

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

**Imunohistochemická lokalizace adipokinetického hormonu a  
jeho receptoru v centrální nervové soustavě larvy a  
dospělce bource morušového (*Bombyx mori*)**

Diplomová práce

**Bc. Štěpánka Tomková**

Školitel: Mgr. Hana Schadová, Ph.D.

Konzultant: prof. RNDr. Michal Žurovec, CSc.

České Budějovice 2019

Tomková, Š., 2019: Imunohistochemická lokalizace adipokinetického hormonu a jeho receptoru v centrální nervové soustavě larvy a dospělé bource morušového (*Bombyx mori*). [Immunohistochemical localization of adipokinetic hormone and its receptor in larval and adult central nervous system in silkworm. Mgr. Thesis in Czech] – 77 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, The Czech Republic.

Annotation:

Adipokinetic hormones (AKHs) and their receptors (AKH-Rs) are involved in the control of the physiological functions in insect such as regulation of metabolic response to stress conditions and mobilization of energy stores. Bommo-AKH (AKH2) and *Bombyx* AKH-R in silkworm *Bombyx mori* were localized by immunohistochemical methods in the central nervous system (CNS) of larvae and adults. Both the hormone and the receptor immunoreactivity were found in the *corpora cardiaca* and in two neurons within each brain hemisphere, one located in the dorsolateral protocerebrum and the second one in the ventrolateral deutocerebrum. The later contains both the hormone and the receptor immunoreactivity. Furthermore, the receptor immunoreactivity was detected in two paired neurons located in the subesophageal ganglion. In larvae, a bilateral pair of longitudinal nerves extending from the brain to the ventral nerve cord was detected. Colocalization of the hormone and receptor immunoreactivity suggests a possible autoregulatory function.

Prohlášení:

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

V Českých Budějovicích dne 17. dubna 2019

.....

Štěpánka Tomková

## Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala své školitelce paní Mgr. Haně Sehadové, Ph.D. za odborné vedení, ochotu a entuziasmus po celou dobu mé magisterské práce. Nemalé díky patří i školitelovi – specialistovi panu prof. RNDr. Michalovi Žurovcovi, CSc. za poskytnutou odbornou literaturu a osobní konzultace. Za maximální podporu vděčím všem pracovníkům Střediska mikroskopie a histologie Entomologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích, a to jmenovitě panu prof. RNDr. Ivo Šaumanovi, Ph.D., panu Ing. Romanovi Neužilovi, paní Jitce Pflegerové, paní doc. PaedDR. Radce Závodské, Ph.D. a našim dvěma studentkám Ing. Markétě Vrchotové a Lucii Pauchové. Díky značné podpoře mé nejbližší rodiny a přátel jsem mohla svědomitě pracovat na předkládané práci. Ráda bych vyjádřila podstatný vděk své mamince, bratrovi Lukášovi a tátovi za mnohaletou psychickou a finanční podporu. V neposlední řadě bych ráda poděkovala svému příteli Mgr. Tomášovi Bílému za věcné rady ke grafické úpravě celé práce. Jsem velmi vděčná, že jsem se v rámci projektu Erasmus+ mohla během magisterského studia zúčastnit pracovní stáže v laboratoři Neurogenetiky a Chronobiologie pana prof. Rodolfo Costa na Univerzitě v Padově v Itálii pod odborným vedením paní Gabrielly Margherity Mazzotta, Ph.D.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	Adipokinetické hormony hmyzu .....	1
1.2	Fyziologická funkce AKH.....	1
1.3	Receptory adipokinetických hormonů .....	3
1.4	Adipokinetické hormony a jejich receptory u bource morušového.....	6
<b>2</b>	<b>CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>10</b>
3.1	Laboratorní zvířata .....	10
3.2	Použité protilátky .....	10
3.2.1	<i>Primární protilátky</i> .....	10
3.2.2	<i>Sekundární protilátky</i> .....	11
3.3	Imunohistochemie na totálních preparátech .....	11
3.3.1	<i>Odběr a fixace tkání</i> .....	11
3.3.2	<i>Imunohistochemická lokalizace proteinů</i> .....	11
3.4	Imunohistochemie na paraplastových řezech .....	12
3.4.1	<i>Odběr a fixace tkání</i> .....	12
3.4.2	<i>Imunohistochemická lokalizace proteinů</i> .....	13
3.4.3	<i>Kolokalizační reakce</i> .....	13
3.5	Fotodokumentace a analýza získaného obrazu .....	14
3.6	Příprava použitých roztoků .....	15
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY</b> .....	<b>16</b>
4.1	Imunohistochemická lokalizace Bommo-AKH v hlavovém gangliu larvy .....	18
4.2	Imunohistochemická lokalizace Bommo-AKH v hlavovém gangliu dospělce.....	21
4.3	Imunohistochemická lokalizace <i>Bombyx</i> AKH-R v CNS larvy <i>B. mori</i> .....	23
4.4	Imunohistochemická lokalizace <i>Bombyx</i> AKH-R v hlavovém gangliu dospělce .....	27
4.5	Kolokalizaci imunoreaktivity <i>Bombyx</i> AKH-R a Bommo-AKH v hlavovém gangliu larvy <i>B. mori</i> .....	29
<b>5</b>	<b>DISKUZE</b> .....	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>36</b>

<b>8</b>	<b>PŘÍLOHA</b>	<b>47</b>
8.1	Introduction	48
8.2	Methods	51
8.2.1	<i>Construct creation for the genes hCRY2 and hMUPP1</i>	51
8.2.1.1	Design primers for hCRY2 and hMUPP1 in silico	51
8.2.1.2	Polymerase chain reaction (PCR): hCRY2, hMUPP1	53
8.2.1.3	Gel electrophoresis	54
8.2.1.4	DNA purification from the agarose gel	55
8.2.1.5	DNA concentration measurement in NanoDrop	55
8.2.1.6	Cloning of hCRY2 and hMUPP1 into pAc 5.1/V5-His A vector	56
8.2.1.7	Transformation of competent cells	57
8.2.1.8	Isolation of minipreps	57
8.2.1.9	Sequencing of pAc 5.1/V5-His A hCRY2 and pAc 5.1/V5-His A hMUPP1 plasmids	58
8.2.1.10	Isolation of midipreps	59
8.2.2	<i>Transfection of S2R+ Drosophila embryonic cells with pAc 5.1/V5-His A hCRY2 and pAc 5.1/V5-His A hMUPP1</i>	60
8.2.3	<i>Calmodulin pulldown assay</i>	60
8.2.4	<i>Western Blot</i>	62
8.3	Results	64
8.3.1	<i>PCR of hCRY2 and hMUPP1, gel electrophoresis</i>	64
8.3.2	<i>DNA purification from the agarose gel, DNA concentration measurement in NanoDrop</i>	64
8.3.3	<i>In-Fusion cloning of hCRY2 and hMUPP1 to pAc 5.1/V5-His A vector, minipreps and sequencing, midipreps</i>	65
8.3.4	<i>Transfection of pAc 5.1/V5-His A hCRY2 and pAc 5.1/V5-His A hMUPP1 into S2R+ Drosophila embryonic cells</i>	65
8.3.5	<i>Calmodulin pulldown assay and western blot</i>	66
8.4	Discussion	68
8.5	References	69

# 1 Úvod

## 1.1 Adipokinetické hormony hmyzu

Adipokinetické hormony (AKH) jsou jedny z nejlépe studovaných neurohormonů hmyzu. Rodina těchto hormonů zahrnuje přes 30 členů, které jsou identifikovány u více než 70 druhů hmyzu (Gäde et al., 1996 and 1997; Schoofs et al., 1997; Stone et al. 1976; Scarborough et al. 1984; Schaffer et al., 1990; Kodrík et al., 2000; Köllish et al., 2000; Siegert et al., 2000; Lorenz et al., 2001). Jsou to malé neuropeptidy obsahující 8-10 aminokyselinových zbytků. Uplatňují se především v řízení homeostázy hmyzu, tím že kontrolují metabolismus cukrů a tuků a mají řadu dalších pleiotropických účinků (Gade a Goldsworthy, 2003; Gade et al., 1997; Kodrík et al., 2008; Krishnan a Kodrík, 2012). AKH byl poprvé izolován z neurohemálního orgánu *corpora cardiaca* sarančete stěhovavého, *Locusta migratoria* (Stone et al., 1976). Jeho homology byly dále nalezeny a charakterizovány u druhů patřících do řádů Phasmida (strašilky), Blattaria (švábi) a Lepidoptera (motýli) (Orchard et al., 1987; Gäde et al., 1990).

Orthology AKH hormonů byly objeveny u korýšů a obratlovců. AKH hmyzu jsou strukturně blíže příbuzné hormonu nacházejícímu se v chromatoforech korýšů (tzv. red-pigment-concentrating hormone). Působením tohoto hormonu lze vyvolat mobilizaci lipidů u hmyzu. (Stone et al., 1976; Fernlund et al., 1972; Mordue et al., 1977). Za evolučně nejbližší peptidy nalezené u obratlovců jsou považovány tzv. uvolňovače gonadotropního hormonu (gonadotropin-releasing hormone) (Lindemans et al., 2011). Z funkčního hlediska se však hmyzí AKH spíše podobají savčímu glukagonu, peptidickému hormonu produkovaném  $\alpha$ -ostrůvky slinivky břišní. Hlavní funkcí glukagonu je mobilizace energetických zásob, především glukózy, čímž se podílí na kontrole hladiny cukrů za stresových podmínek (Jones et al., 2012). Kontrola hladiny cukrů v hemolymfě hmyzu je méně přesná než u savců, proto je hmyz schopen tolerovat značné výkyvy v koncentracích těchto metabolitů (Chapman et al., 1998). Přítomnost endogenních peptidů podobných glukagonu byla imunologicky prokázána i u některých druhů hmyzu (Alquicer et al., 2009; Kramer et al., 1980).

## 1.2 Fyziologická funkce AKH

Obecně lze účinky AKH rozdělit do tří hlavních kategorií: (1) Metabolické funkce, například mobilizace cukrů a lipidů a ovlivnění syntézy prolinu. (2) Ostatní biochemické

funkce jako je inhibice tvorby lipidů, proteinů a RNA, a dále aktivace antioxidačních obranných mechanismů (3) Fyziologické funkce, kam patří stimulace srdečního tepu, zvýšení svalového tonu a lokomoce, posílení imunitní odpovědi, stimulace trávicích procesů a inhibice dozrávání vajíček.

