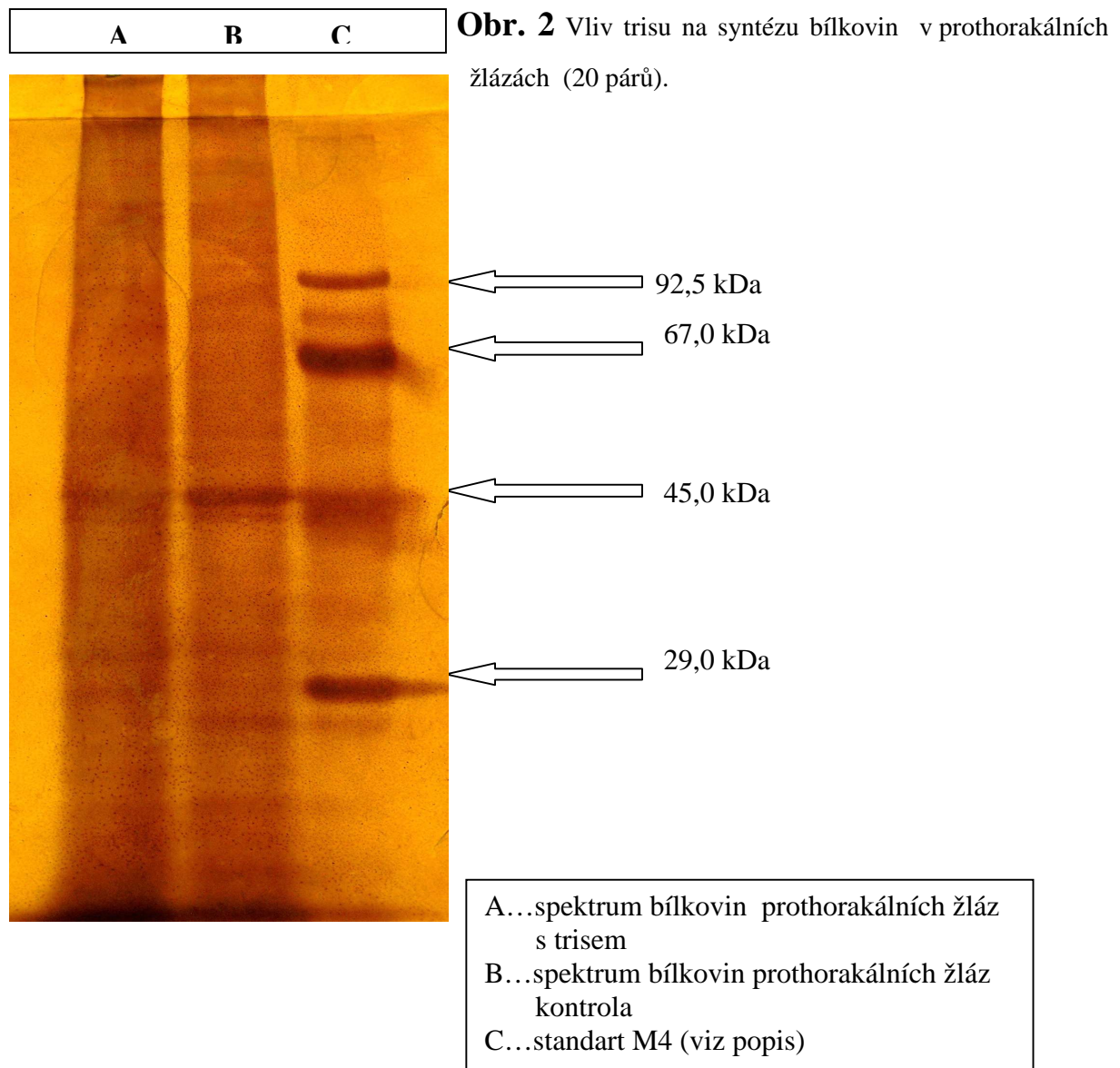


Obr. 1 Srovnání spektra bílkovin v prothorakálních žlázách čerstvě vypitvaných (20 párů) a v prothorakálních žlázách inkubovaných v Graceho mediu (20 párů).

A...spektrum bílkovin prothorakálních žláz
B...spektrum bílkovin prothorakálních žláz inkubovaných
C...standart M4 (viz popis)

4.2. Vliv trisu na syntézu bílkovin v prothorakálních žlázách

Další série experimentů měla za úkol zjistit, jestli přídavek trisu (50 mM koncentrace) do media nějakým způsobem modifikuje produkci bílkovin v prothorakálních žlázách. Obrázek 2 porovnává spektrum bílkovin takto ošetřených žláz (A) s kontrolou (B). Na první pohled je jasné, že toto spektrum se liší. Podrobná analýza pomocí QuantiScanu tento předpoklad prokázala (obrázek 3,4). Největší změny lze pozorovat v oblasti okolo 45-50 kDa a 30 kDa. Je však zajímavé, že celkový obsah bílkovin ve žlázách zůstává přibližně stejný (obrázek 5), což dokazuje součet ploch všech analyzovaných proužků (viz obrázek 4 vs. 5). To naznačuje, že tris nemá podstatný vliv na celkovou syntézu bílkovin v prothorakálních žlázách.



