

BIOLOGICKÁ FAKULTA
JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Bakalářská diplomová práce



**Panbo-Red Pigment Concentration
Hormone u *Porcellio scaber* (stínka
obecná)**

Jana Zralá

2007

**Vedoucí práce:
Doc. RNDr. Dalibor Kodrík, CSc.**

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998Sb. 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.

Čestně prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury a rad školitele.

Tímto způsobem bych chtěla upřímně poděkovat mému školiteli, Daliborovi Kodříkovi, Helče Šterbové a Ivče Bártové pro jejich trpělivost, vždy dobrou náladu a schopnost kdykoli pomoci a poradit, dále pak mé rodině za jejich podporu, mému dědečkovi a také mým přátelům za nezapomenutelně krásné chvíle strávené s nimi.

V Českých Budějovicích, 2007

.....

BAKALÁŘSKÁ DIPLOMOVÁ PRÁCE

Zralá, Jana, 2007:

Panbo-Red Pigment Concentration Hormone u *Porcellio scaber* (stínka obecná) [The Panbo-Red Pigment Concentration Hormone in the rough woodlouse *Porcellio scaber*] - 32p.

Bachelor thesis, Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

ANNOTATION:

The Panbo-RPCH, one member of the AKH/RPCH (Adipokinetic Hormone/Red Pigment Concentrating Hormone) family, has been isolated from the rough woodlouse, *Porcellio scaber* CNS. The HPLC, ELISA and LC/MS analyses were used for characterization of the molecule. The peptide enhances lipid mobilization when injected into the red bug *Pyrrhocoris apterus* body with maximum response of 10 pmol.

OBSAH

ÚVOD	5
- Endokrinní soustava hmyzu	6
- Endokrinní soustava korýšů	8
- Neurohormony AKH/RPCH rodiny	9
CÍLE PRÁCE	12
MATERIÁL A METODIKA	12
- Pokusná zvířata	12
- Odběr hemolymfy	13
- Pitva CNS u <i>P. scaber</i>	13
- Příprava mozkových extraktů	14
- Aplikace hormonu	14
- Měření adipokinetické odpovědi	15
- Kvantitativní stavovení Panbo-RPCH – ELISA	15
- Purifikace extraktu CNS na HPLC	18
- Hmotnostní a strukturní analýza RPCH	19
- Presentace výsledků a jejich statistické zpracování	19
VÝSLEDKY	20
- Celkový obsah lipidů v hemolymfě u <i>P. apterus</i>	20
- Purifikace Panbo-RPCH z CNS extraktu <i>P. scaber</i>	21
- ELISA – testování frakcí z HPLC	22
- Hmotnostní a strukturní analýza	23
- Test extraktu z CNS <i>P. scaber</i> na <i>P. apterus</i>	24
DISKUSE	25
ZÁVĚR	28
SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	29

ÚVOD

Výraznými a dobře známými podkmeny u členovců (Arthropoda) jsou koryši (Crustacea) a šestinozí (Hexapoda), kam patří i hmyz (Insecta). Dlouho se uvažuje o tom, zda jsou spolu koryši a hmyz fylogeneticky ve vzájemném vztahu. Důkazy pocházející z molekulárních analýz, z podrobného zkoumání mozku a očí a neurogenese podporují toto tvrzení.

Nejznámější a nejlépe probádanou třídou koryšů jsou rakovci (Malacostraca) (viz **tab. 1**), kteří se vyskytují v moři, sladké vodě i na suché zemi. Téměř veškeré znalosti o endokrinologii koryšů pocházejí z řádu desetinožců (Decapoda) a jsou někdy zcela právem zobecňovány pro celý podkmen koryšů.

Hmyz je na druhou stranu neúspěšnější zvířecí skupinou na zemi a je daleko více prozkoumán: pro obrovskou hojnost (nejméně 1 mil. druhů je popsán a přibližně 3-5 mil. nebyl dosud určen a popsán), pro jejich zvláštní krásu a jejich prospěšné vlastnosti (opylování, produkce medu, hedvábí), tak i pro potenciální pohromu pro lidstvo (poškození úrody, vektor přenášející choroby).

Jak hmyz, tak koryši prodělávají během svého životního cyklu změny jako je metamorfóza a ekdyse. Všechny tyto změny, ale i například změna barvy, metabolické změny během pohybu, adaptace na prostředí s odlišnou salinitou atd., jsou řízeny peptidy, které jsou syntetizovány v modifikovaných neuronech, proto nazývané neuropeptidy. Je známo, že Decapoda a Insecta syntetizují identické nebo primární strukturou velmi podobné neuropeptidy. Díky snaze celkově charakterizovat různorodé koryší neurohormony biochemicky a identifikovat jejich celulární zdroje,

začali se po této stránce zkoumat i jiní zástupci Malacostraca např. Isopoda (Nussbaum a Dircksen, 1995).

CRUSTACEA (KORÝŠI)

Remipedia	
Cephalocarida	
Branchiopoda = Phyllopoda (lupenonožci)	Anostraca (žábronožky)
	Notostraca (listonošky)
	Conchostraca (škeblivky)
	Cladocera (perloočky)
Maxillopoda	Mystacocarida
	Ostracoda (lasturnatky)
	Copepoda (klanonožci)
	Cirripedia = Thecostraca (svijonožci)
	Tantulocarida
	Branchiura (kapřivci)
	Pestastomida = Linguatulida (jazyčnatky)
Malacostraca (rakovci)	Nebaliacea = Leptostraca (nebálie)
	Stomatopoda (ústonožci)
	Bathynellacea (bezkrunýřky)
	Mysidacea (vidlonožci)
	Isopoda (stejnonožci)
	Amphipoda (různonožci)
	Decapoda (desetinožci)

Tabulka 1: Stručný systém korýšů.

Endokrinní soustava u hmyzu

U hmyzu rozlišujeme dvě hormonální soustavy fungující v těsné závislosti a několik dalších skupin buněk (tkání) s endokrinní funkcí.

Centrem endokrinní soustavy hmyzu je neurosekretorický komplex, který zahrnuje neurosekretorické buňky v centrální nervové soustavě (CNS) a v blízkosti mozku se nacházející žlázy corpora cardiaca (CC) a

corpora allata (CA), na něž jsou napojené některé neurosekretorické buňky mozkových hemisfér. Endokrinní buňky CNS jsou adaptované monopolární neurony, jejichž produkty jsou syntetizovány v těle neuronu. Dendrity neurosekretorických buněk se nachází v neuropile a axony pronikají přes nervově - krevní bariéru a uvolňují své produkty do hemolymfy exocytózou. Vytvořené neurohormony se uvolňují buď v místě své syntézy nebo v neurohemálních orgánech – nejčastěji v CC. V každé hemisféře mozku se nachází dvě skupiny neurosekretorických buněk: mediální neurosekretorické buňky v oblasti pars intercerebralis a laterální neurosekretorické buňky. Syntetizované neurohormony působí přímo na efektorový orgán nebo stimulují další endokrinní žlázy k produkci hormonů.

CC se nachází v blízkosti mozku, často nasedají na aortu a slouží jako neurohemální orgán pro mozkové neurohormony, protože sem ústí zakončení axonů jejich neurosekretorických buněk. Hlavním endokrinním produktem CC jsou adipokinetické hormony.

CA je párová endokrinní žláza nacházející se v posteriorní oblasti hlavy v blízkosti hltanu, někdy splývá v jeden orgán. CA jsou ektodermálního původu, mají oválný nebo vejčitý tvar. Celý orgán je obklopen nebuněčnou bazální laminou a obsahuje pouze jeden typ buněk. Je pro ně charakteristická přítomnost hladkého endoplasmatického retikula.