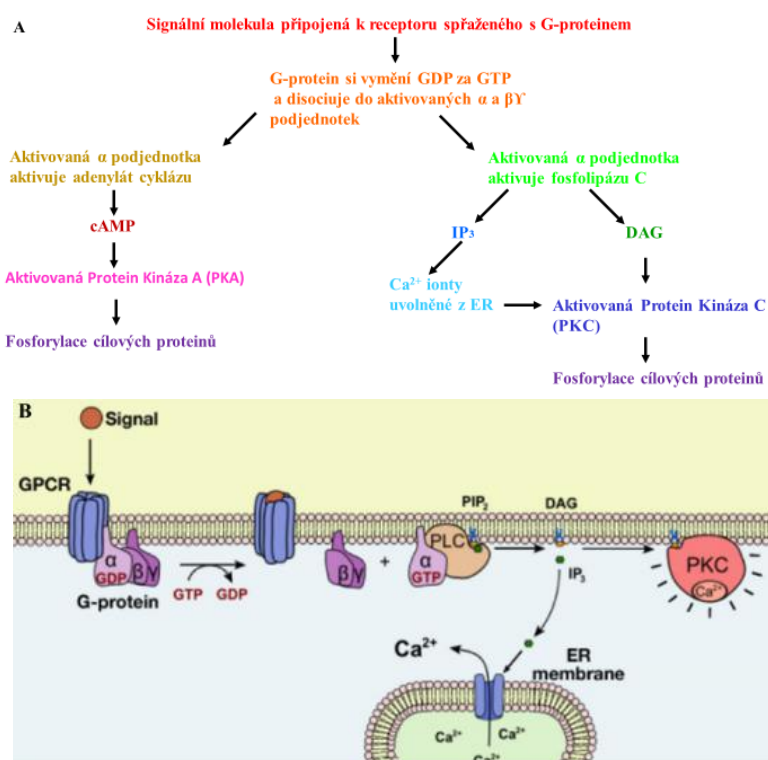
AKH je důležitým regulátorem metabolické homeostázy u hmyzu (Sajwan et al., 2015). Udržení stálého vnitřního prostředí je hlavní funkcí neuroendokrinního systému a umožňuje organismům adaptovat se na změny, jak vnějšího prostředí (vliv teploty, toxinů, zranění), tak vnitřního prostředí (vysoká fyzická aktivita, zranění, nemoc nebo malnutrice) (Storey et al., 2004). Zvířata vystavená různým nepříznivým vlivům jsou chráněna stresovou odpovědí, která zahrnuje potlačení funkce trávicí soustavy a reprodukce, zvýšení tepové frekvence a výměny dýchacích plynů, mobilizaci energetických zásob s cílem dodání kyslíku a živin do tělních částí podléhajících stresu. Zatímco u hmyzu je humorální odpověď na stresové podmínky zastoupena převážně adipokinetickými hormony, u savců je kontrolována přes hypothallicko-hypofyzárně-nadledvinkovou dráhu, za účasti celé řady specifických hormonů (Gade a Goldsworthy et al., 2003; Kodrík, 2008).

Stimulační účinek AKH na celkový metabolismus byl zaznamenán u ruměnice pospolné *Pyrrhocoris apterus*, kdy došlo ke zvýšení pohybové aktivity po injekčním podání hormonu, ale účinky hormonu na produkci CO<sub>2</sub> byly nízké (Kodrík et al., 2002, 2010; Velki et al., 2011). Silné působení AKH na produkci CO<sub>2</sub>, ukazatele metabolické aktivity, se projevilo pouze v přítomnosti stresorů jako jsou insekticidy – pemethrin, malathion nebo endosulfan (Kodrík et al., 2010; Velki et al., 2011).

Vlivem stresu vyvolaného vnějšími podmínkami je kontrola hladiny cukrů a lipidových zásob daleko komplexnější. Studium na octomilce *Drosophila melanogaster* ukazuje, že stresující podmínky v podobě hladovění nebo ischemie zvyšují hladinu extracelulárního adenosinu (Berne a Rubio, 1974; Masino a Dunwiddie, 1999; Rubio et al., 1975), která snižuje zásoby glykogenu a triglyceridů v tukovém tělese, a naopak zvyšuje hladinu glukózy v hemolymfě (Doležal et al., 2003). Avšak za normálních podmínek je hladina extracelulárního adenosinu striktně kontrolována adenosin deaminázou a nukleosidovými transportéry (Doležalová et al., 2005; Knight et al., 2010).

### 1.3 Receptory adipokinetických hormonů

Fyziologická funkce AKH je řízena přes receptory adipokinetických hormonů (AKH-R), které patří do rodiny receptorů spřažených s G proteinem (GPCRs). Aktivaci těchto receptorů jsou spuštěny dvě signální dráhy vedoucí k fosforylaci proteinů (Vroemen et al., 1995; Vroemen et al., 1998; Huang et al., 2010). Jednou dráhou je aktivována adenylát cykláza, což vyvolá zvýšení koncentrace cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP), který aktivuje protein kinázu A (PKA, Obr. 1 A). Druhá dráha zahrnuje aktivaci fosfolipázy C, která rozkládá fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP<sub>2</sub>) na inositoltrifosfát (IP<sub>3</sub>) a diacylglycerol (DAG). Zatímco IP<sub>3</sub> působí na uvolnění Ca<sup>2+</sup> iontů z endoplazmatického retikula, DAG za spoluúčasti Ca<sup>2+</sup> iontů aktivuje fosfokinázu C (PKC, Obr. 1 A, B).



**Obr. 1:** Signalizace přes receptory spřažené s G-proteinem. **A** Navázání AKH na receptor vyvolá aktivaci dvou signálních drah. Signální molekula se naváže na extracelulární doménu receptoru spřaženého s připojícím proteinem Guanin nukleotid (G-protein). Příslušný receptor podléhá konformační změně s následnou interakcí s G-proteinem. G-protein se skládá ze tří podjednotek  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ , přičemž v neaktivním stavu  $\alpha$  podjednotka má připojenou GDP molekulu. Prostřednictvím Hydrolyzy GTP molekuly na GDP dochází k aktivaci  $\alpha$  podjednotky G-proteinu s již připojenou molekulou GTP a

k uvolnění spojených podjednotek  $\beta$  a  $\gamma$  (aktivovaný stav). Aktivovaná  $\alpha$  podjednotka G-proteinu spouští následující dráhy: (1) Aktivace adenylát cyklázy vede ke zvýšení intracelulárního cAMP, který se připojuje k protein kináze A (PKA). Uvolněním katalytických podjednotek z PKA je umožněna fosforylace cílového proteinu. (2) Aktivace fosfolipázy C mění fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP<sub>2</sub>) na inositol trifosfát (IP<sub>3</sub>). IP<sub>3</sub> difunduje k membráně endoplazmatického retikula, kde se připojuje k Ca<sup>2+</sup> iontovému kanálu s následným uvolněním Ca<sup>2+</sup> iontů do cytoplasmy. Zvýšená koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů v cytosolu spolu s diacylglycerolem (DAG) v plazmatické membráně aktivuje protein kinázu C (PKC), která fosforyluje cílové proteiny. **B** Schématické znázornění signální dráhy vedoucí k aktivaci PKC.

V neposlední řadě bylo prokázáno, že AKH receptory se rychle vážou po stimulaci navázaným ligandem, a to v závislosti na množství a čase přes protein klathrin.

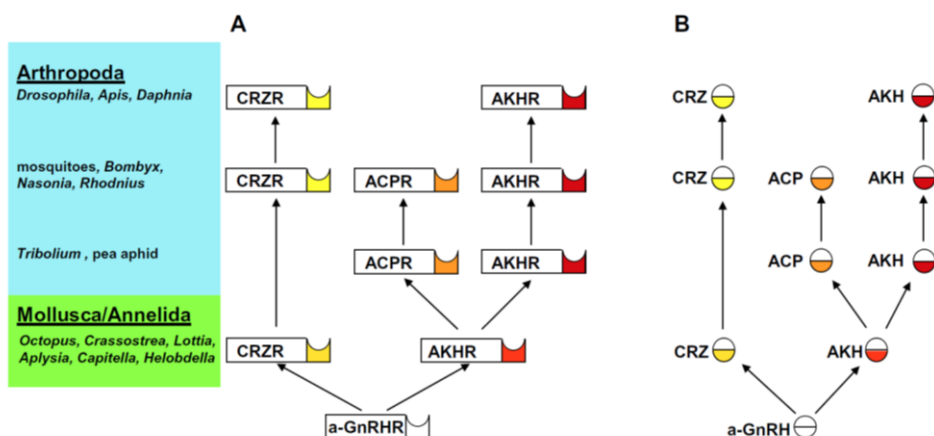


Klathrin je schopen vytvořit plášť pro vznik váčků na povrchu buněčných membrán, kde nastává receptorem zprostředkovaná endocytóza. Následně dochází k postupnému návratu receptoru do původního stavu po odstranění příslušného AKH ligandu (Huang et al., 2010).

Poprvé byl AKH-R identifikován u *D. melanogaster* a *Bombyx mori* (Staubli et al., 2002). Kandidátem na AKH-R u *D. melanogaster* byl receptor strukturně podobný receptorům gonadotropin stimulačním hormonům obratlovců (GnHR), který je exprimován zejména ve třetím larválním instaru (Hauser et al., 1998). Pro prokázání afinity přírodního AKH ligandu k tomuto receptoru byl v buněčných kulturách nesoucích receptor exprimován aequorin. Tento enzym katalyzuje přeměnu přidaného coelenteracinu na coelenteramid za současné produkce bioluminiscenčního záření. Tato bioluminiscenční reakce probíhá pouze v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, tj. v případě aktivace receptorů AKH ligandem. Množství vyzářené bioluminiscence pak odráží míru aktivace receptorů. (Schaffer et al., 1990; Noyes et al. 1995). Také syntetický Drm-AKH exprimovaný v transformovaných buňkách vykazoval totožnou bioluminiscenční odpověď jako přírodní ligand (Staubli et al., 2001).

Studium specifity ligandu AKH-R, tj. důležitosti jednotlivých aminokyselinových zbytků v oktapeptidu pro AKH-R signalizaci, ukázalo, že pro aktivaci receptoru jsou rozhodující aminokyseliny na pozicích 2, 3, 4 a 5 (Park et al., 2002; Staubli et al., 2002; Caers et al., 2012). Drm-AKH-R jsou lokalizované v plasmatické membráně adipocytů tukového tělesa (Caers et al., 2012) a využívají G-proteinovou  $\alpha_q$  podjednotku ( $\text{G}\alpha_q$ ) k uvolnění  $\text{Ca}^{2+}$  iontů jako druhých posílů (Baumbach et al., 2014). S identifikací AKH receptorů u dalších hmyzích druhů (Hansen et al., 2006; Belmont et al., 2006) se ukázalo, že hmyzí AKH receptory jsou strukturně a evolučně příbuzné se známými savčími receptory (Hansen a Grimmelikhuijzen, 2014). V publikaci Hansen a Grimmelikhuijzen, 2014 bylo sledováno evoluční propojení mezi GnRH receptory pocházejících z obratlovců a receptory pro AKH, peptidy podobnými AKH/corazoninu (ACP) a corazoninu z členovců (Arthropoda). Bylo odvozeno, že tyto receptory spřážené s G-proteinem jsou blízce příbuzné a mají stejný evoluční původ s datací před 700 miliony lety. Ve fylogenetické větvi Prvoústých byl odhalen ancestrální gen pro receptor podobný GnRH-R, který byl duplikován, podobně jako geny kódující ligandy podobné corazoninu, a dále podstoupil diverzifikaci vedoucí ke genu kódujícímu AKH receptor, tedy genu podobnému corazoninovému ligandu, genům pro AKH receptor a ligand podobný AKH

u Měkkýšů (Molusca) a Kroužkoců (Annelida). Následně AKH receptor a ligandy genů byly znovu duplikovány do podoby genů, které známe u dnešních členoců, kde existují tři nezávislé hormonální systémy signalizující dráhy pro AKH, ACP a corazonin. Vytvořený model evoluce GnRH signalizace u Prvoústých je výrazným příkladem koevoluce receptoru-ligandu (Hansen et al., 2014; Obr. 2).