Obr. 3 Relativní zastoupení plochy peaků – prothorakální žlázy kontrola



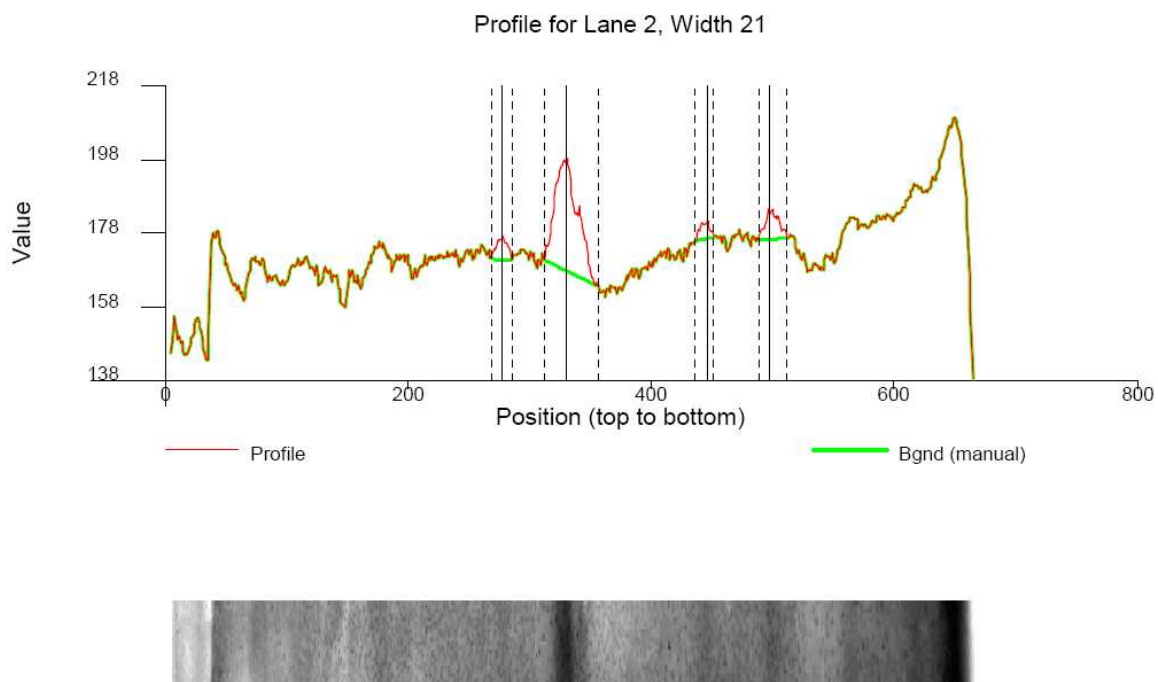
Lane width 21 pixels. Start 33, 6. End 40, 665
 Background correction: Manual

No calibration applied

Peak	Position	Units	Net. Ht.	Calc. Ht.	Net Area	Bgnd Area	Calc Width	Calc Area
Peak 1	478.38	478.00	4.02	N/A	34.83	2883.93	N/A	N/A
Peak 2	451.57	451.00	7.21	N/A	84.67	4738.10	N/A	N/A
Peak 3	330.56	330.00	6.93	N/A	175.16	6256.12	N/A	N/A
Peak 4	281.02	281.00	3.90	N/A	51.61	4101.25	N/A	N/A

