

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PEDAGOGICKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOLOGIE

**MĚŘENÍ RESPIRACE VYBRANÝCH MUTANTŮ
OCTOMILKY OBECNÉ (*DROSOPHILA MELANOGASTER*)**

Lucie Doulová

Vedoucí bakalářské práce: doc. PaedDr. Radka Závodská, Ph.D.

Odborní konzultanti: prof. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

RNDr. Anna Žaloudíková

Anotace

Bakalářská práce je experimentálně zaměřena. Hlavním úkolem bylo porovnat respiraci a zjistit rozdíly v množství vyprodukovaného oxidu uhličitého u vybraných linií octomilky obecné, *Drosophila melanogaster* (třída hmyz, řád Dvokřídlí). Byly porovnávány dvě kontrolní linie CantonS (divoký typ) a White eyed (bělooká linie) s mutantní linií AdoR⁻ (octomilky s mutací v adenosinovém receptoru). Bylo předpokládáno, že kontrolní linie vyprodukují nižší množství oxidu uhličitého než mutantní linie.

První část práce je věnována popisu adenosinového receptoru a působení adenosinu na metabolické pochody u savců a u hmyzu. Další důležitou součástí práce je podrobný popis metodiky měření respirace u mušek a popis chovu octomilek v laboratorních podmínkách. Výsledky měření a porovnání jednotlivých kontrolních linií s mutantní linií ukázaly, že mezi těmito liniemi nebyl statisticky prokazatelný rozdíl v produkci oxidu uhličitého.

Abstract

The Bachelor's thesis is concentrated in an experimental way. The main target was to compare the respiration and to find out the differences in the quantity of the produced carbon dioxide at the chosen lines of a fruit fly, *Drosophila melanogaster* (class insect, order dipterous). Two concrete checking lines CantonS (a wild type) and White eyed (a white-eyed line) were compared with a mutant line AdoR⁻ (a fruit fly with the mutation in adenosine receptor). It was supposed the control lines will produce a lower quantity of carbon dioxide than the mutant line.

The first part of the thesis is concentrated in the description of the adenosine receptor and the adenosine treatment on the metabolic process at mammals and at insect. Next important part of the thesis is the detail description of the measurement methodology of the respiration at a fly and the description of the fruit fly breed in the laboratory conditions. The results of the measurement and comparison of the particular checking lines with the mutant line showed that among these lines there was not any statistically proven difference in the production of carbon dioxide.

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/diplomové práce, a to v nezkrácené podobě Pedagogickou fakultou 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 výsledky 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.

Datum:

Podpis studenta:

Poděkování: Děkuji doc. PaedDr. Radce Závodské, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, důležité informace, cenné rady a za čas, který mi věnovala. Dále děkuji odborným konzultantům prof. RNDr. Michalu Žurovcovi CSc. a RNDr. Anně Žaloudíkové za umožnění práce, a především za pomoc při práci v laboratoři. Poděkování také patří mým rodičům a příteli, kteří mě během studia podporovali.

Obsah

1.Úvod	1
2.Teoretická východiska	3
2.1.Adenosin	3
2.1.1.Adenosinové receptory u savců	4
2.1.2.Adenosinový receptor u hmyzu.....	5
2.1.3.Regulace hladiny adenosinu.....	6
2.2.Charakteristika Drosophila melanogaster	8
2.2.1.Zařazení a vzhled	8
2.2.2.Rozmnožování a vývoj.....	9
2.2.3.Mutantní linie	10
3. Metodika	14
3.1.Materiál	14
3.1.1.Chov v laboratorních podmínkách.....	14
3.1.2.Příprava mutantů do pokusu.....	14
3.1.3.Pokusné organismy.....	14
3.2. Metodika měření respirace.....	15
4.Výsledky.....	20
4.1.Měření respirace vybraných mutantů octomilky obecné.....	20
4.1.1.Hodnoty respirace – pokusy prováděné na jednotlivci v komůrce	20
4.1.2.Hodnoty respirace – pokusy prováděné na čtyřech jedincích v komůrce	21
4.1.3.Srovnání respirace u jednotlivých linií	23
4.2.Optimalizace měření	23
5.Diskuse	24
6.Závěr.....	27
6.1.Produkce oxidu uhličitého u vybraných linií octomilky obecné.....	27
6.2.Využití studované problematiky ve výuce přírodopisu	27
7.Seznam literatury	29

1. Úvod

Poruchy metabolismu jsou častým problémem, který postihuje lidské zdraví. Proto zkoumání mechanismů, které regulují metabolismus, je zásadním vědeckým úkolem. Mnoho genů, jejichž poruchy (mutace) mohou způsobit lidská onemocnění, má tzv. homology (geny s podobnými vlastnostmi) u mušek, z toho důvodu je octomilka dobrým modelem pro studium signální dráhy zapojené do vývoje různých poruch.

Kromě toho, jednoduchý modelový organismus octomilka obecná, *Drosophila melanogaster*, usnadňuje genetické prohledávání (tzv. screening) při identifikaci nových terapeutických možností regulující metabolismus. Aby bylo možné provést takové zkoumání, je nutný jednoduchý a rychlý způsob, jak identifikovat změny v metabolickém stavu mušek. Obecně platí, že produkce oxidu uhličitého je dobrým ukazatelem oxidace substrátu a energetického výdeje, který poskytuje informace o metabolickém stavu organismů. Metoda měření emise oxidu uhličitého u mušek může potenciálně pomoci při identifikaci genetických poruch, které ovlivňují metabolismus (Yatsenko a kol., 2014).

Octomilka obecná je využívána jako důležitý modelový organismus pro genetické výzkumy již od roku 1901. Pro toto odvětví se využívá proto, že má krátký generační čas, snadný chov a zcela osekvenovaný genom, jenž obsahuje pouze čtyři páry chromozomů (tzn., že mají výrazně jednodušší genom než savci).

Cílem mé bakalářské práce bylo porovnání intenzity respirace vybraných linií *Drosophila melanogaster*. Testovali jsme, zda existuje fyziologický rozdíl v intenzitě respirace mezi divokým kmenem CantonS nebo linií s bílým okem tzv. *White eyed* (*w*) a mutantní linií s mutací v adenosinovém receptoru (*AdoR*). Bylo předpokládáno, že mutantní linie *AdoR* mají nižší produkci oxidu uhličitého, než kontrolní linie CantonS a *White eyed*.

Dalším úkolem mé bakalářské práce bylo optimalizovat některé podmínky měření respirace mušek, např. jaký je optimální počet jedinců v jedné komůrce, jaký je vliv stáří, jaký je vliv hmotnosti much, apod.

Experimenty byly prováděny v Biologickém centru akademie věd ČR, laboratoři Molekulární genetiky doc. RNDr. Michala Žurovce, CSc. na Entomologickém ústavu, za odborné konzultace RNDr. Anny Žaloudíkové. V této laboratoři probíhá mnoho dalších fyziologických pokusů nejen na mutantech octomilky obecné, ale také např. na čmelácích, bourci morušovém, zavíječi voskovém.

2. Teoretická východiska

2.1. Adenosin

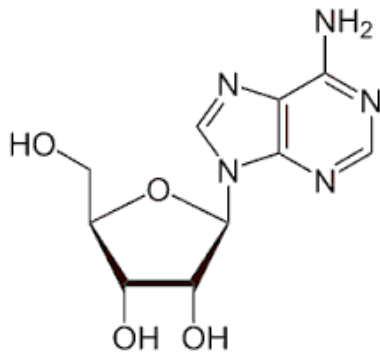
Adenosin (Ado) je purinový nukleosid složený z cukru ribózy a adeninu, které jsou spojeny α -N₆-glykosidickou vazbou (obr. 1). Je součástí nukleových kyselin, adenosinmonofosfátu (AMP) a adenosintrifosfátu (ATP) a tak se podílí na energetických pochodech v buňce. Účinek Ado je zprostředkován několika povrchovými receptory (ILLES et al., 2000). Díky rychlému poločas rozpadu se adenosin mimo buňku rychle metabolizuje na inosin (Griffiths et al., 1997).

Adenosin vně buněk je zároveň i signální molekulou tzv. „messengerem“, tzn., že reguluje některé fyziologické procesy v těle. Podílí se také na spouštění programované buněčné smrti (apoptózy), regulaci funkce iontových kanálů a na regulaci homeostázy (stálost proměnlivých veličin v organismu). Rovněž redukuje hladiny adenylcyklázy a fosfolipázy C.

Lepší porozumění adenosinové signální dráhy by mělo přispět k objasnění důležitých fyziologických mechanismů, a tím k vývoji strategie pro léčbu různých lidských onemocnění, například tachykardie, poruch spánku, imunitních a zánětlivých onemocnění (Jacobson and Gao, 2006).