Druhým významným hmyzím endokrinním centrem jsou prothorakální žlázy, párové orgány nepravidelného tvaru nacházející se v prvním hrudním článku a v hlavě, které produkují ekdysteroidy. Endokrinní soustava hmyzu je doplněna několika dalšími žlázami, které

produkují hormony s různou funkcí. Patří sem neurosekretorické buňky ostatních ganglií nacházející se v břišní nervové pásce, endokrinní buňky střeva, což jsou epiteliální buňky středního střeva, které produkují peptidy s převážně neznámou funkcí, a epitracheální buňky, které nasedají na tracheu blízko spirakula a produkují ecdysis triggering hormon, což je hormon podílející se na svlékání. Endokrinní funkci mají také gonády, které produkují hormony ovlivňující především rozmnožování.

Endokrinní soustava koryšů

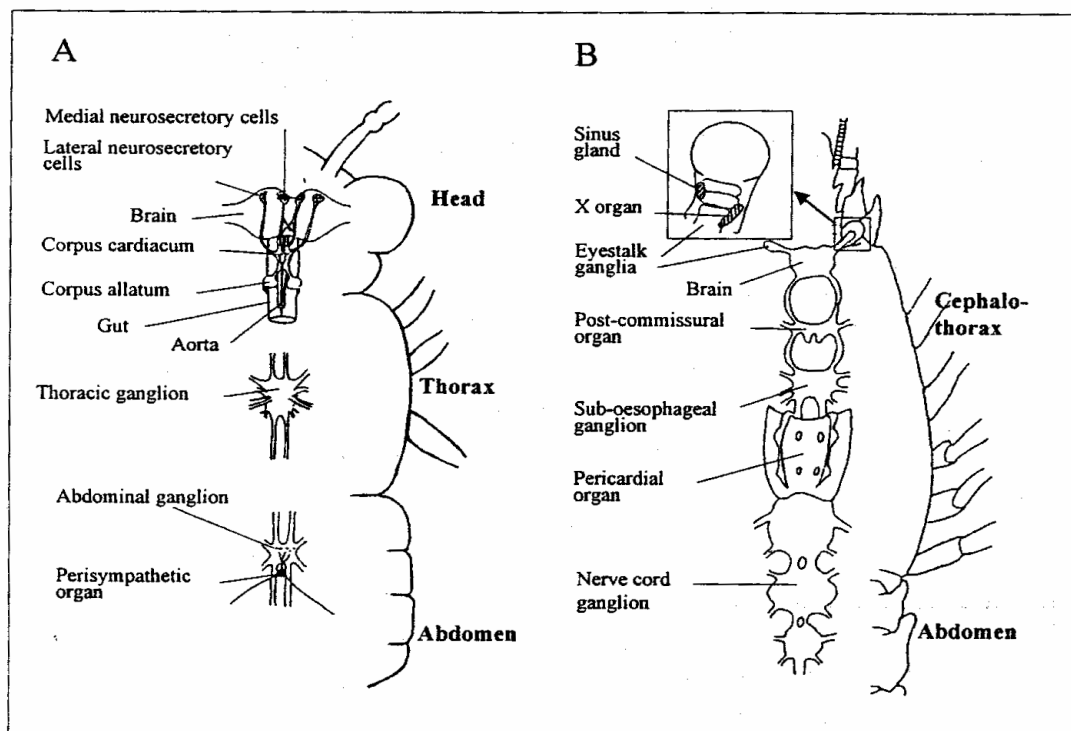
Sídlem endokrinního centra koryšů je oční stélka, která kontroluje metabolismus glukosy, svlékání, rozmnožování a epiteliální pigmentaci. Neuroendokrinní komplex oční stélky se skládá především z tzv. X-orgánu (XO), což je shluk obrovských neuronů v medulla terminalis, kde se syntetizují neuropeptidy. Komplex dále obsahuje sinusovou žlázu, neurohemální orgán, který je tvořen konci axonů z XO neuronů, a který slouží ke skladování a k vylučování neuropeptidů do hemolymfy.

Jako další zdroje neuropeptidů u koryšů byly identifikovány: perikardiální orgán, neurohemální orgán ležící v osrdečníku, vylučuje látky, které ovlivňují tep, a suboesophageální – postkomisurální orgán, kde jsou hormony neurokrinních buněk suboesophageálního ganglia vedeny do poskomisurální žlázy, která slouží jako neurohemální orgán.

V hlavě je ještě umístěn párový Y-orgán, který funguje jako epiteliální endokrinní žláza analogická prothorakálním žlázám hmyzu. Vylučuje tedy ekdysteroidy.

Zajímavým řádem třídy rakovců, které jsou i u nás hojně zastoupeny jsou stejnonožci (Isopoda). Nejběžnějšími zástupci jsou

Oniscus asellus (stínka zední) a *Porcellio scaber* (stínka obecná). Jejich mozek obsahuje protocerebrum, zmenšené deutocerebrum a prodloužené tritocerebrum. Prodloužené štíhlé laloky protocerebra zahrnují optické laloky s medula externa, interna a terminalis – typické pro Malacostraca, a cibulovité sinusové žlázy, které následují po optickém laloku (Nussbaum a Dirksen, 1995) (viz **obr. 1**).



Obrázek 1: Endokrinní soustava: A) Insecta a B) Crustacea

Neurohormony AKH/RPCH rodiny

Nejznámější a nejvíce prozkoumané neurohormony u korýšů a hmyzu se zařazují do tzv. AKH/RPCH rodiny (Adipokinetic Hormone/Red Pigment Concentrating Hormone family). Jméno je odvozeno od prvních členů této rodiny, kteří byli zcela charakterizováni: chromatotropin (RPCH) z korýše *Pandalus borealis* (Fernlund a Jossefson, 1972) a adipokinický

hormon (Locmi-AHK-I) ze saranče *Locusta migratoria* (Stone a kol., 1976).

Adipokinetické hormony jsou syntetizovány a uvolňovány u hmyzu z CC a u korýšů z X-orgánu. Každý z těchto hormonů má svou specifickou RNA.

Adipokinetické peptidy jsou octa-, nona- nebo decapeptidy na obou koncích blokovány (Gäde a kol., 1997), na N-konci zbytkem kyseliny pyroglutamové a na C-konci amidem. Aminokyseliny v pozici 8 a 9 (když jsou přítomné) jsou Trp a Gly. V molekule jsou nejméně dvě aromatické kyseliny - v pozici 4 hlavně Phe (ale někdy Tyr) a v pozici 8 (Trp); několik peptidů má třetinu aromatických kyselin - další v pozici 2 (Tyr nebo Phe) nebo v pozici 7 (Trp) (Gäde a Marco, 2006).

Primárním stimulem pro uvolnění AKH procesem exocytózy do hemolymfy je let (Mayer a Candy, 1969) nebo samotný pohyb vůbec. Peptidy řídí mobilizaci lipidů, sacharidů a prolinu, aktivují glykogen fosforylasu, hromadí cAMP a inhibují syntézu lipidů, proteinů a RNA, stimulují lokomoční aktivitu. Jsou typickými stresovými hormony - stimulují katabolické reakce, vytvářejí podmínky pro vznik snadno oxidovatelných metabolitů a inhibují syntetické reakce (Gäde a kol., 1997).