celkem: 17 147

Obr. 4 Relativní zastoupení plochy peaků – prothorakální žlázy s trisem



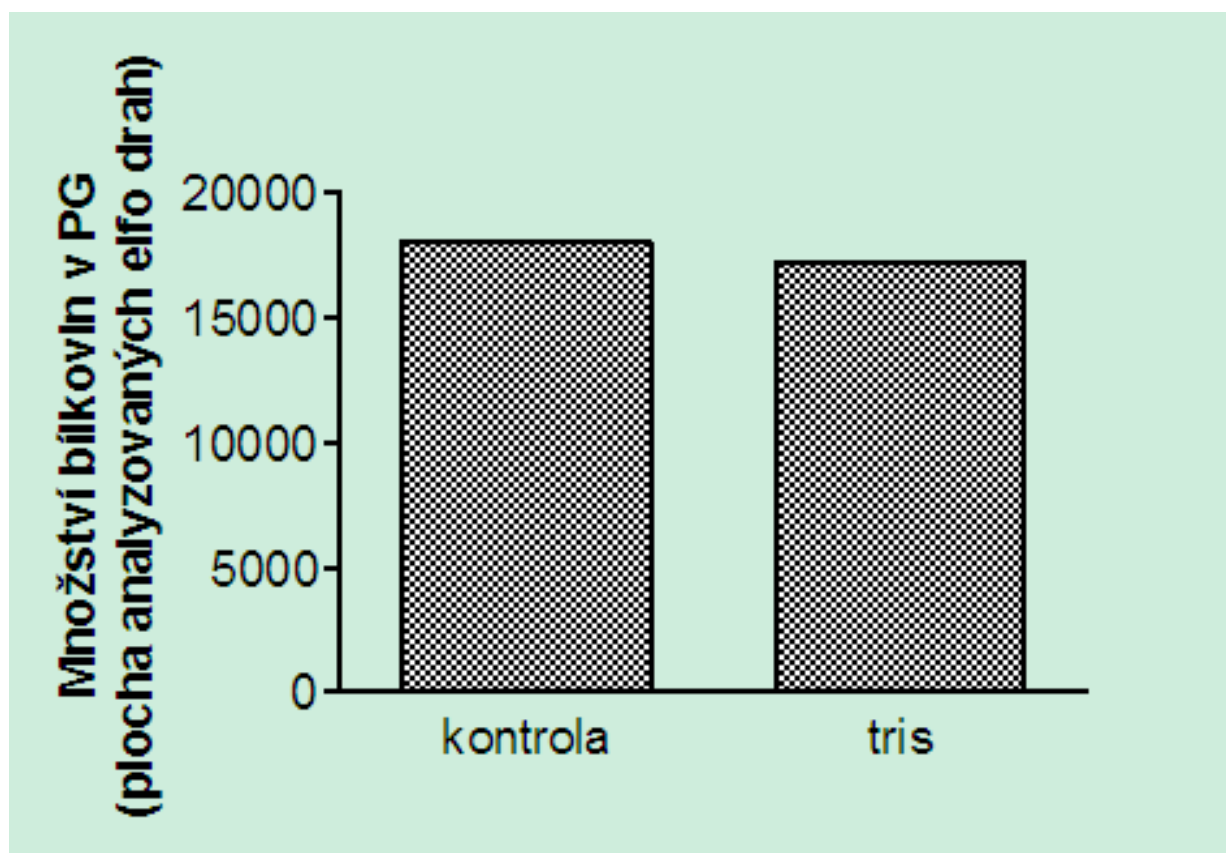
Lane width 21 pixels. Start 99, 5. End 120, 665
Background correction: Manual

No calibration applied

Peak	Position	Units	Net. Ht.	Calc. Ht.	Net Area	Bgnd Area	Calc Width	Calc Area
Peak 1	276.14	276.00	5.53	N/A	66.05	2906.86	N/A	N/A
Peak 2	329.75	329.00	28.91	N/A	658.72	7530.99	N/A	N/A
Peak 3	445.08	445.00	4.24	N/A	42.95	2647.86	N/A	N/A
Peak 4	497.06	497.00	6.69	N/A	101.38	4061.14	N/A	N/A

celkem: 17 979

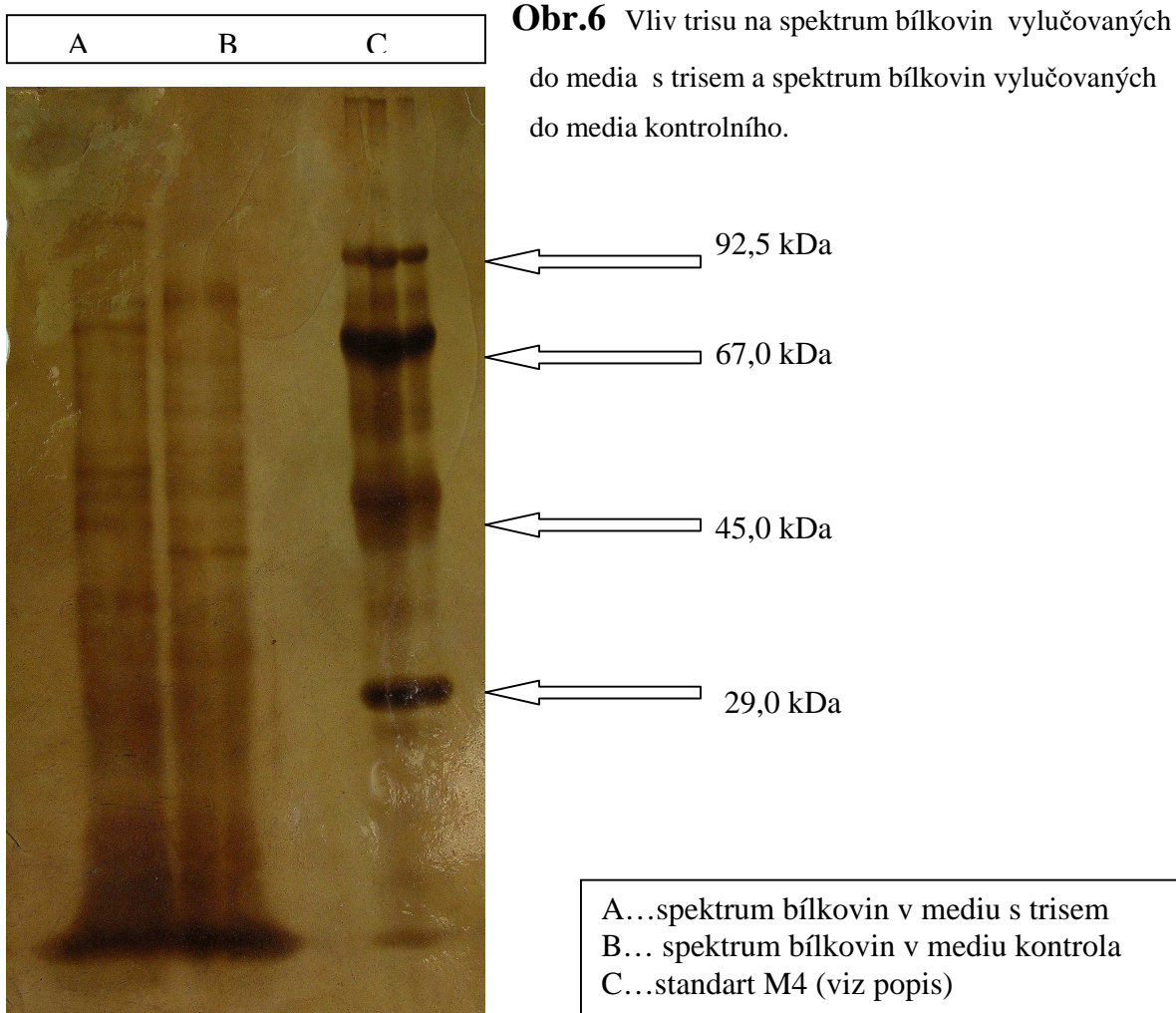
Obr. 5 Graf vyjadřující vliv trisu na obsah bílkovin v prothorakálních žlázách (PG) (vyjádřeno v součtu ploch všech analyzovaných bílkovin – viz obrázek 3+4)