**Obr. 2:** Navržená evoluce a koevoluce AKH/corazonin/ACP/GnRH receptorů (A) a jejich ligandů (B) u Prvoústých (Protostomia). CRZR = corazoninový receptor nebo receptory podobné corazoninovým receptorům; ACP = adipokinetický hormon a corazonin příbuzný peptid; ACPR = ACP receptory; AKHR = AKH receptory; a-GnRHR = ancestrální GnRH receptor; a-GnRH = ancestrální GnRH. Schéma navrhuje, že receptory podobné ancestrální GnRH a jejich ligandy byly přítomné během rané evoluce Prvoústých (vyznačeno na spodní straně schématu). Geny těchto molekul byly duplikovány ještě před objevením Měkkýšů (Molusca) a Kroužkoců (Annelida), následně divergovaly do receptorů podobných CRZR, receptorů podobných AKHR, corazoninu a ligandů podobných AKH. U měkkýšů a Ecdysozoa (monofyletická skupina živočišných prvoústých kmenů), se ligandy podobné AKH vyvinuly jako kanonické AKH spolu s jejich pravými receptory AKH. Hormonální systém AKH se ještě jednou duplikoval před objevením Členoců (Arthropoda), což vedlo k AKH a ACP liní, zatímco corazoninový systém dále nediverzifikoval. U některých druhů členoců byl, jak corazonin, tak ACP signální systém během vývoje zcela eliminován (Hansen et al., 2014).

Existuje domněnka (Staubli et al., 2001), že evoluce receptorů spřažených s G-proteinem je spojena se záměnou jejich ligandů u různých skupin zvířat. K podobné situaci dochází u hmyzích receptorů pro allatostatiny, které jsou strukturně jasně spojené se somatostatinovými, galaninovými a opioidními receptory savců (Birgüil et al., 1999; Lenz et al., 2000 a 2001; Auerswald et al., 2001; Secher et al. 2001). Opačným příkladem je rodina receptorů oxytocin/vasopresinu, u které ligandy zůstávají během evoluce téměř neměnné a jejich zahrnutí do různých aspektů reprodukčního procesu je v průběhu evoluce zachováno (Van Kesteren et al., 1995 a 1996, Gimpl et al., 2001).

Jelikož u některých zástupců hmyzu bylo identifikováno dva a více různých druhů AKH (Gäde et al., 1997; Schoofs et al., 1997; Gäde et al., 1997; Scarborough et al., 1984;

Siegert et al., 2000), předpokládá se i zde přítomnost dvou a více různých AKH receptorů. U *D. melanogaster* jsou známy aminokyselinové sekvence dvou AKH receptorů Drm-AKH receptor-1 (CG11325; [www.flybase.org](http://www.flybase.org)) a receptor spřažený s G proteinem (CG10698; [www.flybase.org](http://www.flybase.org)) (Hewes et al., 2001).

#### 1.4 Adipokinetické hormony a jejich receptory u bource morušového

Byly klonovány tři odlišné cDNA kódující prekursory adipokinetických hormonů u *B. mori* tzv. prepro-AKH1-3 (Roller et al., 2008) a jejich proteinové produkty byly analyzovány hmotnostní spektrometrií (Gäde et al., 2008). Manse-AKH (AKH1) je identický s nonapeptidem nalezeným u můry *Manduca sexta*, čeleď Noctuidae (Ishibashi et al., 1992). Zatímco Bommo-AKH (AKH2) je blízce příbuzný s několika dalšími deka-peptidy adipokinetických a hypertrehalosemických hormonů (AKH/HrTH). Oba typy hormonů jsou produkovány neurohemálními orgány, *corpora cardiaca*. Naproti tomu AKH3 je syntetizován v mozku (Roller et al., 2008; Gäde et al., 2008). Jedná se o deka-peptid, jehož sekvence nevykazuje homologii se sekvencemi AKH řádu Lepidoptera (Roller et al., 2008; Gäde et al., 2008) (Obr. 3).

Primary structure of adipokinetic hormone peptides from *Bombyx mori*.

Adipokinetic peptides	Sequence
Adipokinetic hormone 1 (AKH1)	pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr- <del>Ser</del> - <del>Ser</del> -Trp-GlyNH <sub>2</sub>
Adipokinetic hormone 2 (AKH2)	pGlu-Leu-Thr-Phe-Thr- <del>Pro</del> - <del>Gly</del> -Trp-Gly-GlnNH <sub>2</sub>
Adipokinetic hormone 3 (AKH3)	pGlu- <del>Ile</del> -Thr-Phe- <del>Ser</del> - <del>Arg</del> - <del>Asp</del> -Trp- <del>Ser</del> -GlyNH <sub>2</sub>

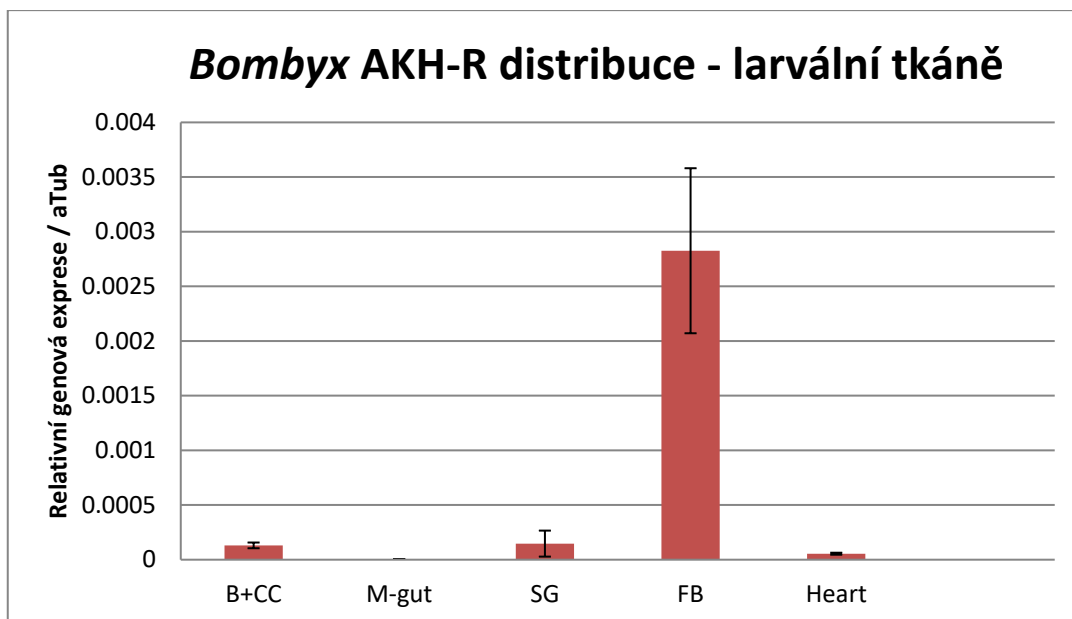
**Obr. 3:** Aminokyselinová sekvence adipokinetických hormonů u bource morušového. Manse-AKH (označen jako AKH1) je nonapeptid lišící se v pozici 6 a 7 aminokyselinou serin oproti Bommo-AKH deka-peptidu (označeno jako AKH2), kdy v pozici 6 a 7 se nachází aminokyseliny prolin a glycin. AKH3 se vyznačuje výrazně odlišnou primární strukturou aminokyselin se změnami v pozici 2 (izoleucin), 5 (serin), 6 (arginin), 7 (kyselina asparagová) a 8 (serin) (Zhu et al., 2009).

Bourčí AKH receptor (*Bombyx* AKH-R) byl identifikován na základě podobnosti s Drm-AKH-R1, jehož aminokyselinová sekvence vykazuje 48 % identitu (68 % identitu v konzervovaných oblastech) s *Bombyx* AKH-R (Obr. 5). Aminokyselinové sekvence obou receptorů obsahují dvě glykosylační místa ve stejných pozicích (Staubli et al., 2002). *Bombyx*-AKH-R syntetizovaný v expresních buňkách byl aktivován již nízkou koncentrací hypertrehalosemického hormonu z můry *Helicoverpa zea* (Hez-HrTH), který je podobný AKH. Hormon shodný s HrTH zatím nebyl z bource izolován (Jaffe et al., 1988), ale byl izolován jemu příbuzný Bommo-AKH. Manse-AKH, Drm-AKH a *Schistocerca gregaria* AKH-II aktivuje

*Bombyx* AKH-R, ale s nižší afinitou než Hez-HrTH (Staubli et al., 2002). *Bombyx* AKH-R reaguje s vysokou afinitou, jak s typem Bommo AKH, tak i s jinými typy AKH vyskytujícími se u čeledi Noctuidae (můrovití). Drozofilí ortholog (Drm-AKH-R) k *Bombyx* AKH-R může být také aktivován jak Manse-AKH, tak i peptidy podobnými AKH jako je právě Hez-HrTH (Staubli et al., 2002). Přestože fylogenetická analýza předpokládá, že hmyzí receptor corazonin, kardioaktivní peptid, a AKH receptory pochází zřejmě ze stejného ancestrálního receptoru (Yamanaka et al., 2008; Kaufmann et al., 2009). *Bombyx* AKH-R není stimulován corazoninem, a zrovna tak corazoninový receptor *B. mori* příbuzný k *Bombyx* AKH-R není aktivován ani jedním z ligandů AKH1-3 vyskytujících se u bource morušového (Hansen et. al, 2010).

AKH3 byl stanoven jako specifický ligand pro další dva AKH receptory spřažené s G-proteiny pojmenované jako AKHR2<sub>a</sub> a AKHR2<sub>b</sub>. Kvantitativní RT-PCR analýzou byla studována genová exprese těchto receptorů. Testes vykazovaly vysokou expresi AKHR2<sub>a</sub>, a naopak jeho nízká exprese byla detekována v mozku, epidermis, snovacích žlázách, ováriích, střevě a tukovém tělese. Naproti tomu exprese AKHR2<sub>b</sub> převažovala v mozku a ováriích (Shi et al., 2011).

Kvantitativní RT - PCR odhalila signifikantní expresi bourčího AKH-R v tukovém tělese. Dále byla zaznamenána nižší hladina bourčího AKH-R transkriptu ve slinných žlázách a v mozku s přilehlými *corpora cardiaca*. Zanedbatelná exprese příslušného receptoru byla pozorovaná v srdeční tkáni a žádná ve středním střevě (Obr. 4, Žurovec nepublikovaná data). Rozdílná exprese jednotlivých receptorů *Bombyx* AKH-R, AKH-R2<sub>a</sub> a AKH-R2<sub>b</sub> svědčí o jejich odlišné fyziologické funkci. V předkládané práci je lokalizována přesná poloha bourčího AKH-R imunoreaktivních neuronů v centrálním nervovém systému (CNS) larev a dospělců *B. mori*. Za použití protilátky proti Bommo-AKH byla rovněž analyzována pozice neuronů syntetizující příslušný hormon a byla identifikována jejich poloha vzhledem k *Bombyx* AKH-R imunoreaktivním buňkám.



**Obr. 4:** Genová exprese *Bombyx* AKH-R v mozkové tkáni a *corpora cardiaca* (B+CC), střevě (M-gut), slinných žlázách (SG), tukovém tělese (FB) a srdci (Heart) u testovaných larev (Žurovec, nepublikovaná data).

## 2 Cíle práce

Hlavním cílem mé magisterské práce byla lokalizace adipokinetického hormonu a jeho receptoru u larev a dospělců bource morušového, *B. mori*, pomocí imunohistochemických technik aplikovaných, jak na totální preparáty, tak na paraplustové řezy.

Předpokladem k úspěšnému dosažení stanoveného cíle bylo zvládnutí několika dílčích úkolů:

- 1) Samostatnou práci s fluorescenčním mikroskopem značky Axioplan 2 (Zeiss) a konfokálním mikroskopem FluoView™ 1000 (Olympus).
- 2) Detailní seznámení se s anomií centrálního nervového systému (CNS) u larev a dospělců hmyzu.
- 3) Analýzu získané fotodokumentace z konfokální mikroskopie pomocí programu Imaris verze 6.3.1 (Bitplane) a Adobe Photoshop (Adobe Systems).