Klasický proces mobilizace lipidů byl popsán u sarančí, kde je spuštěn uvolněním AKH z CC. Odtud se hormon dostává k buňkám tukového tělesa, kde aktivací adenylatcyklasy dochází k produkci cAMP. V přítomnosti Ca^{++} iontů spouští proteinkinázovou kaskádu, která má za úkol aktivovat lipasu ke štěpení triacylglycerolu na diacylglycerol. Do pracujícího svalu se diacylglycerol dostává prostřednictvím kyvadlového

systému přepravy lipoforiny. Na membráně svalové buňky je diacylglycerol hydrolysován na glycerol a mastné kyseliny pomocí lipasy, za uvolnění lipoforinového nosiče. Konečným zdrojem energie jsou pak produkty enzymatického odbourávání mastných kyselin.

Několik zástupců AKH/RPCH rodiny bylo v poslední době identifikováno také u podřádu Heteroptera, který byl dříve mimo hlavní zájem výzkumu, a to u druhů *Pyrrhocoris apterus* (ruměnice pospolná) (Kodrík a kol., 2000, 2002), *Dysdercus cingulatus* (Patočková, 2003; Socha a kol., 2004) a *Nezara viridula* (Gäde a kol., 2003). Velmi zajímavého zástupce se podařilo odhalit především u posledního z nich – jedná se o u hmyzu unikátní oktapeptid Panbo-RPCH (Fernlund a Josefsson, 1972): **pGlu – Leu – Asn – Phe – Ser – Pro – Gly – Trp amid**, který byl prvně izolován z oční stélky korýše *P. borealis* a byl znám pouze jako jediný zástupce AKH/RPCH rodiny u korýšů.

Panbo-RPCH řídí u *P. borealis* změnu barvy těla nahromaděním pigmentových granulí ve specifických buňkách v schránce korýše (Gäde a kol., 2003). Chromatotropické faktory a jejich účinky na změnu barvy těla anebo pohyb očních pigmentů byly námětem četných studií u několika zástupců Decapoda a i Isopoda (Stahl, 1938 *a, b*; Kleinholz, 1937, 1961; Fingerman 1969, 1970; Castrucci a Mendes, 1975; Rao a kol., 1985). Je zajímavé, že Panbo-RPCH vyvolává u hmyzu mobilizaci energetických zdrojů, například u *N. viridula* (Gäde a kol., 2003), zatímco u korýšů podobný účinek nebyl popsán (Gäde a Marco, 2006).

CÍLE PRÁCE

- prokázat stimulační účinek hormonu Panbo-RPCH na mobilizaci lipidů u *P. apterus*
- pokusit se izolovat hormon z AKH/RPCH rodiny z korýše *P. scaber* a otestovat jeho účinky na *P. apterus*

MATERIÁL A METODIKA

Pokusná zvířata

- ***Pyrrhocoris apterus* (ruměnice pospolná)**

Populace laboratorně chovaných jedinců *P. apterus* vznikla z divoké populace sebrané v Českých Budějovicích (Česká republika). Nymfální stádia a imaga byla chována v 0,5 l skleněných nádobách (přibližně po 40 jedincích), byla zásobena lipovými semeny a pravidelně napájena vodovodní vodou ze skleněných zkumavek uzavřených vatovou zátkou. Chovné nádoby byly uchovávány při 26 ± 1 °C ve fotoperiodě (18L : 6D) v termostatu Entomologického ústavu AVČR v Českých Budějovicích.

Vývoj *P. apterus* z vajíčka do dospělce trvá v laboratorních podmínkách 1 měsíc. Nymfa prochází 5 stádii, první trvá přibližně 10 - 14 dní a konečná fáze nymfy 7 - 10 dní. Dospělec se dožívá 2 měsíců až 1 roku (Socha, 1993). Samice kladou vajíčka pod vrstvu lipových semen na dno sklenice. Proces kladení vajíček nastává také u neoplodněných samic, po naklazení tyto vajíčka hynou.

Jedinci předurčení k experimentům byli po imaginálním svlečení vytríděni dle pohlaví do samostatných sklenic a zde drženi dle potřeby. Mé experimenty byly prováděny na samicích starých 10 dní.

• ***Porcellio scaber* (stínka obecná)**

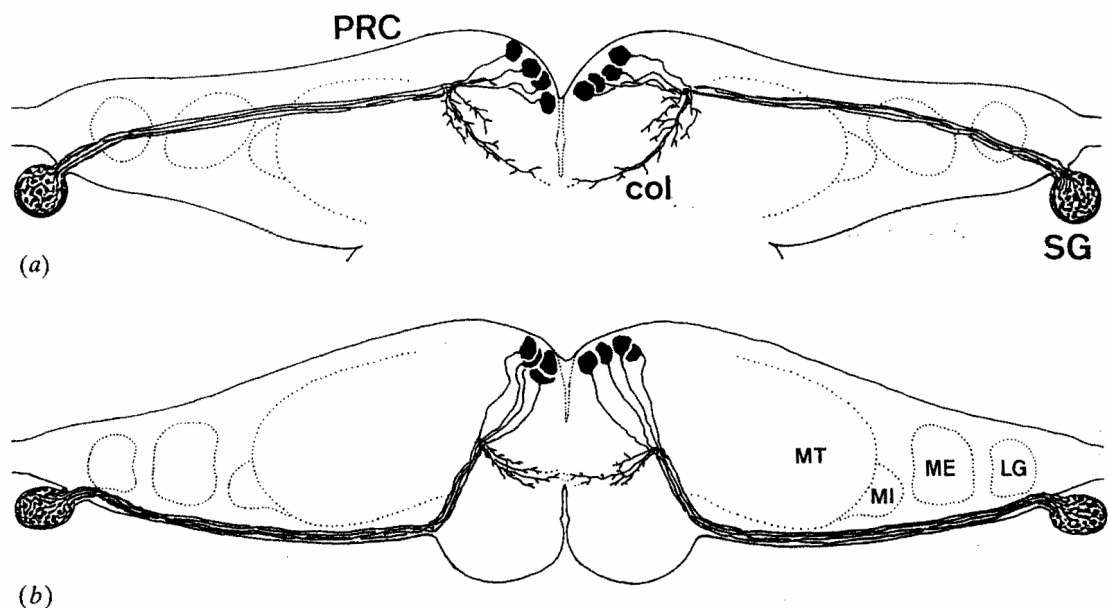
Populace laboratorně chovaných jedinců *P. scaber* vznikla z divoké populace sebrané ve Strakoniciích (Česká republika). Nymfální stádia a imága byla chována v 1 l sklěněných nádobách, pravidelně byla zásobována vodovodní vodou ze sklěněných zkumavek uzavřených vatovou zátkou a čerstvou zeleninou, byla uchovávána při fotoperiodě (18L : 6D) při 26 °C v inšektáriu Entomologického ústavu AVČR v Českých Budějovicích.

Odběr hemolymfy

Z nastříhnutého tykadla *P. apterus* byla kapka hemolymfy zachycena na parafilm a odtud odebráno 0,5 µl hemolymfy mikropipetou (Eppendorf 0,1 - 2,5 µl) do zkumavky na stanovení hladiny lipidů.

Pitva CNS u *P. scaber*

Byla provedena pitva potřebného množství CNS (mozek + sinusové žlázy) s využitím binopolární lupy, nůžek, dvou pinzet a Ringerova fyziologického roztoku (0.13 M NaCl, 1.3 mM KCl, 6.8 mM CaCl₂ · 2H₂O, 2 mM MgCl₂ · 6H₂O, 2 mM NaHCO₃). Za prvním hrudním článkem byla odstříhnuta hlava, následovalo očištění hlavy od kousacího ústrojí. Hlava byla takto zanechána nebo následně byla CNS opatrně vyjmuta. Vše bylo umístěno do mikrozkušavky a do doby použití uchováno při – 20 °C.



Obrázek 2: CNS u *Oniscus asellus* (stínka zední), SG – sinusové žlázy, PRC – protocerebrum.