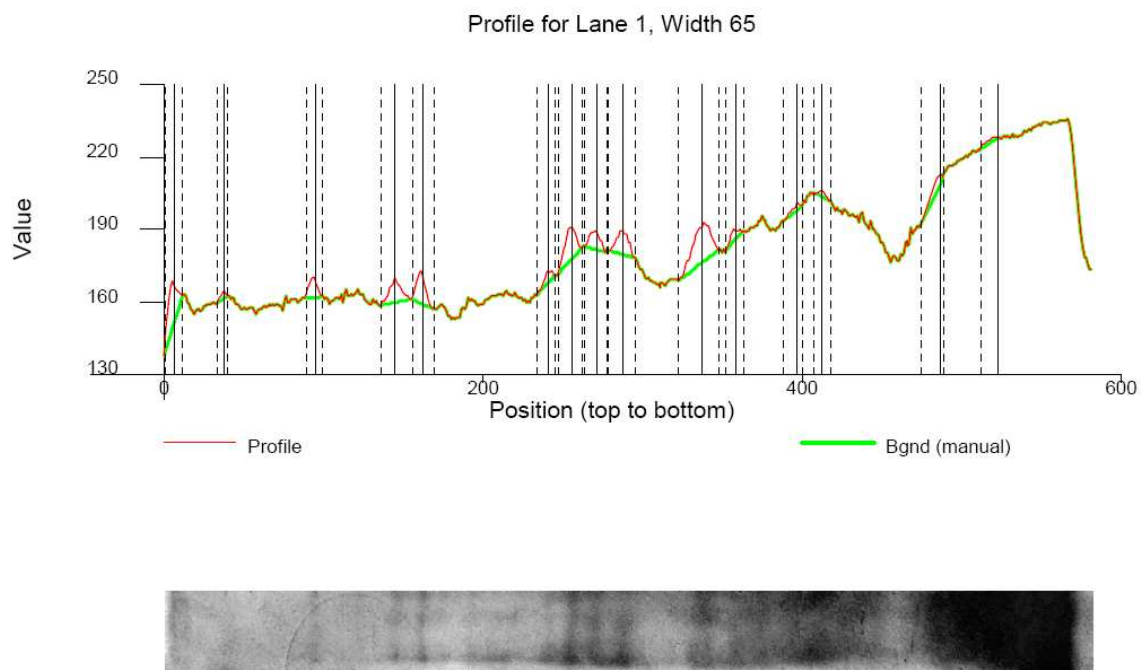
4.3. Vliv trisu na vylučování bílkovin z prothorakálních žláz do media

Obrázek 6 ukazuje, že tris přidávaný ve výše zmíněných experimentech do inkubačního media ovlivňuje spektrum bílkovin sekretovaných.

Podobně jako u bílkovin vlastních prothorakálních žláz i spektrum bílkovin uvolňovaných do media se v pokusných žlázách vůči kontrole měnilo (obrázek 7, 8). Došlo k nárůstu bílkovin v oblasti okolo 35- 37 kDa a 40-45 kDa. Na rozdíl od bílkovin prothorakálních žláz se však jejich celkové množství produkované do media s obsahem trisu zvyšovalo (obrázek 9). To naznačuje, že tris ovlivňuje produkci bílkovin *in vitro* spíše na úrovni bílkovin uvolňovaných do media. Jestli je tento účinek specifický či nikoliv a jaký je mechanismus působení není doposud známo.