Adenosin se vytváří především defosforylací intra- nebo extracelulárních adeninových nukleotidů (například adenosintrifosfátu (ATP), adenosinmonofosfátu (AMP) a adenosindifosfátu (ADP) pomocí enzymu 5'-nukleosidázy). Také existují další procesy, při nichž může adenosin v tkáni vznikat, jako je hydrolýza S-adenosylhomocysteinu, nebo degradace RNA pocházejících z apoptických buněk.

K transportu adenosinu přispívají specifické transportní proteiny, které usnadňují jeho přenos přes buněčné membrány v obou směrech. Obousměrná doprava adenosinu je prováděna dvěma různými typy přenašečů: a) rovnovážnými nukleosidovými přenašeči – přepravují oběma směry oba purinové a pyrimidinové nukleosidy přes membránu do rovnováhy; b) koncentračními nukleosidovými přenašeči – zprostředkují transport nukleotidů přes membránu do buněk za pomoci sodíkových iontů.



Obr. 1 – Molekula adenosinu

2.1.1. Adenosinové receptory u savců

Adenosinové receptory (AdoR) patří do velké skupiny receptorů spřažených s tzv. G-proteiny, které umožňují spojení mezi informační molekulou (tj. chemickým signálem, jenž funguje jako tzv. první posel) navázanou na membránový receptor a dalšími molekulami v buňce (Fredholm et al., 2000). U savců rozlišujeme 4 typy adenosinových receptorů označovaných jako: A_1 , A_{2A} , A_{2B} a A_3 (Dal Ben et al., 2006). Funkce adenosinového receptoru je velmi důležitá během stresových podmínek (jako např. zánět, nádor a další; Nehling, 2004). V klidových podmínkách adenosin podporuje spánek a potlačuje stres. Extracelulární adenosin se během stresových podmínek uvolní do mimobuněčného prostoru, kde působí na ostatní buňky jako stresový signál.

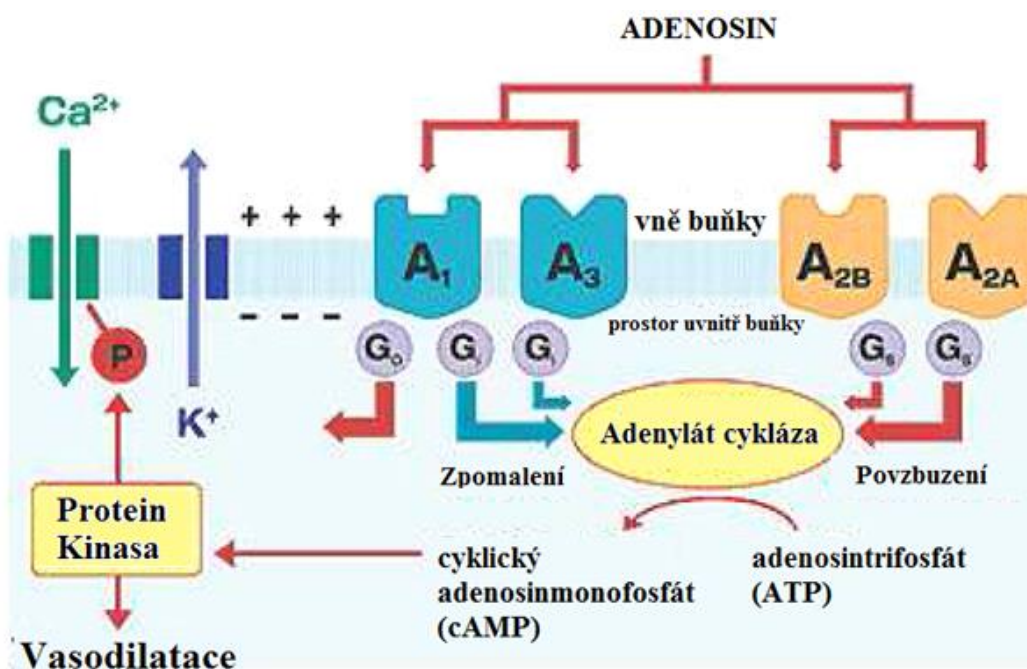
Aktivace A_1 a A_3 receptorů zpomaluje funkci adenylátcyklázy, která přes G proteiny způsobuje snížení produkce cAMP, kdežto A_{2A} a A_{2B} zvyšují produkci cyklického adenosinmonofosfátu (obr. 2).

A_1 receptory se nacházejí na povrchích buněk v srdci, žaludku, chámovodu, slezině, tukové tkáni, varlatech, ledvinách, močovém měchýři, mozku, aortě, játrech a také oku. Velmi důležitou roli hrají v CNS a v kardiovaskulárním systému. Tyto receptory slouží k regulaci uvolňování neurotransmiterů a depolarizaci membrán nervových buněk. A_1 receptor je vytvářen v CNS v mikroglíích a neuronech.

V buňkách hladkého svalstva stěn cév mají A_{2A} receptory důležitou funkci, protože způsobují jejich vasodilataci (např. při nedostatku kyslíku). Aktivace A_{2A} receptoru při růstu nádoru způsobuje to, že dojde k snížení množství T-lymfocytů a zároveň k poklesu protizánětlivých cytokinů, což přispívá k růstu nádoru.

A_{2B} receptor je aktivován při zvýšené hladině extracelulárního adenosinu, to znamená, že začíná působit ve stresových situacích (Fredholm et al., 2001).

Receptor A₃ lze nalézt v mozku, kde vykonává dosud neznámou funkci. Bylo prokázáno, že pozitivně působí na onemocnění srdce a plic (Chen and Wiley; 2006). Aktivace receptoru A₃ inicializuje sekreční odpověď žírných buněk na antigeny (Beaven et al., 1994).



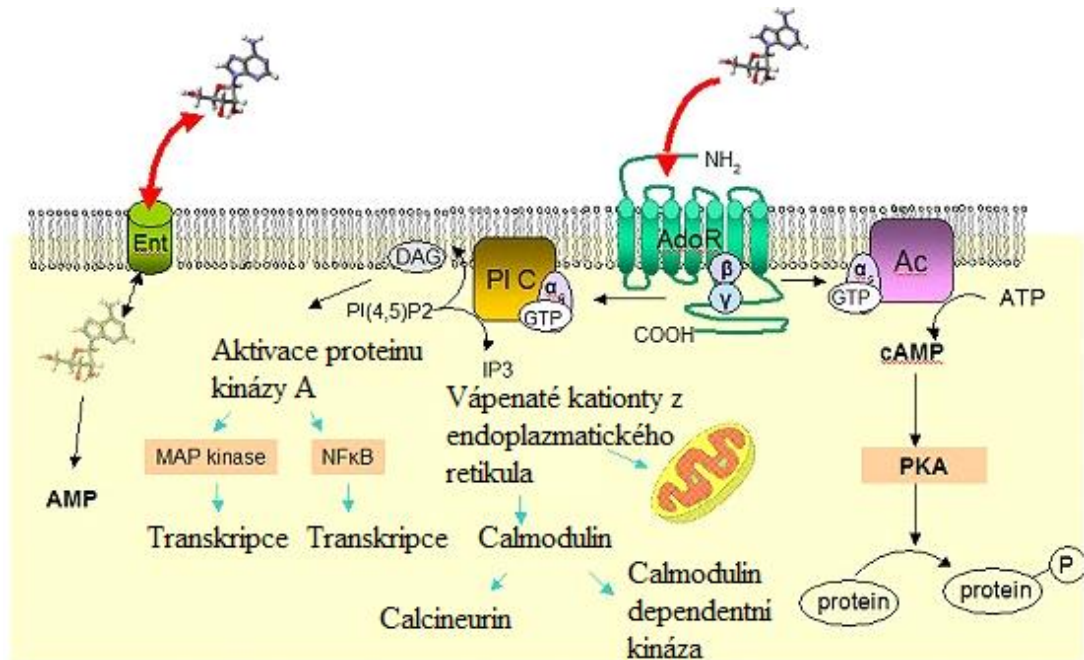
Obr. 2 – Působení adenosinových receptorů u savců (převzato a upraveno podle www.journal.frontiersin.org). Aktivací A₁ a A₃ receptorů dochází k aktivaci G proteinů, díky nimž dojde ke zpomalení funkce adenylátcyklázy. Adenylátcykláza přes G_s proteiny způsobí snížení produkce cAMP. A_{2A} a A_{2B} naopak zvyšují produkci cyklického adenosinmonofosfátu.

2.1.2. Adenosinový receptor u hmyzu

Octomilka obecná má pouze jeden adenosinový receptor (AdoR), (obr. 3; Doleželová, 2004). Uspořádání adenosinového receptoru u octomilky je velmi podobné receptorům savců a sdílí oblast důležitou pro signalizaci. AdoR se nejvíce podobá savčímu receptoru A_{2A} (Doleželová et al., 2007). AdoR u octomilky je podobně jako lidský A_{2A} schopen zvýšit hladinu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP).