Příprava mozkových extraktů

Do mikrozkušavky s daným počtem CNS bylo přidáno 100 μ l 80 % methanolu, rozsonikováno a následně centrifugováno (10 000 otáček, 4 °C, 5 min, Hettich EBA 12R). Vzniklý supernatant byl odebrán do jiné mikrozkušavky a sediment ještě 2x dle stejného postupu extrahován. Spojené supernatanty byly odpařeny ve vakuované centrifuze (Jouan RC10.22) a následně uloženy v – 20 °C.

Aplikace hormonu

Syntetický hormon Panbo-RPCH byl injikován do těla plošnice v dané koncentraci (od 0,2 do 80 pmol) vždy v objemu 2 μ l skrz metathorakálně abdominální intersegmentální membránu Hamiltonovou injekční stříkačkou.

Měření adipokinetické odpovědi pomocí sulfo-fosfovanilínového testu (Zöller a Kirch, 1962, modifikace podle Holwerda a kol., 1977 a Van Marrewijka a kol., 1984)

Vzorek hemolymfy (0,5 µl) odebraný v čase 0 byl dán do zkumavky, která obsahovala 100 µl 96 % H₂SO₄. Poté byl plošticím injikován hormon Panbo–RPCH o dané koncentraci (pokus) či 20 % methanol v Ringerově roztoku (kontrola). Odběr hemolymfy byl opakován po 90 minutách. Všechny vzorky byly 10 minut vařeny ve vodní lázni a po zchlazení byl přidán 1 ml vanilínového činidla (vanilin, kys. fosforečná, destilovaná voda). Po uplynutí 30 minut bylo měřeno odlišná zbarvení vzorků na spektrofotometru (Thermo Spectronic) při vlnové délce 546 nm proti slepému vzorku. Slepý vzorek se skládal ze 100 µl kyseliny sírové a 1 ml vanilínového činidla.

Naměřené hodnoty byly srovnány a dopočteny pomocí standardní křivky kyseliny olejové (0,2 - 80 µl). Porovnáním hodnot před a po podání hormonu byla určena změna množství lipidů v hemolymfě.

Principem této metody je vzájemná reakce dvojně vazby mastné kyseliny s vanilínem za vzniku barevné sloučeniny.

Kvantitativní stanovení Panbo–RPCH - ELISA

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) je imunoenzymatická metoda existující v mnoha modifikacích a variantách. Pro kvantitativní stanovení hormonů AKH/RPCH rodiny z CNS se používá kompetitivní ELISA. Tato metoda je založena na soutěži známého množství značeného antigenu s neznámým stanovovaným množstvím neznačeného antigenu o vazbu, která je limitována množstvím protilátky. V následujícím testu

byla použita protilátka proti AKH z *P. apterus* (Pyrap-AKH), která rozeznává i Panbo-RPCH (Goldsworthy a kol., 2002).

Použité roztoky:

- aplikační pufr: pH = 9,6; 0,1 M bikarbonátový pufr
(Na₂CO₃, NaHCO₃)
- promývací pufr: pH = 7,5; 10 mM PBS pufr
(Na₂HPO₄ · 2H₂O, NaH₂PO₄ · 2H₂O, NaCl)
- OPD (ortho-fenylendiamin) substrát: 12,5 ml A + 12,85 ml B + 4,25 mg OPD (pH=5) + 1,25 µl 30 % H₂O₂
(A = 0,1 M kyselina citrónová, B = 0,2 M Na₂HPO₄)
- blokovací pufr (5 % roztok sušeného odstředěného mléka, 0,1 % Tween 20 v promývacím pufru)
- BLAM – biotinilovaný Pyrap-AKH (Biotin Long Arm Maleimide)

Postup metody:

Králíčí protilátka (IgG) proti Cys¹-Pya-AKH (Sigma Genosys, Cambridge, UK) byla zředěna v aplikačním pufru 1:5000 a v množství 100 µl byla aplikována přes noc při 4 °C na stěny jamek mikroleštičky (high binding Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA). Následně byla destička promývána třikrát 200 µl promývacího pufru s detergentem Tween 20 a tak se postupovalo po každém následujícím kroku. Dále byl pak aplikován blokující pufr v množství 200 µl a inkubován v jamkách při 37 °C po dobu 2 hodin. Následovalo nanesení vzorků rozpuštěných v 50 µl promývacího pufru bez detergentu Tween 20 a 50 µl roztoku Cys¹-Pya-AKH značeného biotinem (BLAM, Biotin Long Arm Maleimide) (Vector

Laboratories, Peterborough, UK) v koncentraci 2 pmol/1 ml (tedy 100 fmol/jamku). Tím byla zahájena kompetice mezi stanovovaným Panbo-RPCH a značeným Cys-Pya-AKH-BLAM komplexem. Současně byl aplikován do další série jamek jako standard syntetický hormon Panbo-RPCH (Bachem, Switzerland) pro přípravu kalibrační křivky v množství 10 pmol na jamku a dále ředěný pomocí dvojkové řady. Byly připraveny i pozitivní (50 µl promývacího pufru bez Tweenu + 50 µl BLAMu) a negativní kontroly (100 µl samotného promývacího pufru). Kompetice probíhala po dobu 1 hodiny v inkubátoru (Heidolph TITRAMAX 1000) při 37 °C. Následovala inkubace se 100 µl HRPS (Horse Radish Peroxidase) (Vector Laboratories, Burlingame, USA) ředěného v promývacím pufru 1:500 po dobu 1 hodiny při 37 °C. Dalším a posledním krokem bylo přidání OPD substrátu. Destička zabalená do alobalu byla inkubována v termostatu po dobu 40 minut. Peroxidasa vázaná na značený antigen rozkládá peroxid vodíku a uvolňuje kyslík reagující s OPD za vzniku zabarvení. Reakce byla zastavena přidáním 50 µl 0,5 M kyseliny sírové. Intenzita zabarvení byla měřena na ELISA čtečce (SpectraMAX 340pc) při vlnové délce 492 nm. Naměřené hodnoty A_{492} byly přepočítávány na hodnoty kompetice v % podle rovnice:

$$100 - (\text{test O.D.} - \text{pozadí} / \text{max O.D.} - \text{min O.D.}) * 100$$

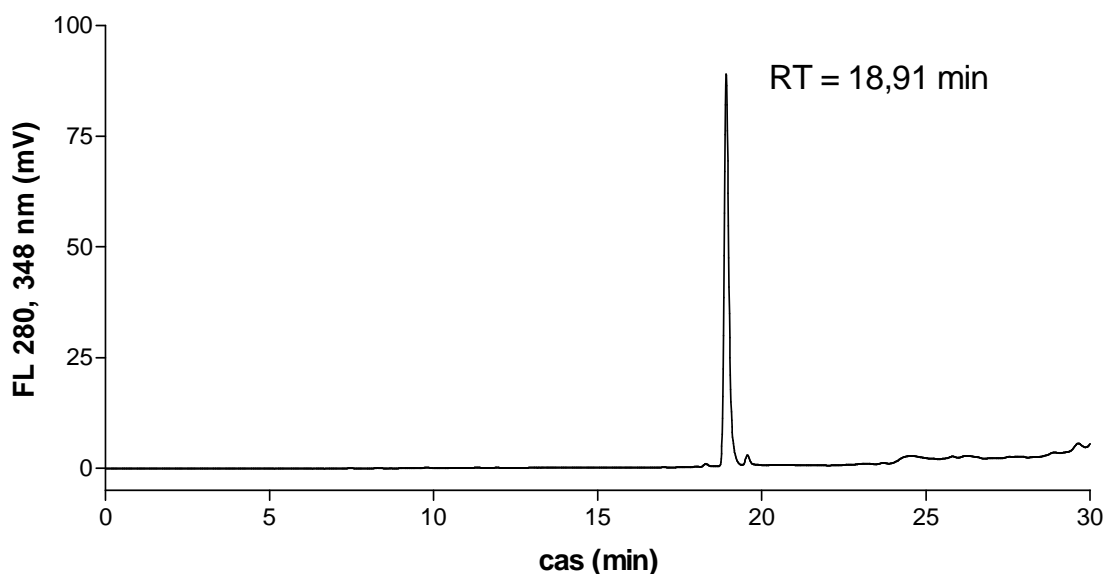
Pozadí = průměr hodnot naměřených u negativních kontrol

Množství hormonu v daném vzorku bylo odečteno ze sestrojené kalibrační křivky a vyneseno do grafu ve fmol/CNS (viz **obr. 6**).