Obr. 7 Relativní zastoupení plochy peaků – medium kontrola



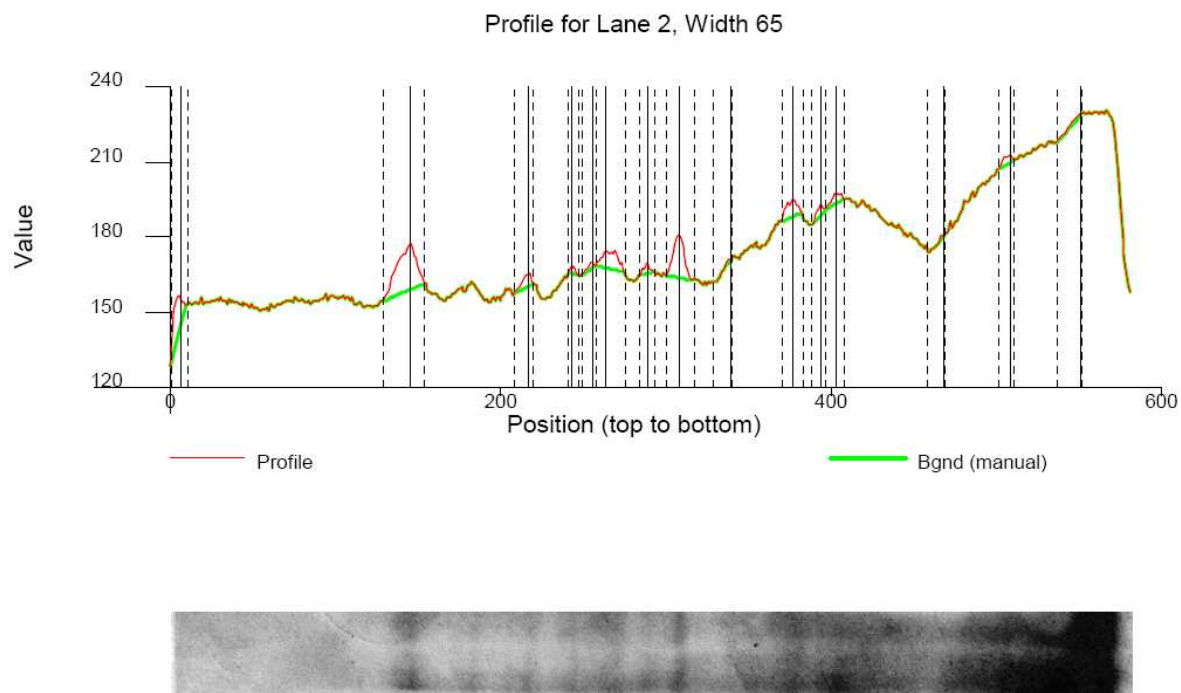
Lane width 65 pixels. Start 33, 1. End 33, 582
Background correction: Manual

No calibration applied

Peak	Position	Units	Net. Ht.	Calc. Ht.	Net Area	Bgnd Area	Calc Width	Calc Area
Peak 1	6.00	6.00	19.48	N/A	122.94	1805.44	N/A	N/A
Peak 2	38.00	38.00	3.35	N/A	11.30	1289.25	N/A	N/A
Peak 3	95.00	95.00	8.50	N/A	47.38	1783.38	N/A	N/A
Peak 4	145.00	145.00	10.39	N/A	78.74	3362.79	N/A	N/A
Peak 5	162.00	162.00	13.66	N/A	79.79	2389.10	N/A	N/A
Peak 6	240.61	240.00	4.87	N/A	26.48	2004.84	N/A	N/A
Peak 7	256.00	256.00	13.27	N/A	106.27	2830.00	N/A	N/A
Peak 8	271.00	271.00	7.98	N/A	60.98	2548.00	N/A	N/A
Peak 9	288.00	288.00	9.94	N/A	89.05	2883.38	N/A	N/A
Peak 10	337.00	337.00	15.07	N/A	211.89	4376.73	N/A	N/A
Peak 11	358.00	358.00	4.67	N/A	28.42	2220.47	N/A	N/A
Peak 12	397.00	397.00	3.43	N/A	15.81	2360.72	N/A	N/A
Peak 13	487.00	487.00	3.77	N/A	41.77	3222.13	N/A	N/A
Peak 14	522.00	522.00	0.88	N/A	12.00	2706.47	N/A	N/A