Při vysoké hladině adenosinu dochází k úmrtí drozofilích larev. Důvodem je, že dochází k přílišnému uvolňování energie ze zásob, kdy adenosin funguje jako anti – insulinový hormon (udržuje množství glukózy v hemolymfě; Zuberová et. al., 2010).

Nesprávná signalizace AdoR způsobuje zvýšení cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) a vápenatých iontů (obr. 3). Více kopií genu AdoR (overexprese) v muškách, způsobuje vznik melanotických nádorů a deformit křídel (Doleželová et. al., 2007).



Obr. 3 – Působení adenosinového receptoru u hmyzu – Na adenosinový receptor (AdoR) se naváže protein, který ho zaktivuje. Zaktivovaný receptor dále působí na G protein, který kaskádovou reakcí zaktivuje protein kinázy A. AdoR zvyšuje množství cyklického adenosinmonofosfát (cAMP) a vápenatých kationtů (Ca^{2+}). Dále dochází k aktivaci proteinu kinázy A (převzato a upraveno z www.entu.cas.cz).

2.1.3. Regulace hladiny adenosinu

Důležitou součástí regulace hladiny adenosinu jsou molekuly přenášející adenosin oběma směry přes buněčnou membránu tzv. transportéry. Rozdělují se na tzv. *ekvilibrační*, které fungují na základě usnadněné difuze. A transportéry *koncentrační*, které využívají aktivního transportu, při němž adenosin prostupuje do buněk přes membránu proti chemickému nebo koncentračnímu spádu. Zároveň se přes membránu přesouvají sodné ionty ve směru svého elektrického nebo chemického gradientu (tzv. symport).

K udržení dostatečné hladiny adenosinu se musí tvorba a výdej rovnat.

Tvorba adenosinu

Adenosin může být produkován skupinami buněk, které mohou být „stresovány“ různými negativními faktory. Nejčastějším způsobem produkce je hydrolýza adenosintrifosfátu (ATP) na adenosindifosfát, který může být dále defosforylován na adenosinmonofosfát (AMP). Mezi hlavní způsoby tvorby adenosinu patří transmethylace S-adenosyl-L-10, hydrolýza AMP a rozklad cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP; Barsotti and Ipata, 2004).

Odbourávání adenosinu

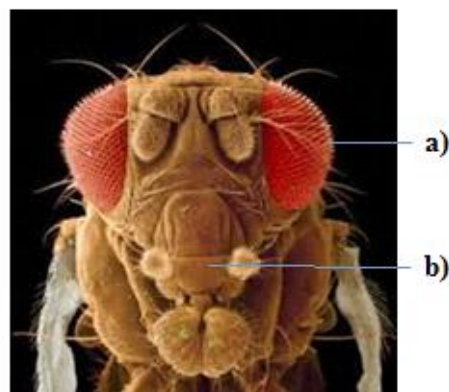
Odbourávání adenosinu je závislé na typu tkáně, ale také na koncentraci adenosinu. Při hodnotě nižší jak 3 μM dochází k fosforylaci adenosinu adenosin kinázou (AK) na adenosinmonofosfát (AMP). Při hodnotě vyšší jak 5 μM je adenosin deaminován adenosindeaminázou (ADA) na inosin. Inosin je dále rozložen na hypoxantin a výsledným produktem je kyselina močová.

2.2. Charakteristika *Drosophila melanogaster*

2.2.1. Zařazení a vzhled

Octomilka obecná je členem řádu Dvoukřídlí (*Diptera*). Zařazuje se do skupiny Kruhošví (*Cyclorrapha*), do čeledi Octomilkovití (*Drosophilidae*).

Dvoukřídlí se vyznačují tím, že mají lepší letové vlastnosti proto, že zadní pár křídel je přeměněn v kyvadélka (*haltery*). Haltery se při letu pohybují společně s prvním párem křídel, tím řídí směr letu a slouží jako rovnovážný orgán. Jejich tělo je rozděleno na hlavu, hrud' a zadeček. Na hlavě mají umístěná kromě složených očí také tykadla a sací ústní ústrojí (obr. 4). Mají 3 páry nohou, na kterých jsou umístěny chuťové buňky.



Obr 4. – Octomilka – hlavová část: a) Složené oči z omatidií, b) sací ústní ústrojí (převzato a upraveno z www.bioscireader.blogspot.cz)

Oči mají červené, složené z omatidií, které u nich způsobují mozaikovitě vidění. Tento typ očí jim umožňuje lepší odhad vzdáleností, ale zrak není tak přesný jako u obratlovců. U octomilky se setkáváme ještě s orgány sloužící k vnímání intenzity světla a její změny tzv. *ocelli*.

Octomilka obecná je poměrně malých rozměrů (2-3 mm). Její tělo je zbarveno do hněda a na zadečku samců přechází až do černa. Na těle vyrůstá jeden pár křídel, který se tvoří od středního segmentu hrudníku. Z poslední části thoraxu se tvoří rudimentálně přeměněný pár křídel zvaný kyvadélka (Raven and Johnson, 1999).

U mušek rodu *Drosophilidae* není zachováno původních šest párů hlavových ganglií ale pouze tři, které vytvářejí mozek. Ten se skládá ze tří částí – protocerebrum, tritocerebrum a deutocerebrum. Protocerebrum je umístěno na vrchní straně hlavy. Po stranách protocerebra jsou umístěná houbovitá tělesa, jsou tvořena interneurony, z nichž vybíhají optické laloky. Tritocerebrum inervuje vnitřní orgány a ovládá nervy trávicího traktu. Deutocerebrum obsahuje olfaktorické laloky, které fungují jako centrum čichu, protože tam ústí čichové nervy z tykadel (Kodrík, 2004). Na břišní straně těla mají břišní pásku tvořenou ganglii, která se nespojila v mozek.

U octomilky jsou prokázány dva druhy paměti, tzv. krátkodobá, která uchovává vjemy pár sekund a dlouhodobá, která má schopnost uložit neomezené množství informací. Při dlouhodobé paměti dochází ke změnám na neuronech.

Ze smyslových receptorů octomilka nejvíce využívá fotoreceptory, jimiž vnímá světlo. Chemoreceptory, které zachycují chuť a čich. Mechanoreceptory, které zaznamenávají dotyky a informace o aktuální pozici těla.

Vyvinul se sexuální dimorfismus, kdy samec, na rozdíl od samic, má v okolí řitního otvoru a genitálu vytvořené tmavé chloupky. Dalším odlišným znakem je velikost, samec je vždy výrazně menší než samice a na zadečku se nachází u samce černá skvrna (obr. 5). Vývoj od vajíčka k dospělci trvá přibližně deset dní, kdy prochází stádiem larvy, kukly a nakonec dospělce.



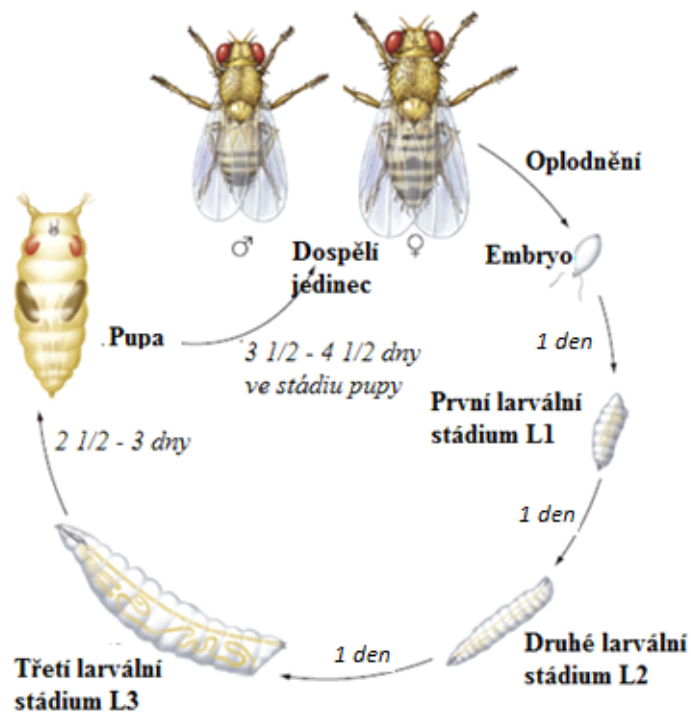
Obr. 5 - Pohlavní dimorfismus *Drosophila melanogaster* (převzato z www.berkeley.edu) – „divoký typ“- samice (vlevo)- výrazně větší; samec (vpravo)- menší než samice, samec má na zadečku černou skvrnu a chloupky okolo genitálu a řitního otvoru.

2.2.2. Rozmnožování a vývoj

Pářící rituál začíná tzv. „zásnubním tancem“, kdy samec mává intenzivně křídly okolo samičky, při němž vyluzuje zvuk, který samička přijímá tykadly (Jasič a kol., 1997). Poté dochází k páření, kdy si sameček přidržuje samičku pomocí hřebínku na zadečku.