Purifikace extraktu CNS na HPLC

Purifikaci AKH/RPCH umožnila RP HPLC (**R**everse **P**hase **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography).

Pro izolaci hormonu z methanolového extraktu CNS bylo použito HPLC zařízení Waters ovládané programem Clarity; kolona LiChropsher, RP – 18, WP – 300 (Merak); mobilní fáze A = 0,11 % TFA (trifluoroctová kyselina), B = 60 % acetonitrilu v 0,1 % TFA; gradient: 0 - 2 min 10 % B, 2 - 30 min 10 - 100 % B. Dělené látky byly monitorovány fluorometricky při $\lambda_{ex} = 280\text{nm}$ a $\lambda_{em} = 348\text{ nm}$; citlivosti 15 mV a průtoku 1 ml/min. Pomocí standardního Panbo-RPCH (viz **obr. 3**), který byl aplikován na kolonu před vlastním dělením vzorku, byla určena oblast, kdy bylo možné očekávat vlastní hormon z AKH/RPCH rodiny (RT=18,91 min). Materiál vytékající z kolony byl rozdělován na vzorky po 2 minutách, které byly následně testovány na přítomnost AKH pomocí ELISA testu.



Obrázek 3: HPLC standardu RPCH v dávce 130 pmol na koloně LiChropsher (podrobnosti viz text).

Hmotnostní a strukturní analýza RPCH

Strukturní analýza AKH/RPCH izolovaného z CNS *P. scaber* byla prováděna firmou Waters pomocí LC/MS analýzy, s použitím zařízení OTOF Premier and nanoACQUITY System.

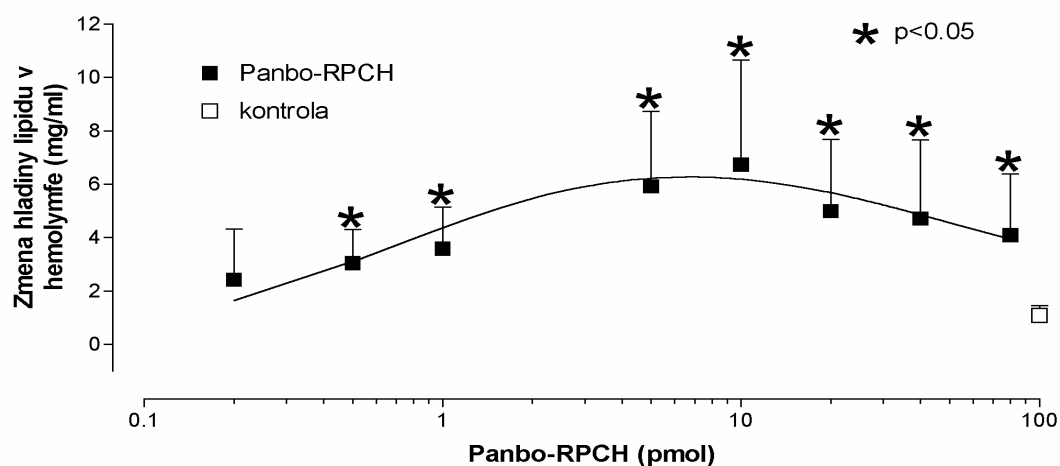
Presentace výsledků a jejich statistické zpracování

Na porovnání statistické průkaznosti výsledků (viz **obr. 4**) byl použit Studentův t – test na 5 % hladinové významnosti. Na konstrukci grafů byl použit software Prism (GraphPad Software, version 4, CA, USA).

VÝSLEDKY

Celkový obsah lipidů v hemolymfě u *P. apterus*

Pro zjištění hladiny lipidů v hemolymfě a jejich změn po aplikaci hormonů byl použit sulfo-fosfovanilínový test. Na základě předchozích zkušeností se pro testy používaly 10 denní reprodukční samice *P. apterus*, u kterých byla prokázána nejvyšší hodnota mobilizace lipidů. Hormon byl aplikován v dávkách 0,2 – 80 pmol přes metathorakálně abdominální intersegmentální membránu.

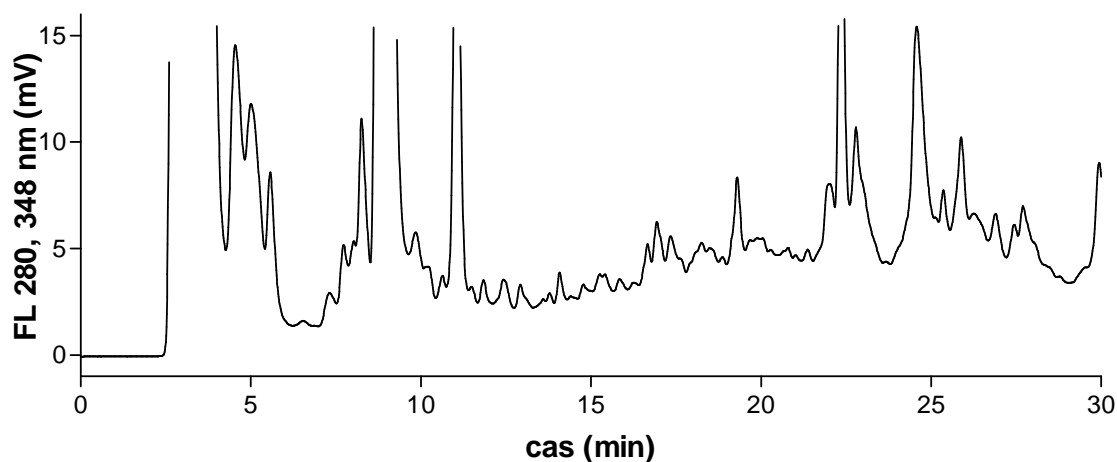


Obrázek 4: Změna hladiny lipidů v hemolymfě (mg/ml) u 10 denních reprodukčních samic *P. apterus* v závislosti na zvyšujících se dávkách Panbo-RPCH v koncentraci 0,2 – 80 pmol. Byly vyneseny průměry \pm SD. * - naznačuje statisticky významný rozdíl na 5 % hladině významnosti.

Nejvyšší mobilizace lipidů byla naměřena při dávce 10 pmol, kdy dosáhl nárůst 6,731 mg/ml hemolymfy, přičemž $ED_{50} = 1,850$ pmol. Všechny hodnoty byly statisticky rozdílné na 5 % hladině významnosti ($p < 0,5$) od kontroly kromě nejnižší podané dávky 0,2 pmol. U dávek vyšších než 10 pmol rozsah mobilizace lipidů klesal.