Během magisterského studia jsem se zúčastnila dvouměsíční pracovní stáže v rámci projektu Erasmus+. Navštívila jsem laboratoř Neurobiologie a Chronobiologie na Univerzitě v Padově, v Itálii vedenou prof. Rodolfo Costoa s cílem osvojit si další metody molekulární biologie. Pod odborným vedením paní Gabrielly Margherity Mazzotta, Ph.D. jsem se zdokonalila v přípravě genetických rekombinantních vektorů, jejich transfekci do embryonálních buněk *Drosophila melanogaster*, v Calmodulinové pulldown assay a Western blotové analýze. Zpráva z této stáže je přiložena v příloze.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Laboratorní zvířata

Larvy 5. instaru a dospělí jedinci polyvoltinní linie N4 bource morušového, *B. mori* byly použity pro imunohistochemické (ICC) experimenty s příslušnými proteiny. Larvy byly chovány v nízké hustotě na umělé stravě (Nihon Nosanko, Yokohama, Japonsko) nebo na morušových listech v inkubátoru s konstantní teplotou 25 °C, vzdušnou vlhkostí v rozmezí 50-70 % a fotoperiodou 12 h světlo/12 h tma.

### 3.2 Použité protilátky

#### 3.2.1 Primární protilátky

K detekci Manse-AKH (AKH1), Bommo-AKH (AKH2), *Bombyx* AKH-R byly použity králičí polyklonální protilátky komerčně připravené čtyřmi imunizacemi syntetického peptidu Manse-AKH (KLH-CELTFTSSWGNH<sub>2</sub>), Bommo-AKH (pELTFTPGWGQC-KLH) a *Bombyx* AKH-R (DIDEKVSGPGGC-KLH, Obr. 5) firmou Moravian Biotechnology Ltd a firmou BACHEM pro Manse-AKH. Stejný antigen byl injekčně podán vždy dvěma donorovým zvířatům. Firmou byla zaslána i preimunní séra, tj. séra zvířat odebrána těsně před imunizací antigenem, která byla použita k ověření specifity detekovaného signálu. Před použitím protilátek k imunohistochemickým analýzám, byla jejich specifita testována metodou Elisa (Kodřík, nepublikovaná data). Primární protilátky i preimunní séra byly ředěny 1:100 v blokovacím médiu pro ICC prováděnou na totálních preparátech a 1:200 pro ICC prováděnou na paraplástových řezech.

MDIDEKVSGP GGASQKNWSH LLHVNNTYDE LPLEMRFNYS HMVSMTVYSV LMVISATGNL  
TVLYQLVRRR RAKRASRLDI LLMHLAVADL MVTFLMMPLE IAWAGTVQWF  
AGDLMCRVMM FTRTFGLYLS SFVLICIAVD RYYAILKPLN VTWEATVRRRA IIVAWVCAGL  
ASLPQSFIFH VEEHPEVKGY NQCVSYGSLP TEKHEFAYFL VNMILMYVIP LVSTLYCSCA  
ALFEIIRAN TANDKMRRSG IGLLGRARAR TLKMTVTIVL VFFTCWSPYY CYCLWYWIDK  
ESIKNLDPAL QKAMWLFSCCT NSCANPIVYG VFNRNRWNWR AGKFQNGRCR SGSGRKGSRL  
PHGESTEISA ATLSRARHSN GSDHNGRRDS SYANQNGPQK HWNTINNNHV TNGMV

**Obr. 5:** Aminokyselinová sekvence *Bombyx* AKH-R. Receptor se skládá z 405 aminokyselin. Žlutě je vyznačena aminokyselinová sekvence, která byla použita jako antigen pro produkci specifické protilátky.

### 3.2.2 Sekundární protilátky

K vizualizaci navázaných primárních protilátek byly použity fluorescenčně značené kozí sekundární protilátky firmy Life Technologies, a to Goat anti-rabbit IgG značena fluorophorem Alexa Fluor 488, Goat anti-rabbit IgG značena fluorophorem Alexa Fluor 594 nebo Goat anti-rabbit IgG značena fluorophorem Alexa Fluor 647. Protilátky byly použity naředěné 1:200 pro ICC na totálních preparátech a 1:500 pro ICC na paraplastových řezech.

## 3.3 Imunohistochemie na totálních preparátech

### 3.3.1 Odběr a fixace tkání

Larvy a dospělci bource morušového byly anestetizovány vodou nebo CO<sub>2</sub> a jejich mozky s připojeným esophageálním gangliem, frontálním gangliem, *corpora cardiaca* a *corpora allata*, ventrální nervová páska larev, vzorky tukového tělesa, střeva a pohlavních orgánů dospělců byly vypreparovány ve sterilním 0,01 M fosfátovém pufru (PB, pH 7,4). Tkáně byly ihned fixovány 4 % paraformaldehydem v PB. Fixace probíhala 2 h při pokojové teplotě. Následně byly tkáně promyty 4x po 15 min v PB a mozková tkáň byla po dobu 1 h inkubována s kolagenázou (0,5 mg/ml PB), která naruší mozkovou neurilemu a umožní tak lepší proniknutí protilátek do tkáně. Po ošetření kolagenázou byly vzorky CNS dále dehydratovány a opětně rehydratovány metanolovou řadou (50 %, 70 %, 100 % každý na 15 min, 70 % a 50 % každý na 10 min). Poté byly promyty 4x po 15 min v PB s 0,5 % Triton X-100 (PB-T) a použity pro imunohistochemickou detekci studovaných proteinů.

### 3.3.2 Imunohistochemická lokalizace proteinů

Nafixované tkáně promyté v PB-T byly 2 h inkubovány s 5 % normálním kozím sérem (NGS) v PB-T (blokovací médium), který ve tkáních vysytí nespecifická vazebná místa. Následná inkubace s primárními protilátkami ředěnými v poměru 1:100 v blokovacím médiu probíhala 3-4 dny ve 4°C. U kontrolních preparátů byla primární protilátka nahrazena preimunním sérem. Poté byly tkáně promyty 4x 15 min v PB-T a inkubovány se sekundární protilátkou ředěnou 1:200 v blokovacím médiu po dobu 1-2 dnů ve 4°C. Po aplikaci sekundární protilátky byly vzorky chráněny před působením intenzivního světla, aby se zabránilo fotovysvícení fluorescenčních značek. Po opětovném promytí vzorků 4x 15 min v PB-T a 15 min v PB byly tkáně přeneseny



na podložní sklíčka do jamek vytvořených z několika na sebe navrstvených podpůrných kroužků a zality do uzavíracího média (Vectashield, Vector Laboratories). Podpůrné kroužky brání rozmačkání tkáně po přiložení krycího skla. Zhotovené preparáty byly skladovány ve tmě ve 4 °C až do pořízení fotodokumentace.

### 3.4 Imunohistochemie na paraplastových řezech

#### 3.4.1 Odběr a fixace tkání

Hlavy anestetizovaných larev a dospělců byly odděleny a umístěny do 0,01M fosfátového pufru (PBS, pH 7,4), kde z nich bylo odpreparováno ústní ústrojí. Z těl ponořených do PBS byly odebrány vzorky tukového tělesa, svalové tkáně, střeva a u dospělců i pohlavní orgány. Dále byly tkáně fixované přes noc ve 4 °C v Bouin-Hollande-sublimát (BHS) fixáži. Fixáž byla z tkání důkladně vymyta 70 % etanolem, ten byl několikrát vyměněn a vzorky byly promývány v 96 % a 100 % etanolu vždy 2x po 20 min a prosyceny 100 % chloroformem 2x po 20 min. Z chloroformu byly tkáně přeneseny přímo do předem roztaveného paraplastu nalitého v plastových mističkách a umístěny do vákuové pícky (WTC, Binder, Germany), kde byly ponechány přes noc v 58 °C pod vakuem 200 mbar. Následující den byly tkáně naorientovány na dně mističky (vzhledem k rovině řezu) a vzorky ponechány alespoň 2 h při pokojové teplotě, aby došlo k postupné polymerizaci paraplastu. Na mikrotomu (RM 2235, Leica) byly zhotoveny paraplastové řezy o tloušťce 7 μm a přeneseny do kapky destilované vody na podložní sklíčko potažené vrtvou přílnavého materiálu (Menzel-Gläser Superfrost, Thermo Scientific), která brání odpadnutí řezů během následující procedury. Podložní sklo s řezy bylo přeneseno na elektrickou ploténku zahřátou na 42-45 °C. V tomto rozsahu teplot dochází důkladnému natažení řezů na hladině vody. Po roztažení řezů a odstranění přebytečné vody byly řezy sušeny na vyhřáté elektrické ploténce (42-45 °C) po dobu minimálně 48 h. Zhotovené preparáty byly odparafinovány a rehydratovány sestupnou alkoholovou řadou, a to promytím v xylenu 2x 10 min a v 96 % a 70 % etanolu vždy po 5 min. Následně byly preparáty opláchnuty destilovanou vodou po dobu 5 min. Použitím BHS fixáže byly do tkáně vneseny těžké kovy (rtuť). K jejich odstranění byly řezy ponořeny na 3 min do Lugolova roztoku. Jód z Lugolova roztoku byl posléze vymyt 7,5 % thiosíranem sodným po dobu 5 min. Po opláchnutí destilovanou vodou 1x 10 min byly preparáty promyty

v PBS s 0,3 % Tween 20 (PBS-Tw) 1x 10 min a následně použity k imunolokalizaci zkoumaných proteinů.

### 3.4.2 Imunohistochemická lokalizace proteinů

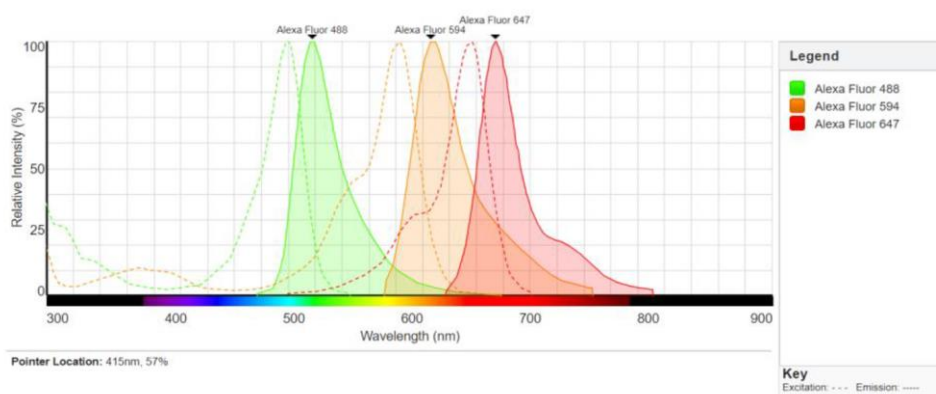
U odparafinovaných a zavodněných tkáňových řezů byla nespecifická vazebná místa vysycena 5 % NGS v PB-Tw (blokovacím médiu) po dobu 30 min při pokojové teplotě. Následně byly preparáty inkubovány s primární protilátkou ředěnou 1:200 v blokovacím médiu přes noc ve 4 °C. V kontrolních experimentech byla primární protilátka nahrazena preimunním sérem. Blokovací médium i protilátka byly aplikovány přímo na jednotlivé preparáty a jejich rovnoměrná distribuce byla zajištěna překrytím polyethylenovou fólií. Kvůli zabránění vyschnutí preparátů, byly vzorky umístěny v boxu, ve kterém byla udržována vlhkost 50 – 70 %. Po odmytí nenavázané primární protilátky 3x 10 min v PBS-Tw následovala inkubace s fluorescenčně značenou sekundární protilátkou ředěnou 1:500 v blokovacím médiu nejméně 1,5 h při pokojové teplotě. Preparáty byly následně promyty v PBS-Tw 3x 10 min a následovala jejich dehydratace vzestupnou alkoholovou řadou (70 %, 96 % a 100 % ethanol, každý aplikován na 2 min) a promytí xylenem 2x 10 min. Trvalé preparáty byly zhotoveny zalitím do média (DPX, Fluka) a skladovány v temnu ve 4°C.