V laboratorních podmínkách (tzn. při stejné teplotě 25°C, při stejném osvětlení, při stejné velikosti populace v jedné zkumavce apod.), trvá životní cyklus, od oplodnění do vzniku dospělého 10 dní (Speight et. al., 2008). Prochází těmito vývojovými stádii: vajíčko, první larvální stádium L1, druhé larvální stádium L2, třetí larvální stádium L3, kukla a imago. Larvy se vylíhnou během jednoho dne, po 4 dnech se dvakrát svléknou a poté se zakuklí (obr. 6).

Samice je schopna během svého života vyprodukovat až 3000 jedinců. Na jejím těle je uložena spermatéka, kde jsou umístěny spermie. Během jednoho páření tak může vzniknout až několik set jedinců. Larvy se živí dužninou ovoce, ale také kvasinkami, které jsou v ovoci přítomné. V laboratorních podmínkách se živí speciálně vytvořenou směsí, jejíž složení je popsáno v kapitole 3.1.1. Chov v laboratorních podmínkách.



Obr. 6 - Životní cyklus *Drosophila melanogaster* (převzato a upraveno www.igfl.ens-lyon.fr)

2.2.3. Mutantní linie

Octomilku obecnou první použil jako genetický model Thomas Hunt Morgan, který získal jako první biolog Nobelovu cenu. O významný posun ve výzkumu genomu octomilky se zasloužili Christian Nüsslein-Volhard, Edward Lewis a Eric Wieschaus. Tito biologové objevili geny řídící diferenciaci vajíček u mušky.

Drosophila melanogaster je využívána jako genetický model především proto, že má oproti savcům výrazně jednodušší genom, jež je zcela osekvenovaný. Od savců se liší mimo jiné i tím, že mají pouze jeden adenosinový receptor (popsáno v kapitole 2.1.2. Adenosinový receptor u hmyzu), přičemž savci mají čtyři adenosinové receptory, u kterých je jen částečně zjištěna funkce.

U octomilky se vyskytují 4 páry chromozomů (chromozomy 1, 2 a 3 jsou větší než pohlavní chromozom 4). Na chromozomech se nacházejí geny označované jako: Maternální geny, Geny řídící tvorbu kompletních orgánů, Geny řídící článkování těla, Geny párového pravidla a Homeotické geny (Vyskot, 1999).

Mutantní linie jsou vytvářeny pomocí křížení za vzniku homozygotních jedinců (pokud mutace nezpůsobuje smrt jedinců) nebo se udržuje v heterozygotním stavu pomocí tzv. balancerových chromozomů. To jsou umělé chromozomy, které zamezují rekombinaci s homologním chromozomem.

Octomilky se využívají při výzkumu genetiky pro jejich krátký generační čas, který umožňuje v poměrně krátké době sledovat výsledky pokusů. Dalším podstatným prvkem pro laboratorní práci je jejich snadný chov (popsáno v kapitole 3.1.1. Chov v laboratorních podmínkách), který je u octomilek o mnoho jednodušší a levnější než u savců.

V prvních genetických studiích byly zkoumány pouze fyziologické znaky octomilky, které se využívaly při výzkumu typického genotypu. Pro pozdější studie vědci využívaly jedince, kteří se po vylíhnutí odlišovali od ostatních, jak po morfologické (vnější stavbou organismu), tak po fyziologické stránce.

Až od 30. let 20. století vědci cíleně zasahovali do genů a tím ovlivňovali genotyp (= veškerá genetická informace uložená v DNA) i fenotyp (= soubor viditelných vlastností živého organismu) zkoumaného jedince. Vzniklo mnoho mutantních linií, které umožňují zkoumání nejrůznějších vlastností. V současné době jsou tisíce mutantů *Drosophila melanogaster* udržovány v genetických bankách, odkud jsou vědcům na objednávku zasílány poštou.

Ukázkové linie octomilky obecné nesoucí mutace, jejichž projevem jsou viditelné znaky – tzv. „markery“ (Chyb and Gompel, 2013)

Wild type = typ octomilky volně žijící v přírodě

Short winged = tato mutace je zvláštní, protože pokud poškozený gen dostane od obou rodičů, pak nedochází k expresi genu. Fenotypovým znakem je nemožnost létání.

Curly winged = tyto mušky nedokáží létat, protože její křídla jsou stočena (Obr. 4)
- z toho důvodu může jen poskakovat

Yellow = této mutantní octomilce chybí tmavý pigment - je zbarvena do žluta

Ebony = recesivní mutace, která způsobuje, že celé tělo má tmavé zbarvení

Orange eyed = recesivní mutace projevující se oranžově zbarveným okem, na zrak mušky tato mutace nemá vliv

White eyed = recesivní mutace na pohlavním chromozomu (samci a samice mají rozdílný počet kopií genu) způsobuje bílé zbarvení očí (obr. 7)

Eyeless = tato mutace způsobuje, že nedochází během vývoje k růstu oka, což znemožňuje zrak

Antennapedia = dominantní mutace, která nemusí být zřejmá na první pohled. U této mouchy došlo ke ztrátě tykadel. Dalším fenotypovým znakem je, že má o jeden pár nohou navíc, které vyrůstají z hlavové části.



Obr. 7 – Mutantní linie *D. melanogaster* – vlevo „curly“, vpravo „white“ (převzato z theconversation.com)

3. Metodika

3.1. Materiál

3.1.1. Chov v laboratorních podmínkách

Mušky do pokusů musí být chovány v laboratorních podmínkách, protože jen tak lze zajistit konstantní životní podmínky všech jednotlivců. Octomilky jsou umístěny ve skleněných zkumavkách (tzv. vialkách), které jsou z jedné čtvrtiny zaplněny speciálně vytvořenou potravou. Potrava je tvořena z kukuřičné mouky, vody, cukru, agaru a kvasnic.

3.1.2. Příprava mutantů do pokusu

Octomilky používané ke genetickým pokusům musí být chovány ve stálých životních podmínkách (popsáno v kapitole 3.1.1. Chov v laboratorních podmínkách). Změna těchto faktorů může vést např. ke zpomalení vývojového cyklu, při nepřiměřeném množství octomilek ve zkumavce může vést ke zmenšování chovaných jedinců. Narušení těchto podmínek by mohlo vést k ovlivnění výsledků měření respirace.

Před samotným pokusem musí být zajištěn dostatek výzkumného materiálu – samců stejného stáří. Samci jsou do pokusu vybíráni pro jednodušší srovnání jedinců z pokusných linií, kdy nedochází k interferenci s reprodukčním cyklem samic.

Na začátku vývojového cyklu (před vylíhnutím) musí být odsypány starší generace octomilek ze zkumavky. Ve zkumavkách byly zachovány pouze kukly před vylíhnutím, z nichž po třech až čtyřech hodinách byli odděleni samci – tím byl zajištěn stejný věk mušek. Samci byli vybíráni pomocí mikroskopu na základě sexuálního dimorfismu, který je u *Drosophila melanogaster* dobře patrný, jak je uvedeno v kapitole 2.2.1. Zařazení a vzhled. Vybraní samci byli umístěni do zkumavek se speciálně vytvořenou dietou (popsáno v kapitole 3.1.1. Chov v laboratorních podmínkách). Měření probíhaly na šesti až osmi denních samcích, jejichž věk byl určen na začátku výzkumu.

3.1.3. Pokusné organismy

Pokusy byly uskutečněny se třemi liniemi octomilky obecné. Prvním typem byl CantonS, divoký typ octomilky bez genetické mutace s běžným červeným okem.

Druhým byl AdoR⁻, mutant octomilky, který má genetickou mutaci v adenosinovém receptoru. Při genetické úpravě tohoto mutanta byl do jeho buňky vložen velký segment genu z divokého typu (*white*, značeno jako *w⁺*). Vložení tohoto segmentu neumožňuje octomilce vytvořit adenosinový receptor.

Poslední linií byla bělooká muška tzv. *White eyed* (značeno *w⁻*), které chybí červené barvivo v omatidiích. Tato linie je bez genetické mutace na adenosinovém receptoru. V našem výzkumu byl využíván jako kontrolní mutant. Využíváme ji proto, že tato linie byla použita jako genetický „background“ při přípravě mutanta. Z toho důvodu je z genetického hlediska lepší kontrolou.