Purifikace Panbo-RPCH z CNS extraktu *P. scaber*

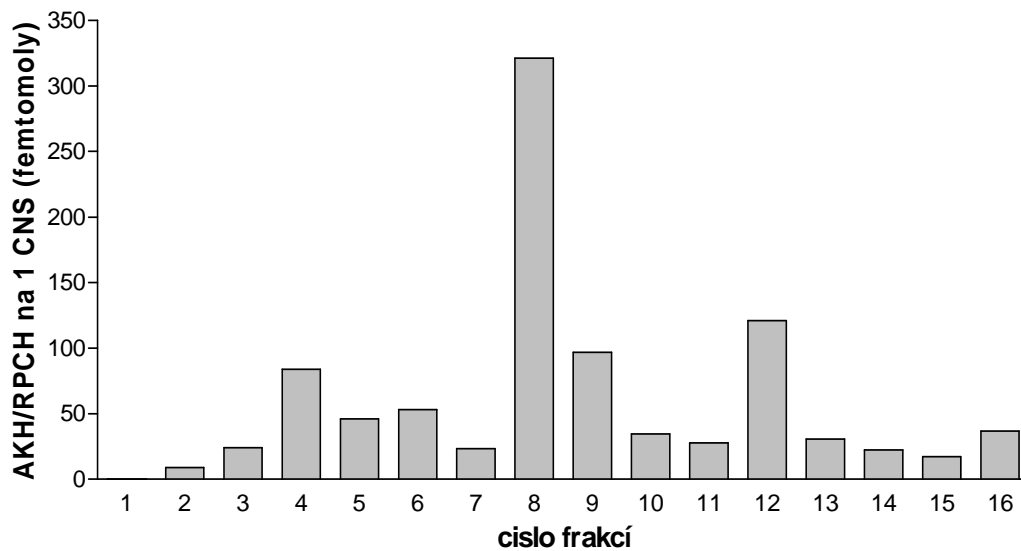
Na RP HPLC byl rozdělen methanolvý extrakt skládající se z 20 hlav *P. scaber*. Před tímto dělením byl za stejných podmínek aplikován syntetický Panbo-RPCH v dávce 130 pmol (viz **obr. 3**), který odhalil, že eluci aktivní frakce lze očekávat přibližně okolo 19. minuty, ale i přesto byl všechn materiál odebírán a rozdělen na 16 jednotlivých frakcí přibližně po 2 minutách. Tyto frakce byly dále testovány pomocí ELISA testu na přítomnost AKH/RPCH.



Obrázek 5: Eluční profil dělení extraktu 20 hlav *P. scaber* na RP HPLC. Všechn odebíraný materiál byl jímán a rozdělen na jednotlivé frakce, které byly dále testovány na přítomnost AKH/RPCH pomocí ELISA testu.

ELISA – testování frakcí z HPLC

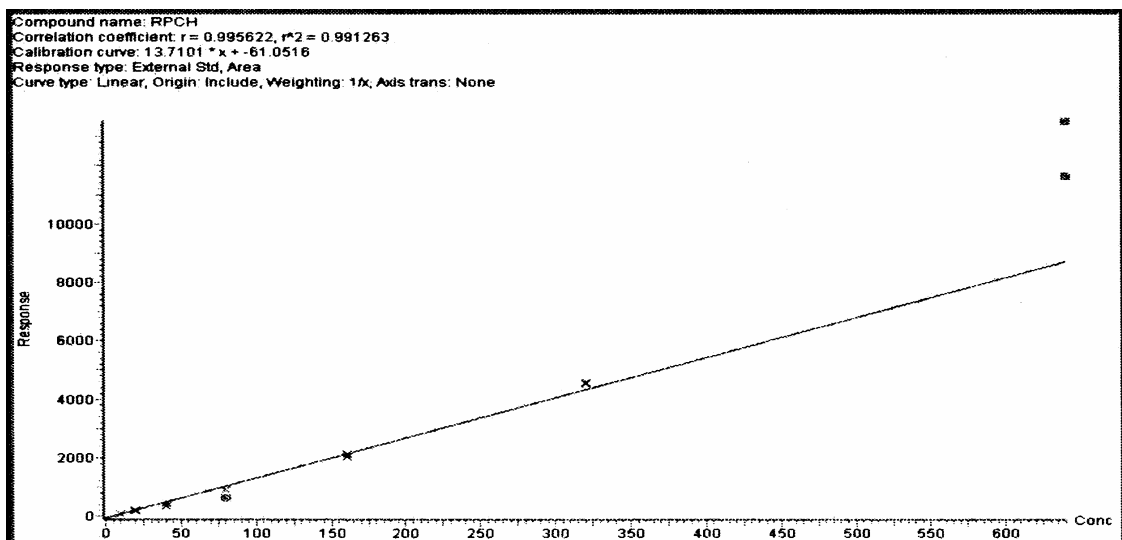
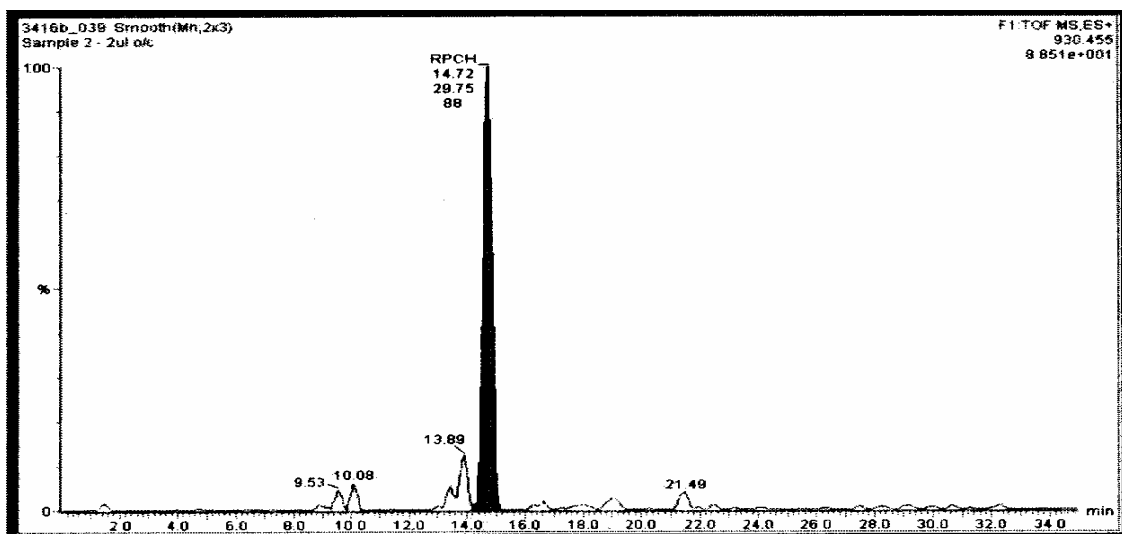
Šestnáct frakcí bylo testováno pomocí ELISA testu na přítomnost AKH/RPCH. Aktivita byla zaznamenána ve frakci číslo 8, jejíž čas odebrání byl 17,85 - 18,85 min. Tento čas byl blízký retenčnímu času naměřenému u syntetického Panbo-RPCH. Lze se tedy domnívat, že hormon Panbo-RPCH mohl být přítomen v této frakci.