### 3.4.3 Kolokalizační reakce

Jelikož byly obě primární protilátky získány ze stejného druhu donorového zvířete, musely být na zkoumanou tkáň aplikovány a vizualizovány postupně. Na paraplustové řezy byly tedy nanášeny dvě dvojice primárních a sekundárních protilátek. Po aplikaci první primární protilátky v kombinaci s kozí sekundární protilátkou namířenou proti králičímu IgG a značenou Alexa Fluor 488, byly vzorky promyty 3x 10 min v PBS-Tw a destilovanou vodou. Poté byla použita druhá kombinace primární a sekundární protilátky, kde kozí sekundární protilátka namířená proti králičímu IgG byla značena Alexa Fluor 647. Pro vyloučení případné krosreaktivní sekundární protilátky aplikované v druhém setu, byl počet imunoreaktivních buněk značených jednotlivými sety protilátek přepočítán.

### 3.5 Fotodokumentace a analýza získaného obrazu

Obrazová dokumentace pozitivního signálu byla pořízena konfokálním mikroskopem FluoView™ FV 1000, kterým byly zhotoveny série snímků s různým proostřením v ose Z s rozlišení 1024 x 1024 pixelů. Naskenovaná velkoformátová obrazová data ve formátu oib (Olympus Image Binary) byla zrekonstruována do 3D obrazu v programu Imaris verze 6.3.1 (Bitplane) a složený obraz převeden do formátu tif (Tag Image File format). K jednotlivým surovým (raw) snímkům byl v programu Imaris přiřazen barevný filtr odpovídající vlnové délce emisního spektra fluoforu kovalentně připojeného k sekundární protilátce, a to Alexa 488, 594 nebo 647 (Obr. 6). Snímky byly rovněž opatřeny měřítkem.



**Obr. 6:** Fluorophory použité ke značení sekundárních protilátek. Profil excitačního spektra (přerušovaná čára), profil emisního spektra (plná čára). Absorpční a emisní spektra jednotlivých fluoroforů se překrývají. Barevné vlastnosti fluoroforů závisí na vlnové délce emitovaného (vyzářeného) světla.

V programu Adobe Photoshop (Adobe Systems) byly získané obrazy ve formátu tif uspořádány na plato o rozměrech 18 x 27 cm a rozlišení 300 pixelů/palec, v barevném režimu RGB s bílým pozadím a 8 bitovém formátu. 3D rekonstrukce z parafinových řezů byly získány proložením snímků po sobě jdoucích řezů. U kolokalizačních experimentů byly v jednom obrazu proloženy snímky jednotlivých spektrálních barev. Poté byla provedena cílená úprava jednotlivých obrazů zahrnující korekci sytosti (saturaci) barvy, jasů a kontrastu, zaostření (poloměr 1 pixel, míra cca 70 % - záleží na ostrosti obrazu). Upravené fotografie byly opatřeny měřítky, šipkami a písmennými popiskami. Finální fotografie byly ukládány ve formátech psd (Photoshop Document), tif a jpeg (Joint photographic Experts Group – standartní metoda ztrátové komprese u digitálních fotografií).

### 3.6 Příprava použitých roztoků

#### **Bouin-Hollande-sublimát (BHS)**

2,5 g	octanu měďnatého ( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ )
100 ml	nasyčené kyseliny pikrové ( $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$ )
10 ml	formaldehydu ( $\text{CH}_2\text{O}$ )

Před použitím smícháme BHS roztok s nasyceným roztokem chloridu rtuťnatého ( $\text{HgCl}_2$ ) v poměru 10:1.

#### **10x Fosfátový pufr (PB), 1M, pH 7,4**

Přípravit: 1M roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (roztok 1)  
1M roztoku  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  (roztok 2)

Zásobní 1M roztok PB byl připraven postupným přiléváním cca 100 ml roztoku 2 do 400 ml roztoku 1 k ustálení pH na hodnotě 7,4. Pracovní roztok PB byl 0,1M.

#### **Fyziologický roztok pufrovaný fosfáty (PBS) 1 M, pH 7,4**

12,2 g	hydrogen fosforečnanu sodného ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 8,55 mM)
1,7 g	dihydrogen fosforečnanu sodného ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 1,45 mM)
85 g	chloridu sodného ( $\text{NaCl}$ ; 145 mM)
5 g	azidu sodného ( $\text{NaN}_3$ )
1 l	destilované vody ( $\text{dH}_2\text{O}$ )

Pracovní roztok PBS pufru je 0,1 M s pH 7,4.

#### **Lugolův roztok**

5 g	$\text{I}_2$
10 g	jodidu draselného (KI)
500 ml	destilované vody ( $\text{dH}_2\text{O}$ )

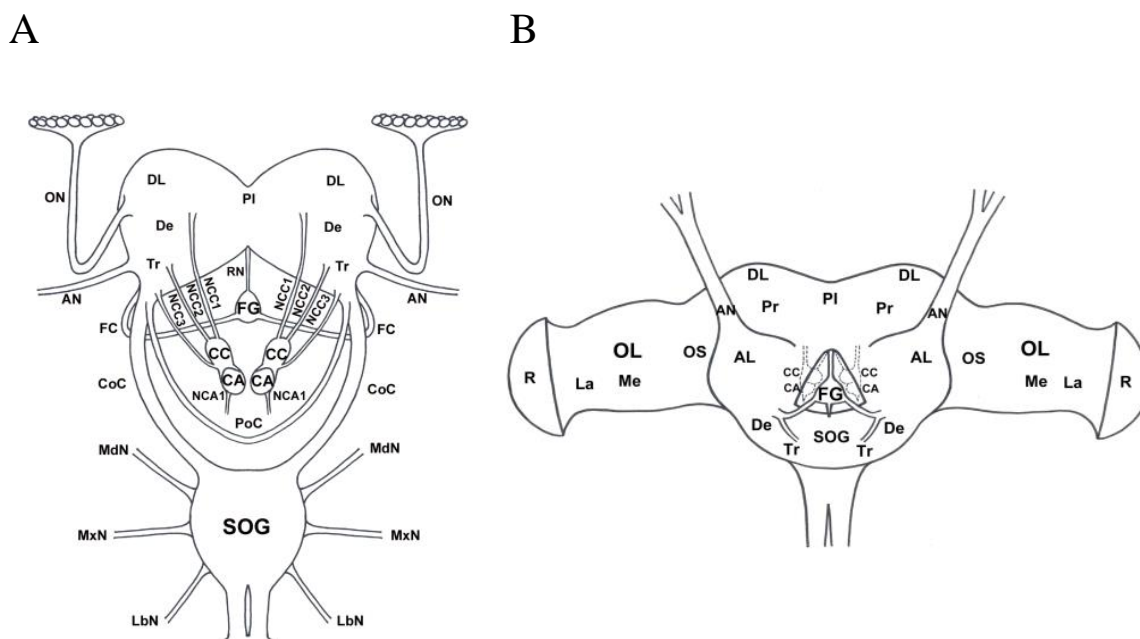
## 4 Výsledky

K lokalizaci Bommo-AKH, Manse-AKH a *Bombyx* AKH-R u bource morušového *B. mori* jsem použila primární protilátky namířené proti celému syntetickému Bommo-AKH a Manse-AKH, a proti 12 aminokyselinovému peptidu na N konci *Bombyx* AKH-R (Obr. 3). Jednotlivé antigeny byly injekčně podány dvěma donorovým zvířatům (králíkům). Získané duplicitní protilátky jsem poté imunohistochemicky otestovala na vybraných tkáních bource morušového a pro finální experimenty zvolila takové, které vykazovaly silný pozitivní signál. Nejprve jsem všechny primární protilátky testovala na totálních preparátech tkání. Studium imunoreaktivity na totálních preparátech totiž poskytuje mnohem komplexnější informaci o lokalizaci peptidů či proteinů a za souběžného testování více antigenů umožňuje přesně specifikovat jejich vzájemnou polohu. V případě, že protilátky obtížně pronikaly do tkáně, ať již z důvodu jejich terciální struktury nebo velikosti tkáně, přistoupila jsem k imunodetekci na parafinových řezech. Spolu s primárními protilátkami jsem při každém experimentu souběžně používala i příslušná preimunní séra, která sloužila jako negativní kontrola pro ověření specificity signálu.

Všechny primární protilátky jsem testovala na totálních preparátech hlavového ganglia, ventrální nervové pásky, pohlavních orgánů, vzorků tukového tělesa, svalové tkáně a střeva, přičemž ventrální nervová páska byla testována jen u larev, a naopak ovaria a testes jen u dospělců. Vzhledem k tomu, že v totálních preparátech ostatních tkání jsem nedetekovala signál (data nejsou ukázána), přistoupila jsem ke zpracování tkání na parafinové řezy. Imunodetekce se všemi použitými protilátkami odhalila reaktivitu na řezech z CNS larev i dospělců. Na řezech ostatních tkání jsem nezaznamenala pozitivní signál (data nejsou ukázána). Aplikace preimunního séra místo příslušné primární protilátky mi pomohla stanovit, který z detekovaných signálů je specifický pro daný antigen. Všechny neurony značené protilátkou Manse-AKH v mozku larvy a dospělé byly identické s těmi značenými preimunním sérem. Pomocí této protilátky tedy nebyl zaznamenán žádný specifický signál a v dalších experimentech jsem upustila od jejího použití.

Na základě výsledků předběžných testů jsem dále prováděla imunodetekci pomocí protilátek proti Bommo-AKH a *Bombyx* AKH-R pouze na vzorcích CNS, kde jsem důkladně analyzovala získaný pozitivní signál. Pro každý experiment

jsem použila nejméně 7 jedinců, ze kterých jsem vypreparovala mozky s připojeným esophageálním gangliem, frontálním gangliem, *corpora cardiaca* a *corpora allata* a u larev též ventrální nervovou pásku. Pro posouzení pozice značených neuronů jsem se musela dokonale seznámit s anatómií celé CNS larev i dospělců hmyzu a jednotlivé části hlavového ganglia jsem zakreslila do předem připravených schémat znázorňujících uspořádání hlavového ganglia u larev a dospělců *B. mori* (Obr. 7).