3.2. Metodika měření respirace

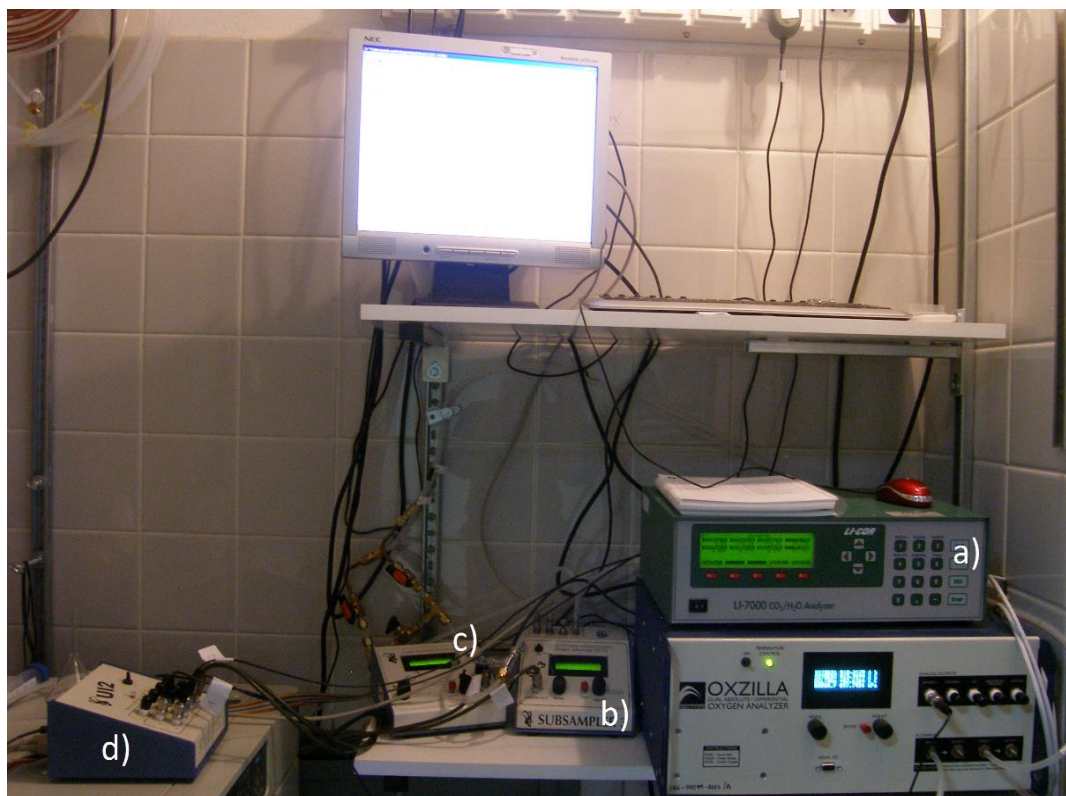
Šesti až osmi denní samci byli vkládáni do zkušebních komůrek, kdy v jedné komůrce byl jeden, případně čtyři samci stejné mutace. Při přemísťování samců do komůrek nebylo možné využít anestezie pomocí oxidu uhličitého, jako se běžně používá při práci s mouchami, z důvodu ovlivnění výsledků. Jednotlivé komůrky o obsahu 8 ml (případně 14,5 ml) byly připojeny k přístroji měřícího výdej oxidu uhličitého. Komůrky jsou skleněné, na obou koncích utěsněné plastovými zátkami, aby tam nevnikal vzduch z okolí (obr. 8).



Obr. 8. – Skleněné komůrky používané k měření v respirometru – na obou koncích jsou utěsněny plastovými zátkami. Horní komůrka je o objemu 8 ml a dolní komůrka je o obsahu 14,5 ml.

S takto připravenými octomilkami, pomocí přístroje – respirometru (popsán níže), byla měřena hladina vydýchaného oxidu uhličitého za daný časový úsek. V pokusu byly vždy kontrolní mušky – „wild type“ (CantonS či White eyed) a mutantní linie AdoR⁻.

Měření bylo prováděno na respirometru se systémem LI-7000 CO₂ / H₂O analyzátor, který byl zkonstruován ing. Michalem Šerým. Pomocí tohoto přístroje byla stanovena produkce oxidu uhličitého u experimentálních mušek. Do srovnávací komůrky analyzátoru proudil čistý dusík, ve kterém by neměl být žádný oxid uhličitý (obr. 9). S touto referenční hodnotou byla pak srovnávána koncentrace CO₂ ve vzduchu, který prochází komůrkami.



Obr. 9. – Přístroje potřebné k pokusu – a) přístroj na měření oxidu uhličitého, b) přístroj, který reguluje průtok dusíku, c) přístroj regulující průtok kyslíku, d) přístroj, který zpracovává informace z přístroje a dále zasílá do počítače.

Mušky v jednotlivých komůrkách byly analyzovány celkem 85 minut při průtoku stlačeného vzduchu 40 ml/min. Tyto parametry se spolu s hmotností živé hmoty musí být zohledněny v závěrečném výpočtu. K přístroji bylo připojeno osm komůrek, v kterých probíhalo měření (obr. 10). První komůrka byla prázdná tzv. referenční komůrka, kde probíhalo měření množství oxidu uhličitého ve vzduchu. Obsah naměřeného oxidu uhličitého v této referenční komůrce byl zohledněn při výpočtech oxidu uhličitého v komůrkách s muškami.

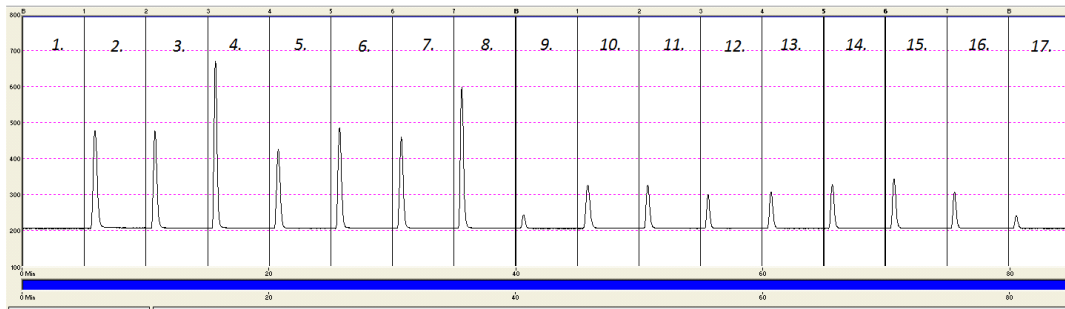


Obr. 10 – Komůrky s octomilkami umístěné v respirometru – osm komůrek je připojeno pružnými hadičkami k analyzátoru, kde ve dvou krocích probíhá měření respirace. První komůrka (u svítící kontrolky) je tzv. referenční (prázdňá) pro změření množství oxidu uhličitého v komůrce.

Měření v přístroji probíhalo ve dvou po sobě jdoucích krocích (obr. 11). Nejprve bylo v přístroji změřeno množství oxidu uhličitého, ve kterém byl zahrnut i přebytek množství načerpaného ze vzduchu. V druhém kroku měření docházelo už k přímému měření vyprodukovaného oxidu uhličitého octomilkami.

V druhé sérii výzkumu byly mušky těsně po změření dat v přístroji zváženy. Bylo nutné vážit více jedinců najednou, protože čím nižší hmotnost, tím je vyšší riziko vzniku nepřesností.

Výstupem z měření bylo grafické znázornění (obr. 11). Graf je rozdělen na 17 příčných segmentů (při jednom měření jsou jednotlivé komůrky profukovány dvakrát – při prvním měření množství zahrnuje i oxid uhličitý ze vzduchu), které zobrazují měřené komůrky. První, devátý a sedmnáctý segment je prázdňá tzv. kontrolní komůrka.



Obr. 11 – Graf naměřených hodnot – Segment první, devátý a sedmnáctý znázorňuje množství oxidu uhličitého v prázdných zkumavkách. V druhém až osmém segmentu je měřena hladina oxidu uhličitého ze vzduchu a CO₂ vyprodukovaným octomilkami. Funkce v desáté až šestnácté části znázorňují množství oxidu uhličitého vydýchaného octomilkami. Na ose x jsou udány jednotky času (min.), na ose y je hodnota ppm (part per million), relativní hodnota oxidu uhličitého před transformací na μl/min.

Od naměřených hodnot oxidu uhličitého v komůrkách s octomilkami musí být odečtena průměrná hodnota zjištěného množství oxidu uhličitého v referenční komůrce, která byla naměřena na začátku a konci druhého kroku měření (obr. 8 – devátý a sedmnáctý segment). Toto je prováděno proto, aby oxid uhličitý přítomný po „profouknutí“ komůrek neovlivnil měření.

Data z těchto měření byla analyzována pomocí softwaru (Sable System, Las Vegas, Nevada, USA).

Vyhodnocení proběhlo v programu Microsoft Excel, pomocí vzorce (viz vzorec č. 1), který zjišťuje z integrálu funkce množství oxidu uhličitého v závislosti na čase a počtu jedinců. Určuje množství vydýchaných jednotek oxidu uhličitého za jednotku času (μl/min).

$$C = \frac{C_1}{1000 N X Y Z \gamma}$$

Vzorec č. 1 – Vztah pro výpočet množství oxidu uhličitého z plochy funkce: C₁ udává hodnotu integrálu funkce (plochou pod křivkou) jednotlivých komůrek zobrazené v grafickém znázornění výsledku měření. Množství oxidu uhličitého změřeného v kontrolní komůrce ve druhé fázi měření je zprůměrováno. Tato průměrná hodnota (tzv. background) je odečítána od

množství oxidu uhličitého v komůrkách s mouchami. N = počet much v komůrkách; $X = 1000000$ – převádí výpočet na absolutní číslo; $Y = 60$ (přepočet na sekundy); Z = čas měření respirace much v sekundách (40 minut); \dot{a} = průtok za min – 40 ml/min (popsáno v Lighton, 2008)

Výsledky jednotlivců s mutací byly srovnávány s výslednými hodnotami kontrolních vzorků.