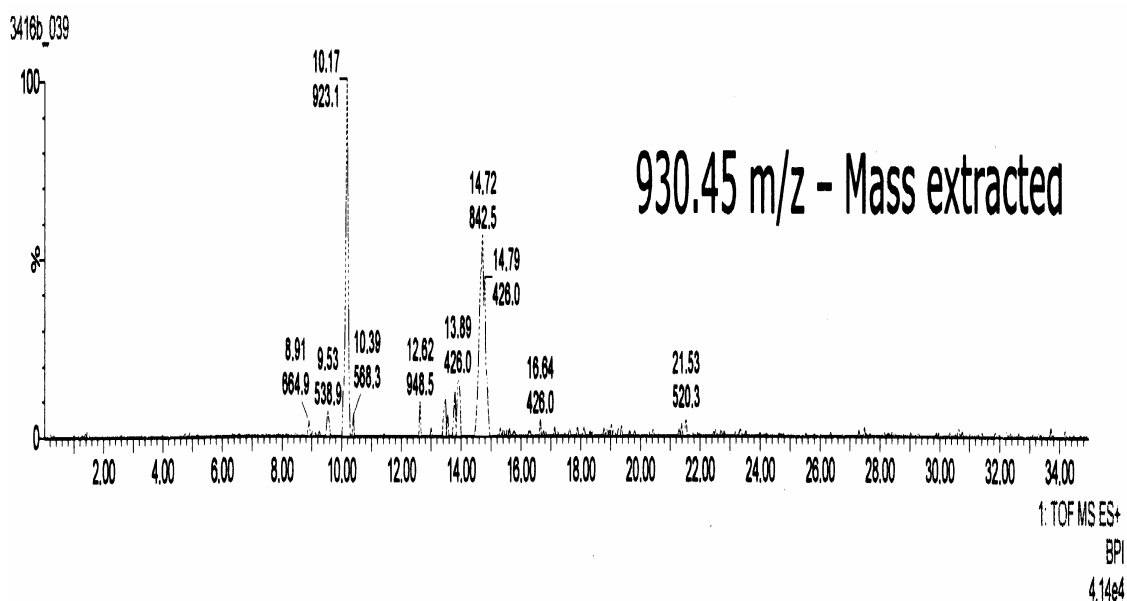


Obrázek 6: ELISA test přítomnosti AKH ve frakcích z RP HPLC dělení 20 hlav *P. scaber* (viz **obr. 5**). Ve frakci číslo 8 byla zaznamenána nejvyšší aktivita.

Hmotnostní a strukturní analýza

Pro ověření naší hypotézy, že CNS *P. scaber* obsahuje Panbo-RPCH, byl analyzován extrakt CNS. Výsledkem hmotnostní analýzy LC/MS byla molekulová hmotnost částice $M + H^+ = 930,45$ Da, což odpovídá hmotnosti peptidu 929,45 Da, která je identická se syntetickou molekulou RPCH.





Obrázek 7: Strukturální a hmotnostní analýza extraktu CNS *P. scaber*.

Test extraktu z CNS *P. scaber* na *P. apterus*

Testování aktivity extraktu CNS z *P. scaber* na mobilizaci lipidů bylo prováděno pomocí sulfo-fosfo-vanilínového testu. Odpařený methanolvý extrakt byl rozpuštěn v Ringrově fyziologickém roztoku a injikován do pokusných 10 dní starých samic *P. apterus* v dávce 2 CNS ekvivalent na jedince. Adipokinetická odpověď se však ukázala být nulová pravděpodobně z důvodu velmi nízké hladiny hormonu RPCH v CNS u *P. scaber* (výsledky neuváděny).

DISKUSE

Výsledky změny hladiny lipidů v hemolymfě u 10 denních samic *P. apterus* po aplikaci hormonu Panbo-RPCH ukázaly, že s přibývajícím dávkou stoupala i hladina lipidů v hemolymfě, ale to jen do okamžiku, než dávka hormonu dosáhla 10 pmol. Pak měla změna hladiny lipidů klesající tendenci. Vyšší dávky se zdály být méně efektivní. Tento jev není neobvyklý, byl již popsán u hormonů Pyrap-AKH a Locmi-AKH-I u plošnice *P. apterus* (Kodrík a kol., 2000) s tím rozdílem, že hormon Locmi-AKH-I měl přibližně dvakrát větší účinnost než Pyrap-AKH. Podobná situace byla zaznamenána i u druhého hormonu *P. apterus* – Peram-CAH-II (Kodrík a kol., 2002) a také u dalšího zástupce druhu ploštic *D. cingulatus* (Patočková, 2003).

Pro plošnice zřejmě platí, že maximální stimulaci hladiny lipidů v hemolymfě vyvolává optimální dávka AKH, přičemž vyšší dávky hormonu nejsou tak účinné. U jiných druhů hmyzu tento jev pro AKH/RPCH zástupce nebyl pozorován.

Metodou ELISA bylo testováno 16 frakcí na přítomnost AHK/RPCH v CNS extraktu *P. scaber*. Využívala se při tom králičí protilátka (IgG) proti Cys¹-Pya-AKH. Tato protilátka nerozeznává jen samotný Pyrap-AKH, ale i řadu dalších hormonů této rodiny včetně Panbo-RPCH (Goldsworthy a kol., 2002). Je zajímavé, že např. Locmi-AKH-I složený z 10 aminokyselin není rozpoznáván, přestože molekula tohoto peptidu obsahuje 8 identických aminokyselin oktapeptidu Pyrap-AKH plus 2 aminokyseliny navíc (viz **tab.2**). Použitá protilátka však rozpoznává poslední 4 zbytky Pyrap-AKH. Data naznačují, že Pro⁶, Asn⁷ a Trp⁸ spolu s amidem na C-konci jsou

nejdůležitější složky epitopu (Goldsworthy a kol., 2002). Panbo-RPCH a Pyrap-AKH se liší ve dvou aminokyselinách – v pozici 5 obsahuje Panbo-RPCH Ser a Pyrap-AKH Thr, a v pozici 7 Panbo-RPCH Gly a Pyrap-AKH Asn.

Panbo-RPCH	pGlu – Leu – Asn – Phe – <u>Ser</u> – Pro – <u>Gly</u> – Trp amid (Fernlund a Josefsson, 1972)
Locmi-AKH-I	pGlu – Leu – Asn – Phe – Thr – Pro – Asn – Trp – Gly – Thr amid (Stone a kol., 1976)
Pyrap-AKH	pGlu – Leu – Asn – Phe – <u>Thr</u> – Pro – <u>Asn</u> – Trp – amid (Kodrík a kol., 2000)

Tabulka 2: Primární struktura členů AKH/RPCH rodiny.

Přítomnost zástupců AKH/RPCH rodiny u suchozemských isopod byla až do dneška demonstrována jen imunohistochemicky (Nussbaum a Dirksen, 1995) a to např. u *Armadillidium vulgare* (Okay, 1945), *Trachelipus rathkei* (McWhinnie a Sweeney, 1955). Imunoreaktivní metodou byly také zkoumány nervové dráhy CNS u *O. asellus*.

U zástupců Decapoda imunochemický výzkum ukázal, že hlavní neurony oční stélky jsou RPCH-imunoreaktivní. CNS se neprojevuje jako neurohemální orgán a zdá se, že se skládá hlavně z interneuronů (Mangerich a kol., 1986, 1987). Interneurony *O. asellus* jsou přítomny v menším množství než u Decapoda, ale vykazují značné podobnosti. CNS *O. asellus* obsahuje celkem 20 silně RPCH-imunoreaktivních neuronů (Nussbaum a Dirksen, 1995).

Je zajímavé, že u korýšů nebyl dosud popsán žádný metabolický účinek Panbo-RPCH. Na druhé straně se však zdá, že Panbo-RPCH má

neuromodulační efekt u několika zástupců korýšů a je pravděpodobné, že hmyzí AHK mají také neuromodulační aktivitu. Socha a kol. (1999) dokonce navrhl, že neuromodulační role AKH by mohla být důležitá pro stimulaci lokomoční aktivity.