celkem: 30 207

Obr. 8 Relativní zastoupení plochy peaků – medium s triseem



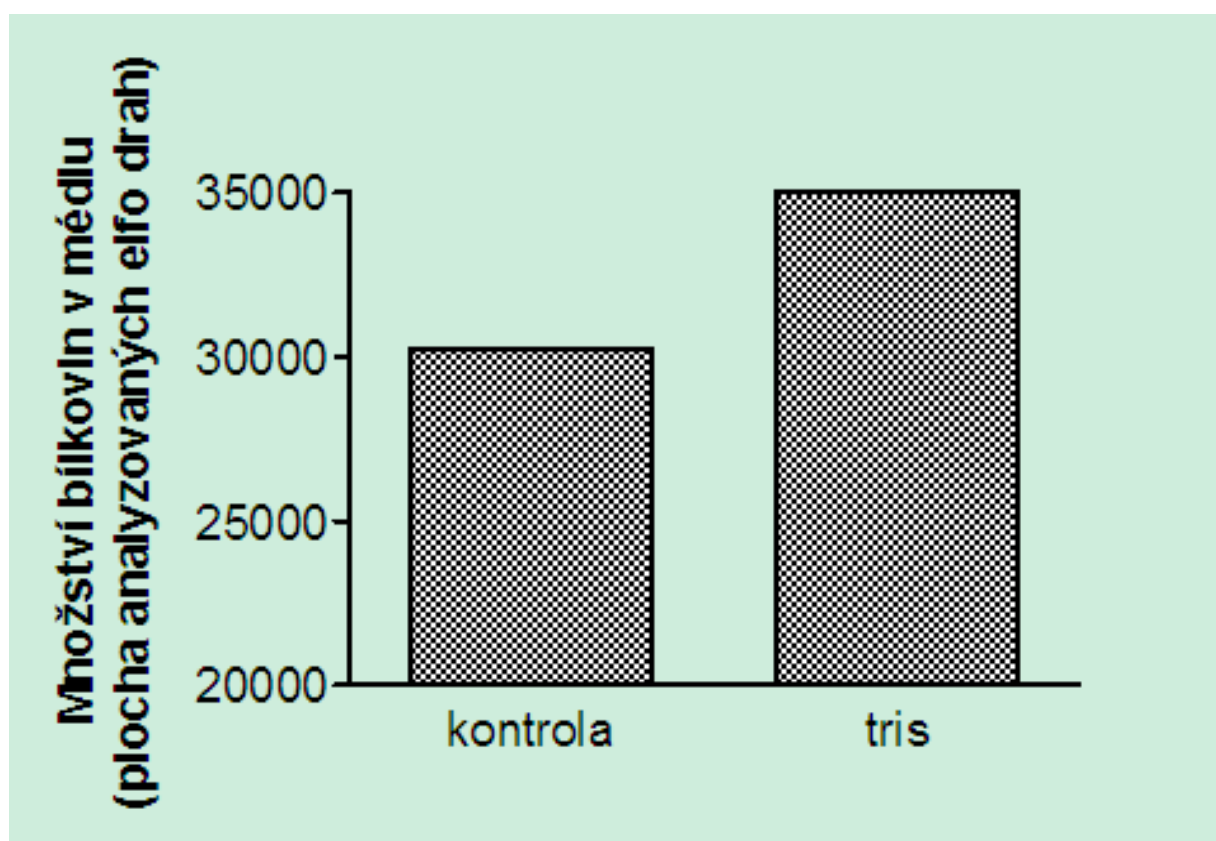
Lane width 65 pixels. Start 99, 1. End 99, 582
Background correction: Manual

No calibration applied

Peak	Position	Units	Net. Ht.	Calc. Ht.	Net Area	Bgnd Area	Calc Width	Calc Area
Peak 1	6.00	6.00	14.56	N/A	95.98	1408.46	N/A	N/A
Peak 2	146.00	146.00	18.36	N/A	244.14	4109.80	N/A	N/A
Peak 3	216.24	216.00	4.94	N/A	33.25	1752.98	N/A	N/A
Peak 4	243.05	243.00	2.57	N/A	11.46	1158.66	N/A	N/A
Peak 5	255.00	255.00	2.55	N/A	10.45	1666.46	N/A	N/A
Peak 6	264.00	264.00	6.61	N/A	78.37	3017.22	N/A	N/A
Peak 7	288.73	288.00	3.90	N/A	19.59	1655.47	N/A	N/A
Peak 8	308.00	308.00	17.09	N/A	134.62	2950.34	N/A	N/A
Peak 9	339.00	339.00	1.70	N/A	3.83	1992.88	N/A	N/A
Peak 10	377.06	377.00	6.18	N/A	57.02	2446.71	N/A	N/A
Peak 11	394.00	394.00	5.01	N/A	18.07	1691.93	N/A	N/A
Peak 12	403.00	403.00	4.11	N/A	27.23	2317.63	N/A	N/A
Peak 13	468.00	468.00	1.39	N/A	3.18	1948.49	N/A	N/A
Peak 14	509.00	509.00	2.54	N/A	20.29	2089.69	N/A	N/A

celkem: 35 783

Obr. 9 Graf vyjadřující vliv trisu na obsah bílkovin v médiu



5. Diskuse

Předešlé studie prothorakálních žláz se zabývaly především zkoumáním regulace jejich aktivity, množstvím ekdysteroidů (ekdysonu) vylučovaných těmito žlázami, principem stimulace, stimulací sekrece ekdysonu prothorakálními žlázami, hormonální stimulací prothorakálních žláz a dalšími otázkami. Princip regulace byl v mnohém objasněn. Děje se tak pomocí prothoracicotropního hormonu, který byl poprvé izolován z *B. mori* (Kataoka a kol., 1987) a později z dalších Lepidopter (Gilbert a kol., 2002). Přesná regulace steroidogeneze prothorakálními žlázami je závislá na síti vzájemně se ovlivňujících transdukčních kaskád, které směřují k faktoru regulujícího translaci (Gilbert a kol., 2006). Množství ekdysonu sekretovaného těmito žlázami je taky objasněno. Bazální sekrece ekdysonu prothorakálními žlázami u *L. migratoria* je nejnižší v předposledním a posledním instaru ihned po ekdysi a naopak nejvyšších hodnot dosahuje pátý a sedmý den posledního instaru (Neuwirth a kol., 2005). Hormonální stimulace prothorakálních žláz sarančí byla prováděna pomocí mozků. Bylo zjištěno, že kultivujeme-li prothorakální žlázy *in vitro* spolu s mozky, produkce ekdysonu se zvýší až 30 krát (Li a kol., 1997).