4. Výsledky

4.1. Měření respirace vybraných mutantů octomilky obecné

Měření vydýchaného oxidu uhličitého bylo prováděno na kontrolních liniích, na tzv. CantonS a bělooké linii tzv. White eyed, a na geneticky pozměněné linii tzv. AdoR⁻ (popsáno v kapitole 3.1.3. Pokusné organismy). Hlavním úkolem bylo porovnat míru respirace mezi výše zmíněnými liniemi.

Zjištěná data objemu oxidu uhličitého naměřených u jedinců v jednotlivých liniích byla zprůměrována. V druhé části pokusů byla zohledněna i hmotnost mušek, to znamená, že hodnota vyprodukovaného CO₂ byla přepočtena na množství oxidu uhličitého na gram živé hmotnosti. Z jednotlivých pokusů byla vypočtena směrodatná odchylka u každé z linií, která ukazuje individuální rozdílnost jednotlivých samců stejné mutace v respiraci.

Po celkovém vyhodnocení byl proveden tzv. t – test. Zjišťuje, zda měření u jednotlivých linií je významně rozdílné. Pro případ statistické prokazatelnosti by hodnota t-testu P musela být menší než 0,05.

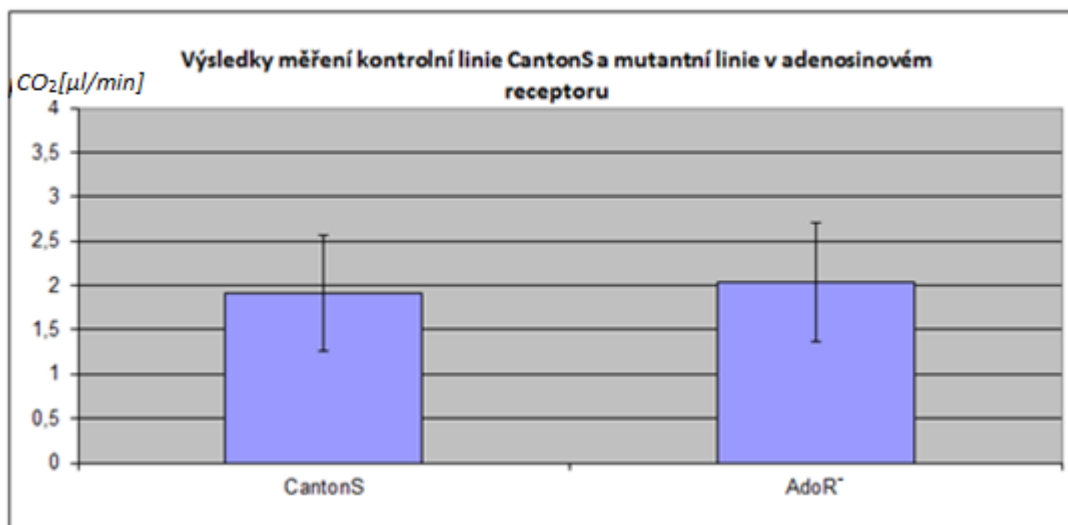
4.1.1. Hodnoty respirace – pokusy prováděné na jednotlivci v komůrce

Počátečních osm měření respirace bylo uskutečněno s jedním samcem v jedné komůrce o velikosti 8 ml. Celý proces pokusu probíhal osmdesát pět minut při průtoku stlačeného vzduchu 40 ml/min. Při celém procesu chovu a měření byly dodržovány laboratorní podmínky (popsáno v kapitole 3.1.1. Chov v laboratorních podmínkách).

V této fázi byla porovnávána kontrolní linie CantonS a mutantní linie AdoR⁻ (znázorněno v grafu č. 1). V těchto měřeních nebyla zohledňována hmotnost jedinců.

Průměrná hodnota množství oxidu uhličitého vyprodukovaná kontrolní linií CantonS byla 1,91 μl/min (u ní byla změřena směrodatná odchylka ve velikosti 0,646). Na rozdíl od kontrolní linie byla u mutantní linie AdoR⁻ zjištěna průměrná hodnota vydýchaného oxidu uhličitého 2,03 μl/min (se směrodatnou odchylkou 0,671; zobrazeno v grafu č. 1).

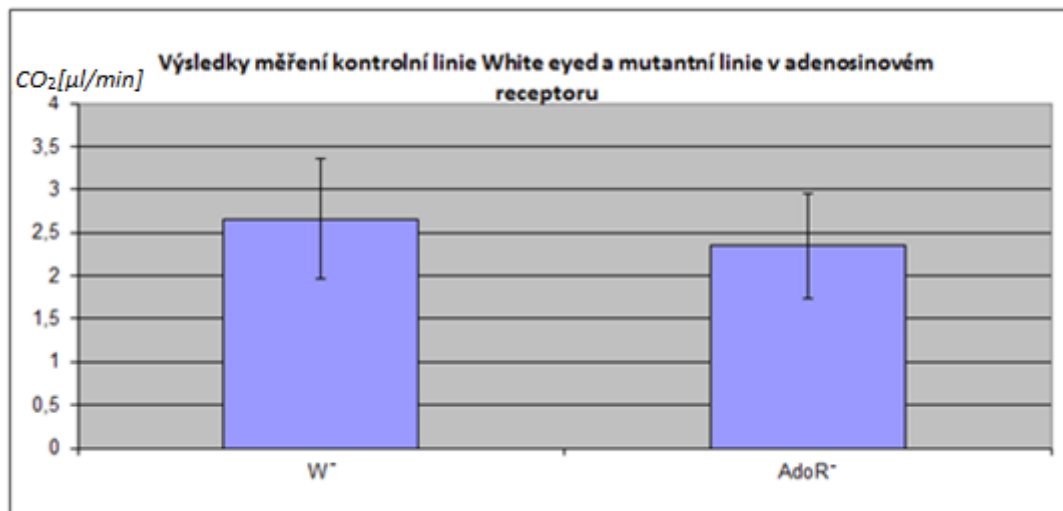
Hodnota t-testu byla 0,384, z čehož vyplývá, že měření není statisticky prokazatelné ($P > 0,05$).



Graf č. 1 – Porovnání výsledků mezi kontrolní linií CantonS a mutantní linií AdoR⁻: Na ose y je znázorněno množství vydýchaného oxidu uhličitého v μl/min. Z grafického znázornění je zřetelné, že rozdíl mezi jednotlivými liniemi není velký. V grafu je vložena směrodatná odchylka, která zobrazuje odchylku naměřených hodnot od průměru.

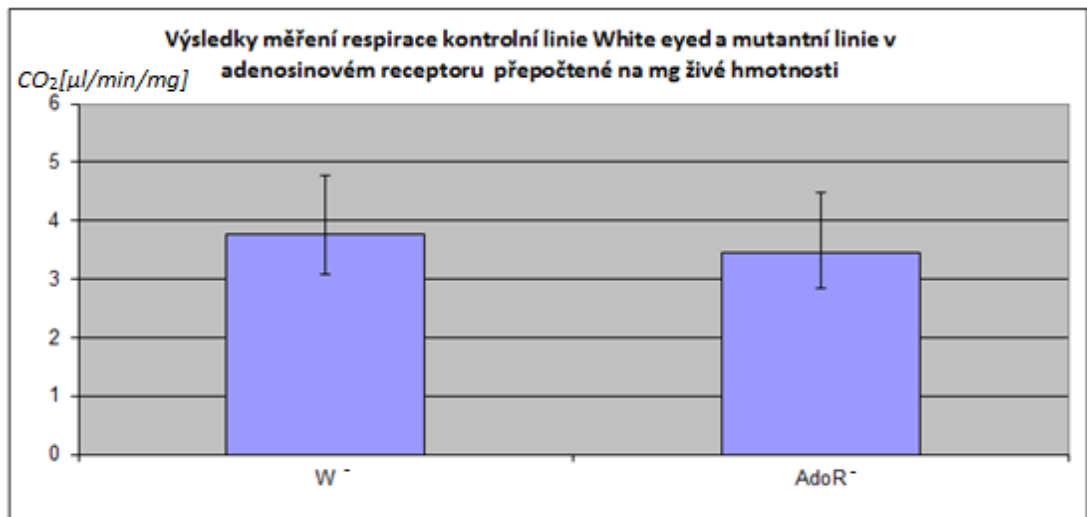
4.1.2. Hodnoty respirace – pokusy prováděné na čtyřech jedincích v komůrce

Měření byla prováděna na čtyřech jedincích v jedné komůrce o velikosti 14,5 ml. Průtok stlačeného vzduchu byl vyšší než u předchozího pokusu a to 80 ml/min. Ostatní podmínky pro tento výzkum byly stejné jako u měření vydýchaného oxidu uhličitého s jednotlivcem. Při těchto pokusech byla zohledňována hmotnost. Z naměřených hodnot lze zjistit množství vydýchaného oxidu uhličitého na mg živé hmotnosti. Průměrná hodnota CO₂ vyprodukovaného kontrolní linií White eyed (w⁻) byla 2,667 μl/min/jedna muška (byla změřena směrodatná odchylka ve velikosti 0,695). Na rozdíl od kontrolní linie byla u mutantní linie AdoR⁻ zjištěna průměrná hodnota vydýchaného CO₂ 2,347 μl/min/jedna muška (se směrodatnou odchylkou 0,610; zobrazeno v grafu č. 2). Hodnota t-testu byla 0,159, z čehož vyplývá, že měření není statisticky prokazatelné.