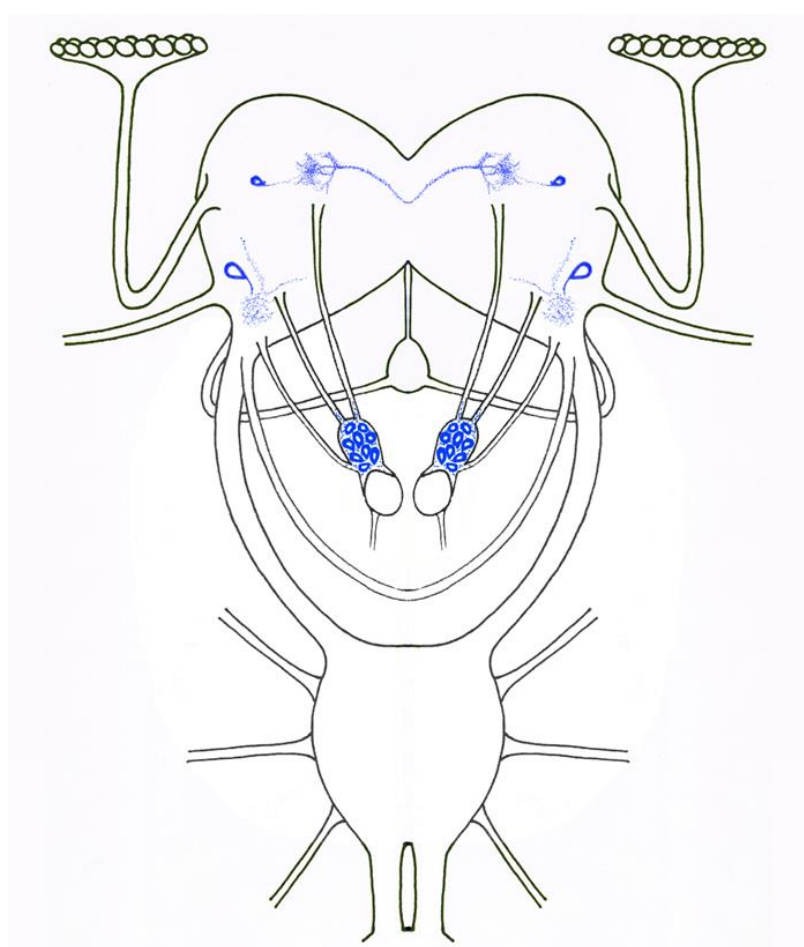
**Obr. 7.:** Anatomické schéma nervové soustavy larvy (A) a dospělce (B) bource morušového. AL, antenální lalok; AN, antenální nerv; CA, *corpora allata*; CC, *corpora cardiaca*; CoC, „kruhovitá jícnová“ konektiva (*circumesophageal connective*); De, deutocerebrum; DL; dorzolaterální oblast protocerebra; FC, frontální komisura; FG, frontální ganglium; La, lamina; LbN, labiální nerv; MdN, mandibulární nerv; Me, medulla; MxN, maxilární nerv; NCA1, svazek nervů *corpora allata* 1; NCC 1-3, svazek nervů *corpora cardiaca* 1-3; OL, optický lalok; ON, optický nerv; OS, optický stvol; PoC, postesofageální komisura; PI, *pars intercerebralis*; Pr, protocerebrum; R, retina; RN, rekurentní nerv; SOG, subesofageální ganglium; Tr, tritocerebrum.

K předběžnému vyhodnocení pozitivních signálů jsem používala fluorescenční mikroskop značky Zeiss Axioplan 2. Zatímco ke zhotovení výsledné fotodokumentace jsem použila konfokální mikroskop FluoView™ 1000. Finální fotodokumentací z totálních preparátů byly 3D snímky složené ze série řezů s různým proostřením v ose Z. Naopak snímky paraplastových řezů jsem skládala z fotografií několika po sobě jdoucích řezů. Trojrozměrné projekce konfokálních snímků jsem zhotovila v programu Imaris

verze 6.3.1 (Bitplane) a následně jsem snímky zkompletovala a dopravila do výsledné publikační podoby v Adobe Photoshop (Adobe Systems).

#### 4.1 Imunohistochemická lokalizace Bommo-AKH v hlavovém gangliu larvy

Protilátku proti Bommo-AKH jsem použila k identifikaci neuronů syntetizujících AKH. Pozitivní signál jsem zaznamenala u dvojice bilaterálních neuronů, jejichž axony se bohatě větví v centrálním mozku (Obr. 8, Obr. 9). Vzhledem k nízké intenzitě signálu v totálních preparátech, jsem imunodetekci provedla i na paraplastových řezech.



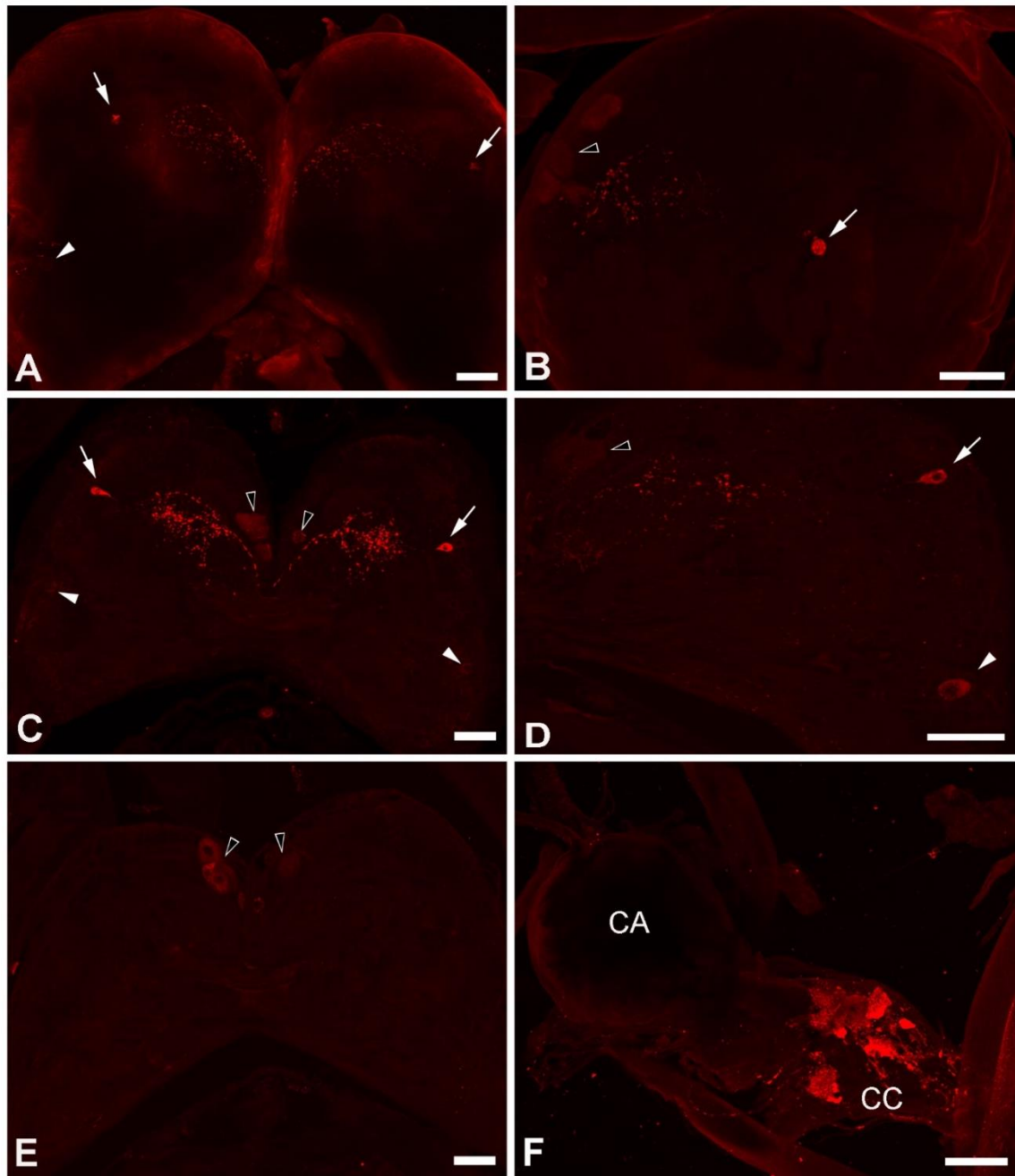
**Obr. 8:** Schématické znázornění Bommo AKH imunoreaktivity v hlavovém gangliu larvy *B. mori*.

Menší z dvojice neuronů se nachází na dorzolaterální straně protocerebra (Obr. 9 A-D) a větší neuron leží frontoventrálně v oblasti laterálního deutocerebra (Obr. 9 C-D). Axony dorzolaterálně položených neuronů tvoří vláknitě síť v rámci protocerebra, ze kterých se formuje svazek nervových vláken propojující kolaterální

mozkové hemisféry (Obr. 9C). Výrazné imunoreaktivní buňky jsem detekovala v neurohemálním orgánu, *corpora cardiaca* (Obr. 9F).

V mediálním protocerebru v tzv. *pars intercerbralis* jsem zaznamenala skupinu asi osmi velkých slabě značených buněk (černé šipky v Obr. 9 B, C, D). Vzhledem k tomu, že tyto buňky byly značeny i preimunním sérem (Obr. 9E) se jedná o signál, který neodráží přítomnost hledaného antigenu.

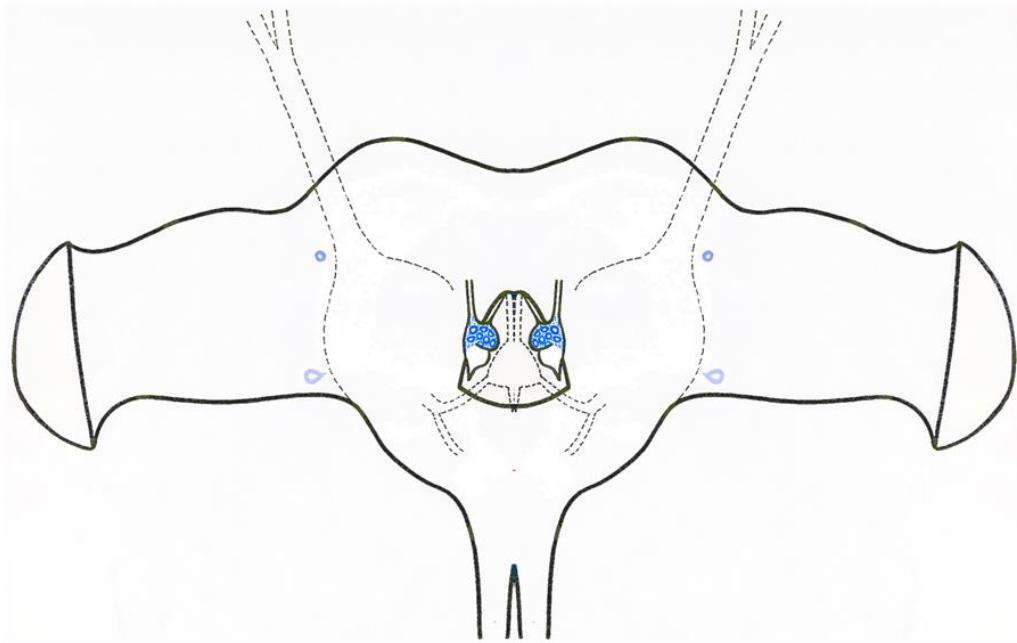




**Obr. 9:** Bommo-AKH imunoreaktivní buňky a jejich axonální dráhy v hlavovém gangliu larvy *B. mori*. **A, B, F** ICC v totálních preparátech. **C, D, E** Snímky paraplastových řezů zachycující imunodetekci s primární protilátkou (**C, D**) a preimunním sérem (**E**). **F** Imunoreaktivní buňky v *corpora cardiaca* (**CC**). *Corpora allata* (**CA**) je bez pozitivního signálu. Bílé šipky ukazují na neuron v dorzolaterálním protocerebru. Bílé hlavy šipek značí neuron ve fronto-ventrálním laterálním deutocerebru. Černé hlavy šipek ukazují nespecificky značené neurony. Měřítka v **A, C, E** jsou 50  $\mu\text{m}$ . Měřítka v **B, D, F** jsou 10  $\mu\text{m}$ .