Je tedy známo, že prothorakální žlázy jsou hlavním zdrojem sekrece ekdysonu. Ve své práci jsem vycházela z předchozích poznatků a na pokusy jsem použila prothorakální žlázy z období jejich nejvyšší aktivity tedy z posledního pátého instaru.

Sekreční činnost prothorakálních žláz nespočívá jen v produkci ekdysteroidů. Prothorakální žlázy u *M. sexta* vylučují do hemolymfy také některé proteiny (Šafránek a Williams., 1980), u nichž však není přesně známá jejich funkce, ale předpokládá se, že by se mohly podílet na ekdysteroidogenezi. A právě studium těchto bílkovinných produktů bylo předmětem mé práce. Provedla jsem pokusy pomocí nichž se dala zhodnotit celková syntéza bílkovin do prothorakálních žláz a celkové množství vyloučených bílkovin do media.

5.1. Ovlivnění stimulace prothorakálních žláz

Pokusy při nichž se sledovala syntéza bílkovin v prothorakálních žlázách a jejich vylučování do media se jako v předchozích studiích prováděly za přítomnosti trisu, u kterého je známo, že zvyšuje sekreci ekdysteroidů *in vitro* (Neuwirth a kol., 2005). Mým úkolem bylo zjistit, zda tris také nějakým způsobem ovlivňuje syntézu bílkovin v prothorakálních žlázách.

Pro inkubační pokusy bylo použito Graceho medium, protože bylo zjištěno, že stimulační účinek trisu se projevuje pouze v přítomnosti vápenatých iontů (Neuwirth a kol., 2005), které jsou právě v Graceho mediu obsaženy. Úvodní pokusy navíc ukázaly, že mezi spektrem

bílkovin v prothorakálních žlázách čerstvě vypitvaných a v prothorakálních žlázách inkubovaných v mediu nejsou podstatné rozdíly.

Vlastní pokusy ukázaly, že přítomnost trisu v Graceho mediu nemá podstatný vliv na obsah bílkovin v prothorakálních žlázách, protože i když docházelo k určitým kvantitativním změnám jednotlivých bílkovinných frakcí, tak se celkové množství bílkovin podstatně nezměnilo.

Jiných výsledků bylo dosaženo při vyhodnocování množství bílkovin vyloučených prothorakálními žlázami do media. Ukázalo se, že tris nejen mění spektrum bílkovin (některé funkce stimulují, jiné inhibuje), ale především zvyšuje celkové množství sekrečních bílkovin, které produkuje do media. Zdá se tedy, že tris ovlivňuje v prothorakálních žlázách nejen produkci ekdysteroidů, ale moduluje i sekreční aktivity těchto žláz. Zda je mechanismus účinků obdobný jako u produkce ekdysteroidů a ke svému průběhu vyžaduje přítomnost vápenatých iontů, nebo se podstatně liší, zůstává neobjasněno.

6. Závěr

V předkládané práci byly zjištěny následující skutečnosti:

Krátkodobá inkubace prothorakálních žláz (6 hodin) v Graceho mediu podstatně nemění spektrum jejich bílkovin ve srovnání s čerstvě vypitvanými žlázami. 50 mM tris [tris(hydroxymethyl)aminomethan] nemá podstatný vliv na množství nesekrečních bílkovin nasyntetizovaných během inkubace v prothorakálních žlázách. 50 mM koncentrace trisu stimuluje uvolňování sekrečních bílkovin z prothorakálních žláz do media během inkubace.

7. Literatura

Agui, N., Bollenbacher, W.E., Granger, N.A. (1980). Corpus allatum is release site for insect prothoracicotropic hormone. *Nature*. 285, 669-670.

Bollenbacher, W.E., Smith, W.A., Gilbert, L.I. (1983). Ecdysone secretion by the prothoracic gland of *Manduca sexta*. *American Zoology*. 23, 885-885.

Dedos, S.H., Fugo, H., Nagata, S., Takamiya, M., Kataoka. H. (1999). Differences between recombinant PTTH and crude brain extracts in cAMP-mediated ecdysteroid secretion from the prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*. 45, 415-422.

Gelman, D.B., Carpenter, J.E., Greany, P.D. (2000). Ecdysteroid levels/profiles of the parasitoid wasp, *Diapetimorpha introita*, reared on its host, *Spodoptera frugiperda* and on an artificial diet. *Journal of Insect Physiology*. 46, 457-465.

Gilbert, L.I., Rybczynski, R. (2006). Protein kinase C modulates ecdysteroidogenesis in the prothoracic gland of the tobacco homworm, *Manduca sexta*. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 251, 78-87.

Gilbert, L.I., Rybczynski, R., Warren, J. T. (2002). Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Review of Entomology*. 47, 883-916.

Gilbert, L.I., Sakurai, S., Warren, J.T. (1989). Mediation of ecdysone synthesis in *Manduca sexta* by a hemolymph enzyme. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 10, 179-197.