Graf č. 2 – Porovnání výsledků mezi kontrolní linií White eyed (w^+) a mutantní linií AdoR⁻. Na ose y je znázorněno množství vydýchaného oxidu uhličitého v $\mu\text{l}/\text{min}$. Rozdíl mezi těmito liniemi je sice větší než při předchozím měření, ale rozdíly stále nejsou prokazatelné dle t -testu. V grafu je zobrazena směrodatná odchylka, která znázorňuje odchylky hodnot měření od střední hodnoty.

Vzhledem k tomu, že byla u těchto měření zohledňována hmotnost byl proveden převod množství vyprodukovaného oxidu uhličitého na jednu mušku ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{jedna muška}$) na objem vydýchaného oxidu uhličitého na mg hmotnosti ($\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$). Po zohlednění hmotnosti bylo zjištěno, že průměrná hodnota CO₂ u kontrolní linie White eyed byla 3,761 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ (se směrodatnou odchylkou 1,017). U linie s mutací na adenosinovém receptoru byl zjištěna průměrná hodnota vyprodukovaného oxidu uhličitého 3,448 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{mg}$ (se směrodatnou odchylkou 1,028; zobrazeno v grafu č. 3).



Graf č. 3 – Výsledky měření respirace White eyed a AdoR⁻. Na ose y je znázorněno množství vydýchaného oxidu uhličitého v μl/min/mg. V grafu je zobrazena směrodatná odchylka, která znázorňuje odchylky hodnot měření od střední hodnoty.

4.1.3. Srovnání hodnot respirace u jednotlivých liniích

Rozdíly měření dle t-testu nebyly prokazatelné. Hodnota množství vydýchaného oxidu uhličitého zjištěna při pokusech, kdy byl v komůrce umístěn jeden samec, tak hodnota vyprodukovaného oxidu uhličitého, která byla zjištěna při pokusech, kdy byly v komůrce umístěny čtyři samci byly srovnatelné. Z těchto výsledků vyplývá, že tyto genetické linie nemají mezi sebou statisticky významný rozdíl v produkci oxidu uhličitého.

4.2. Optimalizace měření

V prvních osmi pokusech měření respirace oxidu uhličitého do každé komůrky byl umístěn jeden samec. Background v prázdné komůrce byl při některých pokusech vyšší a mohlo dojít, zřejmě vlivem nepatrné netěsnosti komůrek či hadiček k interferenci s hodnotou vydýchaného CO₂. Z toho důvodu byl použit v druhé sérii pokusů vyšší počet zkoumaných objektů v jedné komůrce - v experimentu byli využíváni čtyři jedinci v každé komůrce, díky čemuž se snížilo ovlivnění výsledků množstvím oxidu uhličitého v prázdných komůrkách.

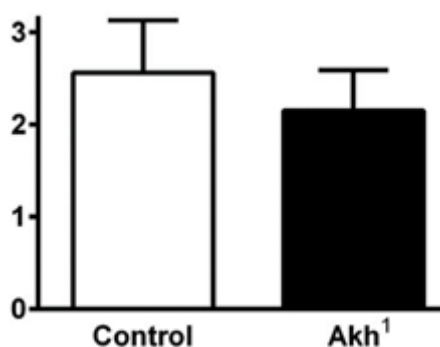
5. Diskuse

Poruchy metabolismu často postihují lidské zdraví. Z toho důvodu pochopení mechanismů regulující metabolismus je zásadním vědeckým úkolem. U octomilky byly nalezeny geny, které se nacházejí i u člověka. Mutací těchto genů u člověka dochází ke vzniku některých lidských onemocnění, proto je octomilka důležitým genetickým materiálem, u něhož mohou být zkoumány důsledky mutací na homolozích (genech podobných vlastností).

Octomilka obecná usnadňuje genetické zkoumání příčin nemocí a umožňuje tak hledání terapeutických možností, které mohou ovlivňovat metabolismus. Pro takovýto screening je nutný jednoduchý způsob jak pozorovat změny v metabolickém stavu mušek.

Produkce oxidu uhličitého je dobrým ukazatelem energetického výdeje, který poskytuje informace o stavu metabolismu. Jedním z těchto ukazatelů je produkce oxidu uhličitého, jejíž měření u mušek může pomoci při identifikaci genetických poruch ovlivňující metabolismus (Yatsenko a kol., 2014).

V práci Sajwan et al. (2015) byla použita stejná metodika měření produkce oxidu uhličitého, kterou jsme použili i při měření vydýchaného oxidu uhličitého u octomilky. Byly zde porovnávány kontroly (divoká linie) s mutanty v adipokinetickém hormonu (Akh^1). Zde se použitou metodou podařilo prokázat, že mutant má významně nižší produkci oxidu uhličitého než kontrolní linie (viz graf č. 4).



Graf č. 4 – Porovnání kontrolní linie (Control) s mutantní linií v adipokinetickém hormonu (Akh^1): Na ose y je zobrazeno množství vyprodukovaného oxidu uhličitého za jednotku času

na mg hmotnosti ($\mu\text{l/h/mg}$). U mutantní linie se množství výrazně snížilo oproti kontrolní linii. (Sajwan et al., 2015).

Hodnota množství vydýchaného oxidu uhličitého zjištěna při pokusech s mutanty v adenosinovém receptoru (AdoR^-) byla srovnatelná s množstvím oxidu uhličitého vyprodukovaného kontrolními skupinami CantonS a White eyed. Z výsledků vyplývá, že tyto genetické linie nemají mezi sebou statisticky významný rozdíl v produkci oxidu uhličitého.

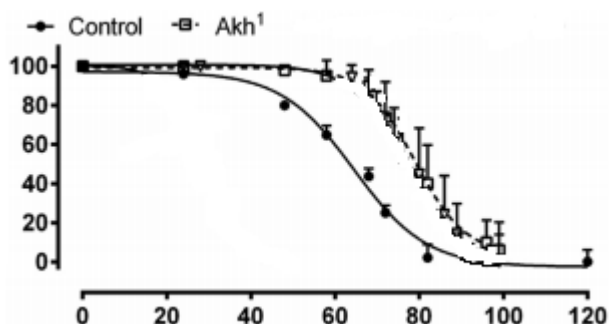
Mutanti v adenosinovém receptoru (AdoR^-) mají zřejmě ještě jiné mechanismy jak kompenzovat svoji ztrátu receptoru na cytoplasmatické membráně buněk, např. ekvilibrační a koncentrační transportéry (popsány v kapitole 2.1.3. Regulace hladiny adenosinu). Dalším faktorem toho, že množství oxidu uhličitého je u měřených mušek srovnatelné může být to, že existují jen velmi malé rozdíly v energetickém výdeji mezi jednotlivými liniemi.

Rozdílné výsledky mezi hodnotami naměřenými při pokusech s jedním samcem v komůrce a pokusech, kdy byli v komůrce umístěny čtyři samci, mohou být způsobeny mnoha faktory. Měření respirace s jednou muškou v jedné komůrce bylo prováděno v komůrkách o menším objemu (8 ml), než měření respirace u čtveřice samců (objem komůrky byl 14, 5 ml). Dalším faktorem, jenž mohl ovlivnit výsledky, by mohlo být to, že při měření respirace u více samců byl nastaven vyšší průtok kyslíku komůrkami než při pokusech s jedním jedincem.

Pro prokázání důsledků poškození adenosinového receptoru se využívají další fyziologické metody např. zjišťování chladové odolnosti jedinců. Měření probíhá u vybraných mutantů octomilky. Při tomto výzkumu jsou mušky ve zkumavkách (tzv. vialkách) vkládány do teploty $-20\text{ }^\circ\text{C}$ na dobu 15 minut. V časových intervalech po vyjmutí se zjišťuje úmrtnost za jednotku času. Tímto pokusem se zjišťuje, do jaké míry stres způsobil rychlejší úmrtí.