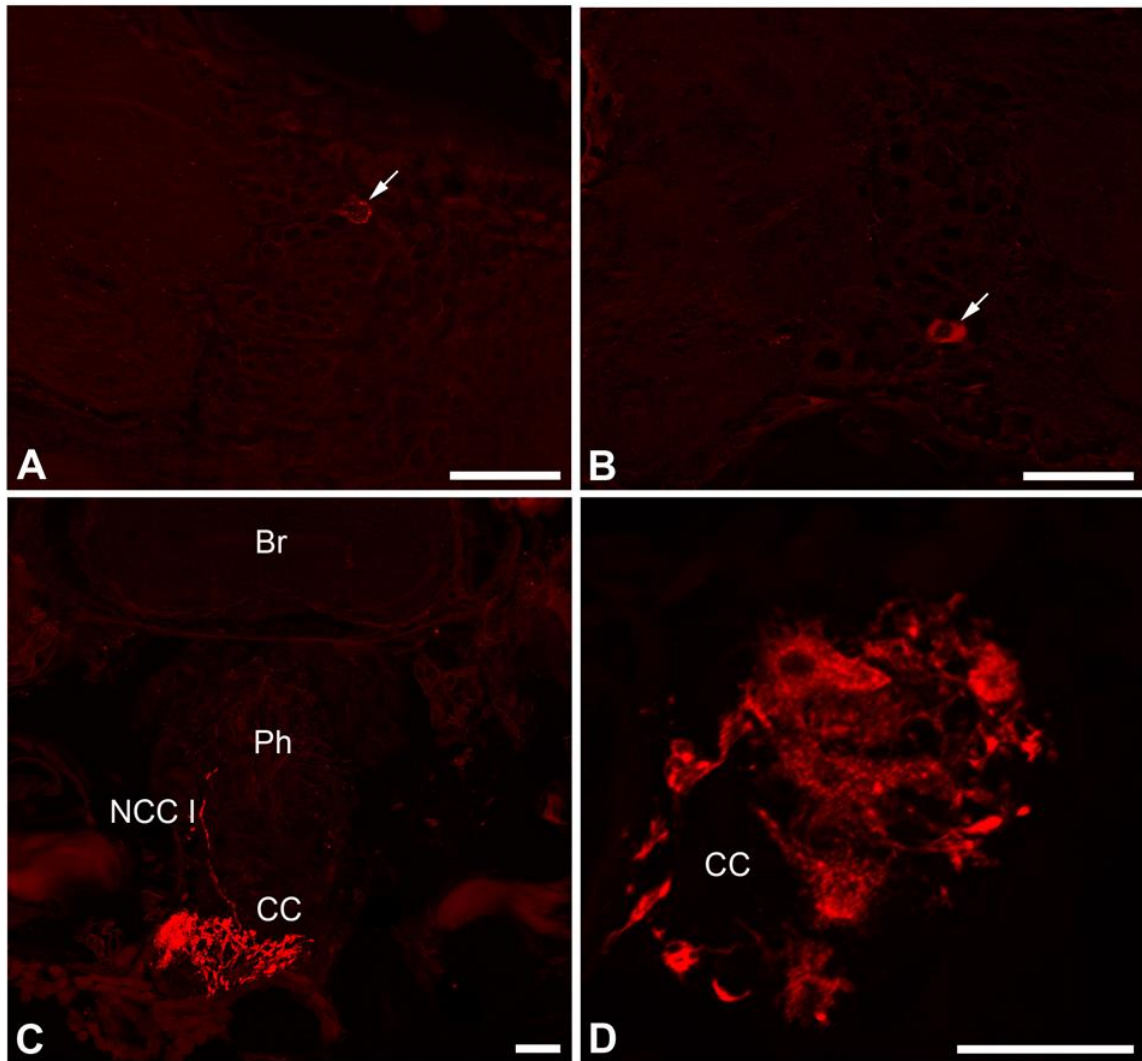
## 4.2 Imunohistochemická lokalizace Bommo-AKH v hlavovém gangliu dospělého

Na paraplastových řezech z mozku dospělého jsem s protilátkou proti Bommo-AKH rovněž detekovala dva páry bilaterálních imunoreaktivních buněk (Obr. 10, Obr. 11), které svým tvarem, velikostí a polohou připomínaly neurony detekované v larválním mozku.



**Obr. 10:** Schématické znázornění Bommo AKH imunoreaktivity v hlavovém gangliu dospělého *B. mori*.

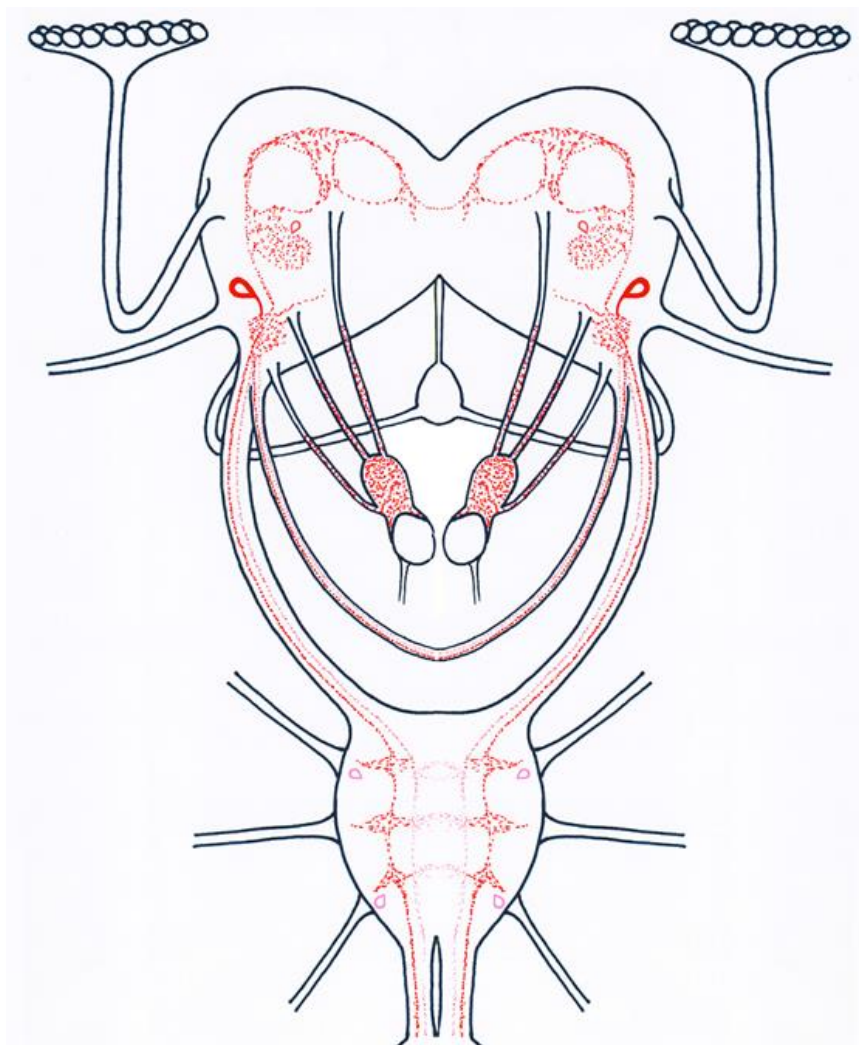
Jeden párový neuron se nacházel v dorzolaterální oblasti protocerebra (Obr. 11A). Druhý pár velkých neuronů ležel laterálně mezi deutocerebrem a tritocerebrem v blízkosti báze optického laloku (Obr. 11B). Pozitivní signál byl pouze cytoplasmatický, nezaznamenala jsem žádné výrazně značené axonální dráhy vybíhající z těchto neuronů. Pouze jemná síť nervových vláken byla občasně detekovatelná v oblasti laterálního protocerebra. Velké množství intenzivně značených Bommo-AKH imunoreaktivních buněk ležících v husté síti nervových vláken jsem detekovala v *corpora cardiaca* (Obr. 11D). Do této sítě vbíhal i úzký svazek nervových vláken procházející *nervus corporis cardiaci I* (NCC I).



**Obr. 11:** Bommo-AKH imunoreaktivní buňky a axonální dráhy na paraplantových řezech hlavového ganglia dospělé *B. mori*. **A** Neuron v dorzolaterálním protocerebru (šipka). **B** Deutocerebrum s pozitivním neuronem (šipka) na bázi optického laloku. **C, D** výrazný pozitivní signál v *corpora cardiaca* (CC) s jasným axonálním propojením mezi jednotlivými neurony. *Br*, mozek; *NCC I*, *nervus corporis cardiaci I*; *Ph*, jícen. Měřítka v A, B, D jsou 10  $\mu\text{m}$ . Měřítko v C je 50  $\mu\text{m}$ .

### 4.3 Imunohistochemická lokalizace *Bombyx* AKH-R v CNS larvy *B. mori*

Vzhledem k vysoké imunoreaktivitě protilátky proti *Bombyx* AKH-R v larvální mozkové tkáni, jsem identifikaci antigenu provedla pouze za použití totálních preparátů. Podobně jako při detekci Bommo-AKH, každá hemisféra centrálního mozku obsahovala dvojici pozitivní buněk, které dávaly vzniknout husté síti nervových vláken v rámci celého hlavového ganglia (Obr. 12, Obr. 13). Tvar a umístění obou pozitivních buněk připomínaly neurony detekované s protilátkou proti Bommo-AKH.