Girgenrath, S., Smith, W.A. (1996). Investigation of presumptive mobilization pathway for calcium in the steroidogenic action of big prothoracicotropic hormone. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 26, 455-463.

Grieneisen, M.L., Warren, J.T., Sakurai, S., Gilbert, L.I. (1991). A putative route to ecdysteroids: metabolism of cholesterol *in vitro* by mildly disrupted prothoracic gland of *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry*. 21, 41-51.

Hoffmann, J.A., Koolman, J. (1974). Prothoracic gland in regulation of ecdysone titers and metabolic-fate of injected labeled ecdysone in *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*. 20, 1593-1601.

Hoffmann, J.A., Lagueux, M. (1985). Endocrine aspects of embryonic development in insects. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. Pergamon Press. 1, 435-460.

Kawakami, A., Kataoka, H., Oka, T. (1990). Molecular-cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. *Science*. 247, 1333-1335.

Kataoka, H., Nagasawa, H., Isogai, A. (1987). Isolation and partial characterization of prothoracicotropic hormone of silkworm, *Bombyx mori*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 51, 1067-1076.

Kirkeby, S., Moe, D., Bog-Hansen, T.C. (1993). The silver staining procedure of sodium dodecyl sulfate-gels may be accelerated by shortening fixation time. *Electrophoresis*. 14, 51-55.

Kiriishi, S., Rountree, D.B., Sakurai, S., Gilbert, L.I. (1990). Prothoracic gland synthesis of 3-dyhydroecdysone and its hemolymph 3 β -resuctase mediated concertion to ecdysone in representative insects. *Experientia* 46, 716-721.

Lafont, R., Horn, D.H.S. (1989). Phytoecdysteroids: Structure and occurrence. *Ecdysone from Chemistry to Mode of Action*. 39-64.

Laemmli, U.K. (1970). Laemmli gels. *Nature* 227, 689.

Lagueux, M., Hetru, C., Goltzene, F. (1979). Prothoracic gland activity and blood titres of ecdysone and ecdysterone during the last larval instar of *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*. 25, 255-261.

Lawrence, P.O. (1986). The role of 20-hydroxyecdysone in the molting of *Biosteres longicaudatus*. *Journal of Insect Physiology*. 32, 329-339.

Li, W., Vedrová, A., Sehnal, F. (1997). Humoral stimulation of the larval and adult prothoracic gland in *Schistocerca gregaria*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 36, 85-93 .

Nation, J.L. (2002). *Insect Physiology and Biochemistry*, CRC Press Boca Raton, pp 485.

Neuwirth, A. (2002). Studium produktů prothorakálních žláz u saranče stěhovavé (*Locusta migratoria*). Magisterská práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity.

Neuwirth, A., Kodrík, D., Birkenbeil, H., Sehnal, F. (2005). Tris stimulates ecdysteroid secretion via Ca²⁺ messenger system in the prothoracic gland of *Locusta migratoria*. *Physiological Entomology*. 30, 270-277.

Roonwal, M.L. (1936). Studies on embryology of the African migratory locust *Locusta migratoria*. Early development with a new theory of multiphased gastrulation among insects. *Philosophical Transaction of the Royal Society B*. 226, 391-421.

Smith, W.A., Gilbert, L.I., Bollenbacher, W.E. (1985). Calcium-cyclic AMP interaction in prothoracicotropic hormone stimulation of ecdysone synthesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 39, 71-78.

Smih, W.A., Varghese, A.H., Healy, M.S., Lou, K.J. (1996). Cyclic AMP is a requisite messenger in the action of big PTTH in the prothoracic gland of pupal *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry. Mol Biol*. 26, 161-170.

Šafránek, L., Williams, C.M. (1980). Studies of the prothoracicotropic hormone in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Biological Bulletin. 158, 141-153.

Sakurai, S., Warren, J.T., Gilbert, L.I. (1991). Ecdysteroid synthesis and molting by the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, in the absence of prothoracic gland. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 18, 13-36.

Tawfik, A.I., Sehnal, F. (2003). A role for ecdysteroids in the phase polymorphism of the desert locust. Physiological Entomology. 28, 19-24.

Tawfik, A.I., Mat'hoová, A., Sehnal, F. (1999). Ecdysteroids during ovarian development and embryogenesis in solitary and gregarious *Schistocerca gregaria*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 41, 134-143.

Tawfik, A.I., Mat'hoová, A., Sehnal, F., Ismail, S.H. (1996). Haemolymph ecdysteroids in the solitary and gregarious larvae of *Schistocerca gregaria*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 31. 427-438.

Tawfik, A.I., Vedrová, A., Li, W., Sehnal, F., Obeng-Ofori, D. (1996). Haemolymph ecdysteroids and prothoracic gland in the solitary and gregarious adults of *Schistocerca gregaria*. Journal of Insect Physiology. 43, 485-493.

Torto, B., Njagi, P.G.N., Obengofori, D. (1996). Phase-independent responses to phase-specific aggregation pheromone in adult desert locust, *Schistocerca gregaria*. Physiological Entomology. 21, 131-137.

Watson, R.D., Thomas, M.K., Bollenbacher, W.E. (1989). Regulation of ecdysteroidogenesis in prothoracic gland of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. The Journal of Experimental Zoology. 252, 255-263.