Přítomnost RPCH byla prokázána (včetně identifikace primární struktury) u *P. borealis*, *Cancer magister*, *Carcinus maenas* a *Orconectes limosus* (zástupci Decapoda), všechny struktury byly identické. Další přesvědčivé strukturní důkazy existují u 7 jiných druhů, což naznačuje, že RPCH má stejnou primární strukturu. Některé druhy hmyzu mají 2 nebo dokonce 3 druhy AKH (proč tomu tak je, není zcela vysvětleno) zatímco současné výsledky ukazují, že RPCH je u korýšů jen jeden (Keller, 1992). Neméně zajímavé je to, že RPCH je nejen u korýšů, ale i u některých zástupců Heteroptera, konkrétně Pentatomidae (ústní sdělení, Kodrík), což by mohlo být použito jako důkaz pro teorii, že hmyz a korýši jsou fylogeneticky související uzavřená skupina (Gäde a kol., 2003).

ZÁVĚR

1. U 10 denních samic *P. apterus* byl prokázán stimulační účinek hormonu Panbo-RPCH na hladinu lipidů v hemolymfě. Intenzita stimulace byla závislá na dávce hormonu. Změna hladiny lipidů v hemolymfě měla zvyšující se tendenci od 0,2 do 10 pmol, kdy bylo dosaženo maxima 6,731 mg/ml. S další zvyšující se dávkou hormonu se efekt snižoval.

2. V methanolovém extraktu CNS *P. scaber*, který byl purifikován pomocí RP HPLC, byla pomocí testu ELISA prokázána přítomnost AKH/RPCH zástupce. Nejvyšší aktivitu vykazovala frakce s retenčním časem odpovídající retenčnímu času syntetického RPCH.

3. LC/MS analýza prokázala přítomnost RPCH v CNS *P. scaber*.

4. Test na mobilizaci lipidů po injekci extraktu z CNS z *P. scaber* do *P. apterus* vykazoval minimální aktivitu, což naznačuje relativně nízký obsah RPCH v CNS *P. scaber*.

SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

CASTRUCCI, A.M.L., MENDES, E.G., 1975: Ultrastructure of the pigmentary system and chromatophorotropic activity in land isopods. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.* **149**, 467-479

FERLUND, P., JOSEFSSON, L., 1972: Crustacean color - change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis, *Science* **177**, 173-175

FINGERMAN, M., 1969: Cellular aspects of the control of physiological colour changes in crustaceans. *Am. Zool.* **9**, 443-452

FINGERMAN, M., 1970: Comparative physiology: chromatophores, *A. Rev. Physiol.* **32**, 345-372

GÄDE, G., MARCO, H.G., 2006: Structure, function and mode of action of select Arthropod neuropeptides, in: *Bioactive Natural Products (M)* (ed. A. U. Rahman), *Elsevier*, 69-139

GÄDE, G., HOFFMANN, K.H., SPRING, J.H., 1997: Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions, *Physiol. Rev.* **77**, 963-1032

GÄDE, G., AUERSWALD, L., ŠIMEK, P., MARCO, H.G., KODRÍK, D., 2003: Red pigment-concentrating hormone is not limited to crustaceans, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **309**, 967-973

GOLDSWORTHY, G.J., KODRÍK, D., COMLEY, R., LIGHTFOOT, M., 2002: A quantitative study of adipokinetic hormone of the firebug, *Pyrrhocoris apterus*, *J. Insect Physiol.* **48**, 1103-1109

HOLWERDA, D.A., VAN DOORN, J., BEENAKKERS, A.M.TH., 1977: Characterization of the adipokinetic and hypertrehalosemic substances from the locust corpus cardiacum, *Insect Biochem. Mol. Biol.* **7**, 422-435

KELLER, R., 1992: Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects, *Experientia* **48**, 439-448

KLEINHOLZ, L.H., 1937: Studies in the pigmentary system of Crustacea. I. Colour changes and diurnal rhythm in *Ligia baudiniana*. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.* **72**, 24-36

KLEINHOLZ, L.H., 1961: Pigmentary effectors, in: *The physiology of Crustacea* (ed. T.H. Waterman), New York, London: Academic Press 2, 133-169

KODRÍK, D., ŠIMEK, P., LEPŠA, L., SOCHA, R., 2002: Identification of the cockroach neuropeptide Pea-CAH-II as the second adipokinetic hormone in the firebug *Pyrrhocoris apterus*, *Peptides* **23**, 583-585

KODRÍK, D., SOCHA, R., ŠIMEK, P., ZEMEK, R., GOLDSWORTHY, G.J., 2000: A new member of the AKH/RPCH family that stimulates locomotory activity in the firebug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera), *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **30**, 489-498

MANGERICH, S., KELLER, R., DIRKSEN, H., 1986: Immunocytochemical identification of structures containing putative red pigment-concentrating hormone in two species of decapod crustaceans. *Cell Tiss. Res.* **245**, 377-386

MANGERICH, S., KELLER, R., DIRCKSEN, H., RAO, K.R., RIEHM, J.P., 1987: Localization of pigment-dispersing hormone (PDH) and coexistence with FMRamide immunoreactivity in the eyestalks of two decapod crustaceans. *Cell Tiss. Res.* **250**, 365-375

MAYER, R.J., CANDY, D.J., 1969: Control of haemolymph lipid concentration during locust flight: an adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. *J. Insect Physiol.* **15**, 611-620

McWHINNIE, M.A., SWEENEY, H.M., 1955: The demonstration of two chromatophorotropically active substance in the land isopods *Trachelipus rathkei*. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.* **108**, 160-174

NUSSBAUM, T., DIRCKSEN, H., 1995: Neuronal pathways of classical crustacean neurohormones in the central nervous system of the woodlouse, *Oniscus asellus* (L.). *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **B347**, 139-154

OKAY, S., 1945: L' hormone de contraction des cellules pigmentaires chez les isopodes. *Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul* **B10**, 116-132

PATOČKOVÁ, M., 2003: Adipokinetický hormon a energetický metabolismus u bavlníkového škůdce *Dysdercus cingulatus*, *Bakalářská práce, Biologická fakulta Jihočeské University v Českých Budějovicích*

RAO, K.R., RIEHM, J.P., ZAHNOW, C.A., KLEINHOLZ, L.H., TARR, G.E., JOHNSON, L., NORTON, S., LANDAU, M., SEMMES, O.J., SATTELBERG, R.M., JORENBY, W.H., HITZ, M.F., 1985: Charakterization of a pigment-dispersing hormone in eyestalks of the fiddler crab *Uca pugilator*. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 5319-5322

SOCHA, R., 1993: *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) – an experimental model species: a review. *Eur. J. Entomol.* **1**, 241-286

SOCHA, R., KODRÍK, D., ZEMEK, R., 1999: Adipokinetic hormone stimulates insect locomotor activity. *Naturwissenschaften* **88**, 85-86

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. *Eur. J. Entomol.* **101**, 29-35

STAHL, F., 1938a: Preliminary report on the colour changes and the incretory organs in the heads of some crustaceans. *Arkiv. Zool.* **B30**, 1-3

STAHL, F., 1938b: Über das Vorkommen von inkretorischen Organen und Farbwechselhormonen im Kopf einiger Crustaceen. *Lunds Univ. Arsskr. N.F.2* **34**, 1-20

STONE, J.V., MORDUE, W., BLATNEY, K.E., MORRIS, H.R., 1976: Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight. *Nature* **236**, 207-211

VAN MARREWIJK, W.J.A., VAN DEN BROEK, A.TH.M., VAN DER HORST, D.J., BEENAKKERS, A.M.TH., 1984: Hypertrehalosemic and hyperlipaemic responses to adipokinetic hormone in fifth larval instar locusts, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **14**, 151-157

ZÖLLER, N., KIRCH, K., 1962: Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. *Z. Gesamte Exp. Med.* **135**, 545-561