Vliv poškozeného AdoR by mohl být prokázán pomocí sledování úmrtnosti během hladovění u vybraných linií octomilky. Toto sledování probíhá v následujících krocích: Zkoumaní samci jsou po dvaceti kusech vkládáni do zkumavek bez potravy, ve kterých je pouze 0,5 % agaróza, která zabraňuje vyschnutí, čímž se zamezí ovlivnění úmrtnosti

dehydratací. Poté se sleduje a porovnává rychlost vymírání mezi jednotlivými mutantními liniemi (zobrazeno v grafu č. 5). Tato metoda byla použita v práci o mutantní linii Akh¹ (Sajwan S. et al., 2015; zobrazeno v grafu č. 5).



Graf č. 5 – Ukázkový graf hladovění u vybraných mutantů – zkoumána úmrtnost za jednotku času (Sajwan S. et al., 2015). Na ose y je zobrazena procentuální úmrtnost, na ose x je zanesen čas v hodinách.

Tyto i další fyziologické metody by mohly dále poodhalit, jak důležitý je AdoR a adenosin pro správné fungování buněk i celého organismu.

6. Závěr

6.1. Produkce oxidu uhličitého u vybraných linií octomilky obecné

Jedním z cílů této práce bylo porovnat intenzitu respirace mezi jednotlivými liniemi octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*). Porovnávání probíhalo na třech liniích. Využity byly dvě kontrolní linie CantonS a bělooká linie White eyed (w^-), které byly jednotlivě porovnávány s linií mušek, které měly mutaci v genu kódujícímu adenosinový receptor ($AdoR^-$). Předpokládaná hypotéza, že mutanti budou mít nižší produkci CO_2 nebyla potvrzena. Bylo zjištěno, že rozdíl mezi porovnávanými liniemi CantonS a $AdoR^-$ není statisticky prokazatelný. Stejně tak i mezi liniemi w^- a $AdoR^-$ nebyl prokázán statisticky významný rozdíl.

Dalším cílem práce bylo zoptimalizovat postup při měření respirace, aby nedocházelo k nepřesnostem zjištěných výsledků. Během výzkumu bylo zjištěno, že dochází k ovlivnění výsledků vlivem rozdílného množství CO_2 v prázdných komůrkách (tzv. backgroundem). Pro zkvalitnění výzkumu byl tedy zvýšen počet měřených jedinců na čtyři samce v komůrce, změněna velikost komůrek a dvojnásobně zvýšen průtok stlačeného kyslíku.

6.2. Využití studované problematiky ve výuce přírodopisu

Octomilka není jen důležitým materiálem pro genetické zkoumání, ale také je názorným zástupcem řádu Dvoukřídých ve výuce. Na těle octomilky jsou dobře viditelné znaky, kterými jsou Dvoukřídí dobře odlišitelní od ostatního hmyzu. Významným rozdílem Dvoukřídých od ostatního hmyzu je přítomnost tzv. halter (popsáno v kapitole č. 2.2.1. Zařazení a vzhled).

Názorným modelem ve výuce je tato muška proto, že je u ní dobře znatelný sexuální dimorfismus. Žáci si sami mohou pod mikroskopem prohlédnout odlišnosti samce a samice.

Při výuce změn genetické informace mohou být využity vytvořené mutantní linie, které se projevují změnou vnějších znaků (tzv. fenotypu). U octomilky se nachází velké množství mutantů s geneticky změněnými vnějšími znaky. Tyto mutace jsou cíleně vytvářeny proto, aby jednotlivé linie byly od sebe dobře odlišitelné. Výše

zmíněné mutace se týkají změny např. barvy očí, tvaru křídel a dalších. Tyto znaky se dají dobře demonstrovat při vyučování přírodopisu na základních školách.

Mušky představují levný biologický materiál pro experimentální přístup ve výuce. Je možné mušky anestetizovat éterem, oddělit jednotlivá pohlaví a pozorovat různé znaky pod mikroskopem. Je možné zakládat křížení, sledovat dědičnost a projevy různých znaků včetně reakce různých mutantních linií na různé podněty. Je možné rovněž získat ze slinných žláz obří polytenní chromozomy.

Díky zkušenostem s nastudovanou metodikou by si žáci během výkladu mohli vytvořit celistvý obraz o tom, jak probíhá měření respirace. Tím by bylo docíleno vyššího zájmu žáků, protože při výuce by nebyla využívána pouze teorie ale také praktické znalosti.

7. Seznam literatury

Barsotti C. and Ipata P.L., (2004): Metabolic regulation of ATP breakdown and of adenosine production in rat brain extracts.

Beaven M. A., Ramkumar V. and Ali H., (1994): Adenosine A₃ receptors in mast cells, *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 13 – 14

Burnstock G., (2006): Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacological Reviews* 58(1): 58-86.

Dal Ben D., Lambertucci C., Taffi S., Vttori S., Vlpiny R., Klotz K. N. and Cristalli G., (2006): Molecular modelin study of 2-phenylethynyladenosine derivatives as highly selective A₃ adenosine receptor ligands. *Purinergic Signalling* 2, 589 - 594

Doleželová E., Nothacker H. P., Civelli O., Bryant P. J., Žurovec M., (2007): *Drosophila* adenosine receptor activates cAMP and calcium signaling. *Insect Biochem. Mol.Biol.* 37(4), 318-29.

Doleželová E., (2004): Adenosine deaminases and adenosine receptor in *Drosophila melanogaster*. Ph.D. Thesis, Faculty of Biological Sciences, University of South Bohemia

Drury A. N. & Szent-Györgyi A., (1929): The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 68: 213–237.

Eule E., Tix S. and Fischbach K.-F., (1995): Glial cells in the optic lobe of *Drosophila melanogaster*

Fredholm B.B., Arslan G., Halldner L., Kull B., Schulte G. and Wasserman W., (2000): Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 362: 364–374.

Fredholm B.B., Irenius E., Kull B. and Schulte G., (2001): Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells. *Biochem. Pharmacol.* 61, 443–448.

Griffiths, M., Beaumont N., Yao S. Y., Sundaram M., Boumah C. E., Davies A., Kwong F. Y., Coe I., Cass C. E., Young J. D., Baldwin S. A., (1997): Cloning of a human nucleoside transporter implicated in the cellular uptake of adenosine and chemotherapeutic drugs. *Nat Med.* 3: 89-93.

Chyb S. and Gomppel N., (2013): Atlas of Drosophila Morphology, 221 s.

Chen, (2006): Activation of adenosine A3 receptors reduces chemically induced brain injury in rodents - — Journal of Neuroscience Research - Wiley

Illes P., Klotz K.N. and Lohse M.J., (2000): Signalling by extracellular nucleotides and nucleosides. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 362: 295–298

Jacobson K. A. and Gao Z. G., (2006): Adenosine receptors as therapeutic targets. 247 - 264 s.

*Jacobson K. A., (2001): Allosteric modulation of A₃ adenosine receptors by a series of 3-(2-pyridinyl) isoquinoline derivatives. *Molecular Pharmacology* 60: 1057-1063.*

Jasič J. a kol., (1997): Entomologický slovník - 680 s.

Kodrík D., (2004): Fyziologie hmyzu učební texty, České Budějovice

Lane-Petter W., (1969): Laboratorní zvířata - 468 s., Praha

*Latini S. and Pedata F., (2001): Adenosine in the central nervous system: release mechanisms and extracellular concentrations. *Neurochem.**

Lighton J., (2008): Measuring Metabolic Rates

Nehling A., (2004): Coffee, Tea, Chocolate and the Brain.

Raven P. H. , Brooks J. G. , (1999): Biology; 1284 s.

*Sajwan S. et al., (2015): Targeted mutagenesis and functional analysis of adipokinetic hormone-encoding gene in Drosophila, *Insect Biochemistry and Molecular Biology**

Speight Martin, Mark R., Hunter D., Allan D. Watt, (2008): Ecology of insects

*Steinbauerová V., (2005): Mechanismus toxického účinku adenosinu na buňky imaginálních terčků *D. melanogaster*.*

*Tichý V., (2007): Charakterizace signální dráhy adenosinu v buňkách imaginálních terčků *Drosophila melanogaster*.*

Vyskot B., (1999): Přehled vývojové biologie a genetiky

Watson James D., Van Muijlwijk-Koezen Z. G., Chen J. E., Muller A., Ijzerman C. E., (1982): Molekulární biologie genu

*Yatsenko A. S., Marrone A. K., Kucherenko M. M., & Shcherbata H. R., (2014): Measurement of metabolic rate in Drosophila using respirometry. *Journal of Visualized Experiments**

Zhang Y., Handy D. E., Loscalzo J., (2005): Adenosine-dependent induction of glutathione peroxidase 1 in human primary endothelial cells and protection against oxidative stress. Circ Res. 96: 831-837.

Zuberová 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. Dis. Model. Mech. 3, 773 - 784.