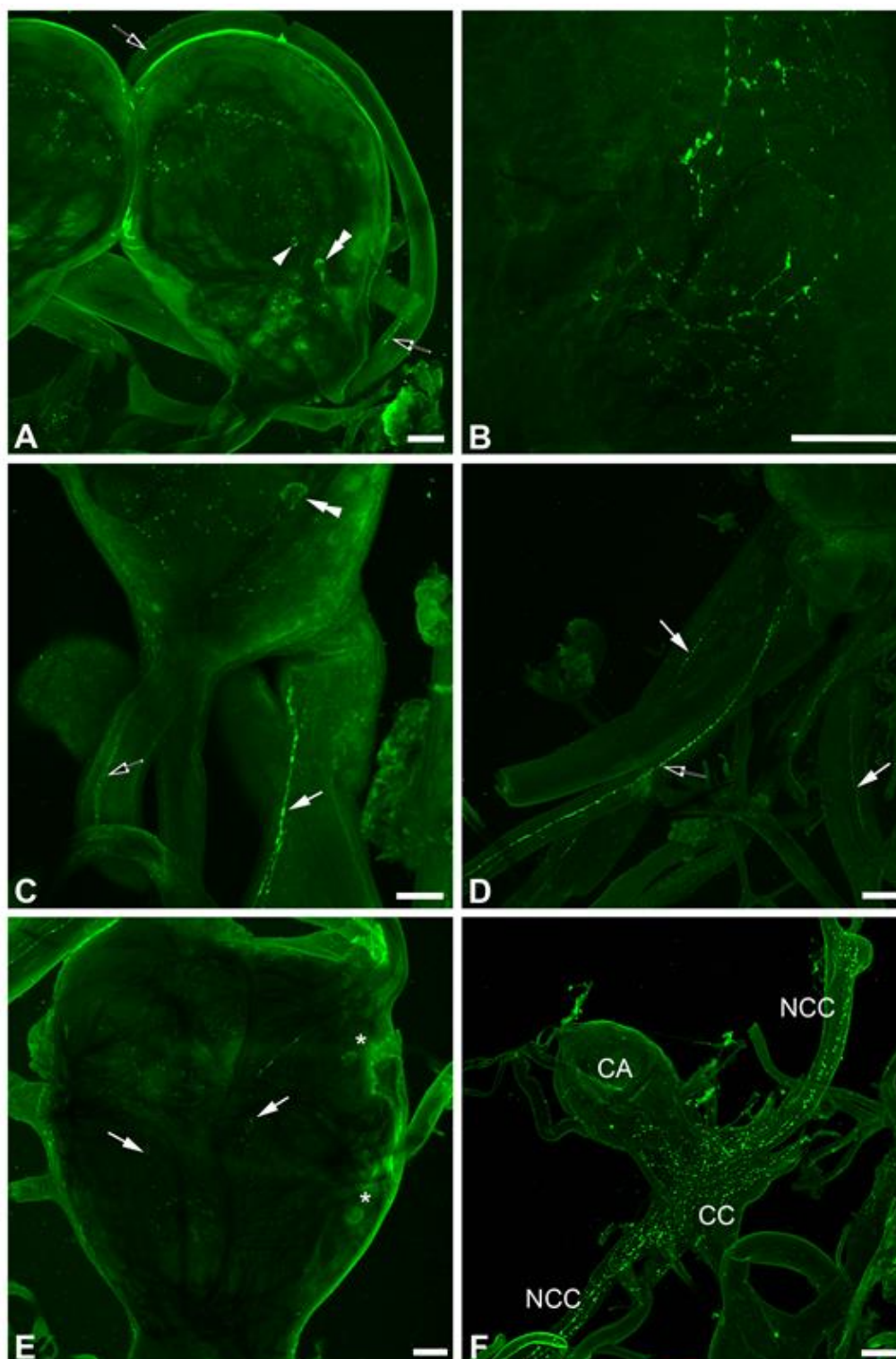


**Obr. 12:** Schématické znázornění *Bombyx* AKH-R imunoreaktivity v hlavovém gangliu larvy *B. mori*.

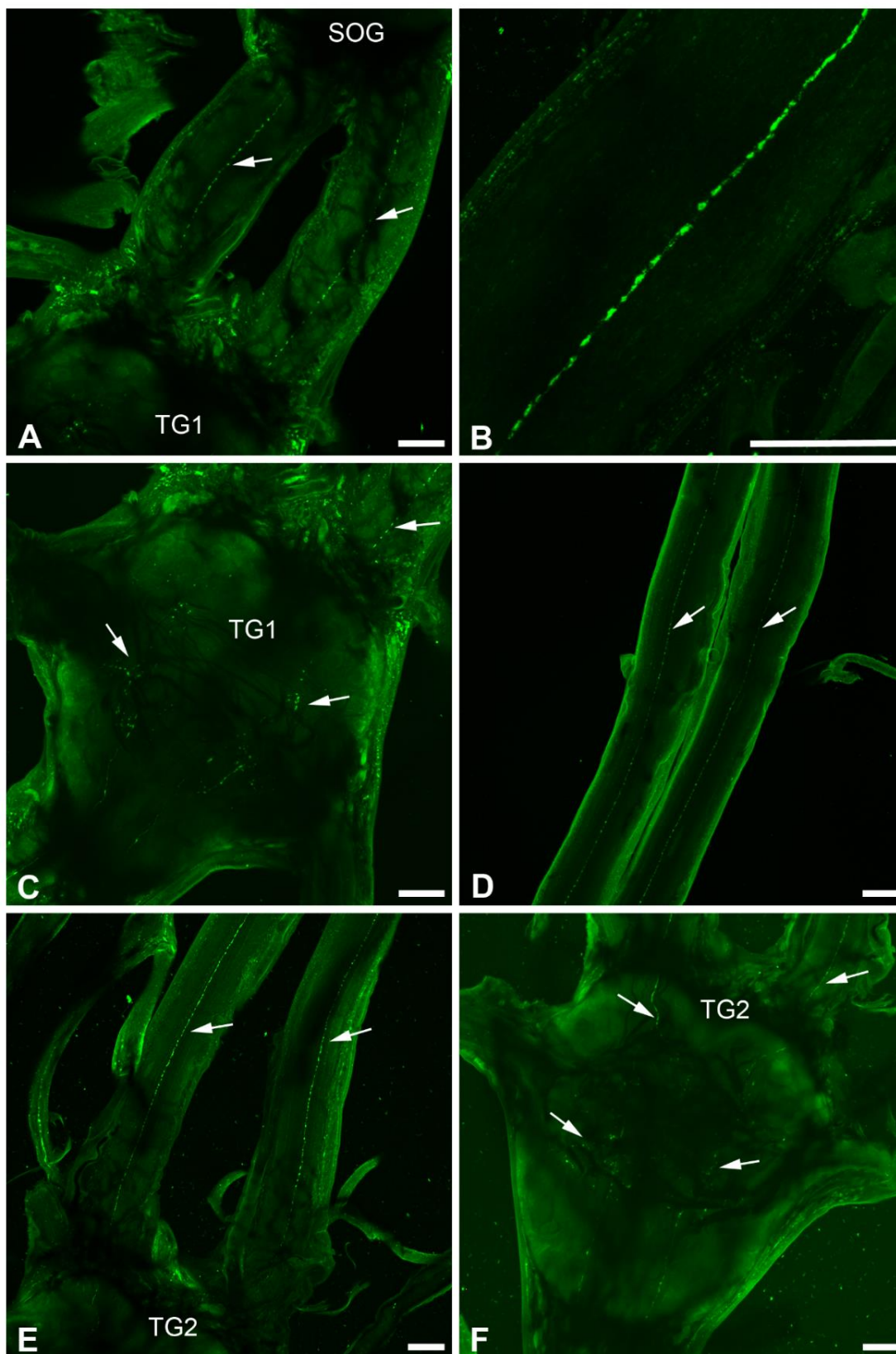
Menší neuron leží v oblasti frontálního deutocerebra v blízkosti neurilemy a velký neuron je umístěn v laterální oblasti centrálního mozku mezi deutocerebrem a tritocerebrem (Obr. 13A, C). Axony pozitivních neuronů tvoří hustou síť, která na jedné straně zasahuje do laterální a dorsální oblasti mozkových těles v deuto – a tritocerebru, zatímco jiná nervová vlákna vstupují do středové části mozku, kde tvoří

slabou anastomózu (přirozené anatomické spojení) s vedlejší mozkovou hemisférou (Obr. 13A, B). Síť nervových vláken vycházející z pozitivních buněk rovněž inervuje ventrální tritocerebrum a následně vybíhá přes kruhovitou jícnovou konektivu (circumoesophageal connective, CoC) do podjícnového ganglia (subesophageální ganglium, SOG) nebo běží kontralaterálně přes postesophageální tritocerebrální komisuru (PoC) tvořící jeden hlavní a druhý slabší paralelní svazek nervových vláken (Obr. 13C, D). Jakmile nervové svazky vstoupí do SOG, mírně se větví a vytváří tenké kontralaterální spojky. Z labiální neuromery opět pouze bilaterální pár podélných nervů postupuje do ventrální nervové pásky. Obdobný průběh vláken byl pozorován u všech testovaných ganglií ventrální nervové pásky jako je první a druhý thorakální ganglium (TG1 a TG2) (Obr. 14). Jeden pár slabě značených bilaterálních neuronů byl pozorován v laterální oblasti mandibulární a labiální neuromery SOG (hvězdičky v Obr. 13E). Výrazná síť pozitivních nervových vláken byla lokalizována v neurohemálním orgánu, *corpora cardiaca* (Obr. 13F). Přítomnost pozitivního signálu u obou nervů *corpora cardiaca* (*nervus corporis cardiaci I a II*, NCC I a II) naznačuje, že nervová vlákna sem vybíhají z centrálního mozku.





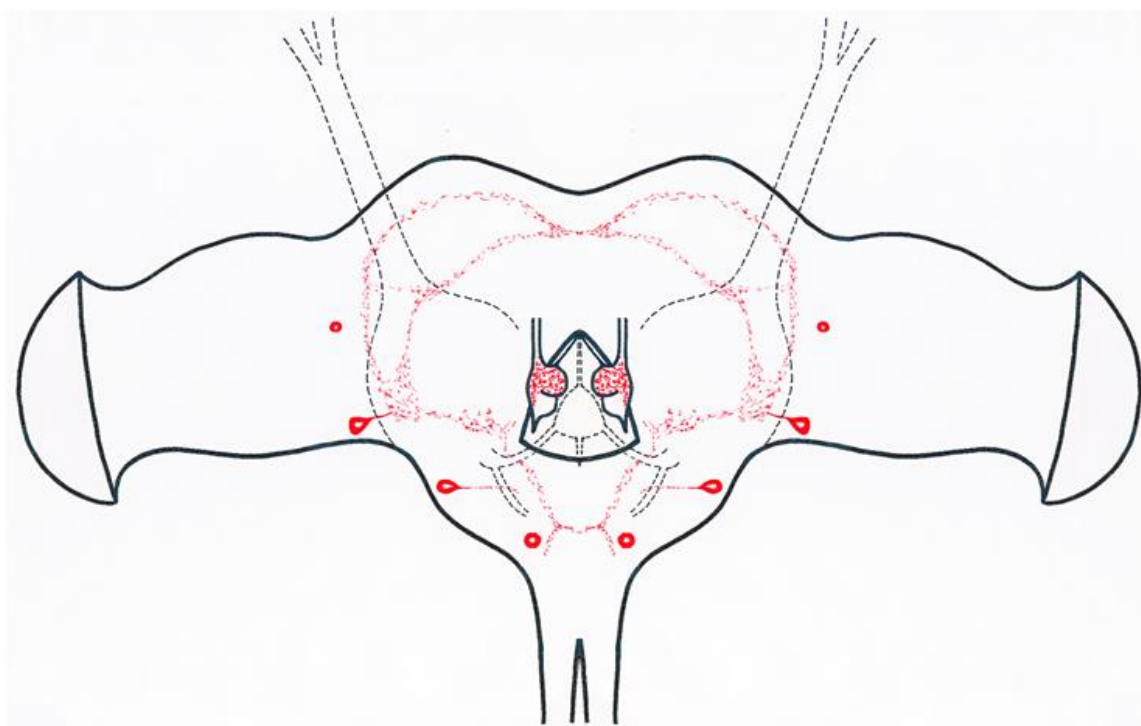
**Obr. 13:** *Bombyx* AKH-R imunoreaktivní buňky a jejich axonální dráhy v totálních preparátech hlavového ganglia larvy *B. mori*. **A** Malý neuron (bílá hlava šipky) ve frontálním deutocerebru a velký neuron (dvojitá bílá hlava šipky) na laterální straně mezi deuto – a tritocerebrem a síť jejich axonů. **B** Detailní záběr na síť pozitivních vláken v proto – a deutocerebru. **C, D** Velký neuron v mozku (dvojitá bílá hlava šipky) a větvení nervových vláken v tritocerebru, které vybíhá do kruhové jícnové konektivy (bílé šipky) a do postesophageální tritocerebrální komisury (černé šipky). **E** Síť nervových vláken (bílé šipky) v podjícnovém gangliu, která je tvořena procesy pozitivních neuronů v centrálním mozku. Pár slabě značených neuronů v laterální oblasti mandibulární a labiální neuromery podjícnového ganglia (hvězdičky). **F** Intenzivně značená nervová síť v *corpora cardiaca* a v *nervus corporis cardiaci*. Měřítka jsou 50  $\mu$ m.



**Obr. 14:** *Bombyx* AKH-R imunoreaktivita v totálních preparátech thorakálních ganglií larvy *B. mori*. **A** Imunoreaktivní nervová vlákna (šipky) v konektivách mezi podjícnovým gangliem (SOG) a prvním hrudním gangliem (TG1) **B** Vyšší zvětšení konektivy z obrázku A ukazující pozitivní svazek nervových vláken. **C-F** Pozitivní signál (šipky) v TG1 (C), ve spojnici mezi TG1 a druhým thorakálním gangliem (TG2) (D, E) a v TG2 (F). Měřítka jsou 50  $\mu$ m.

#### 4.4 Imunohistochemická lokalizace *Bombyx* AKH-R v hlavovém gangliu dospělé

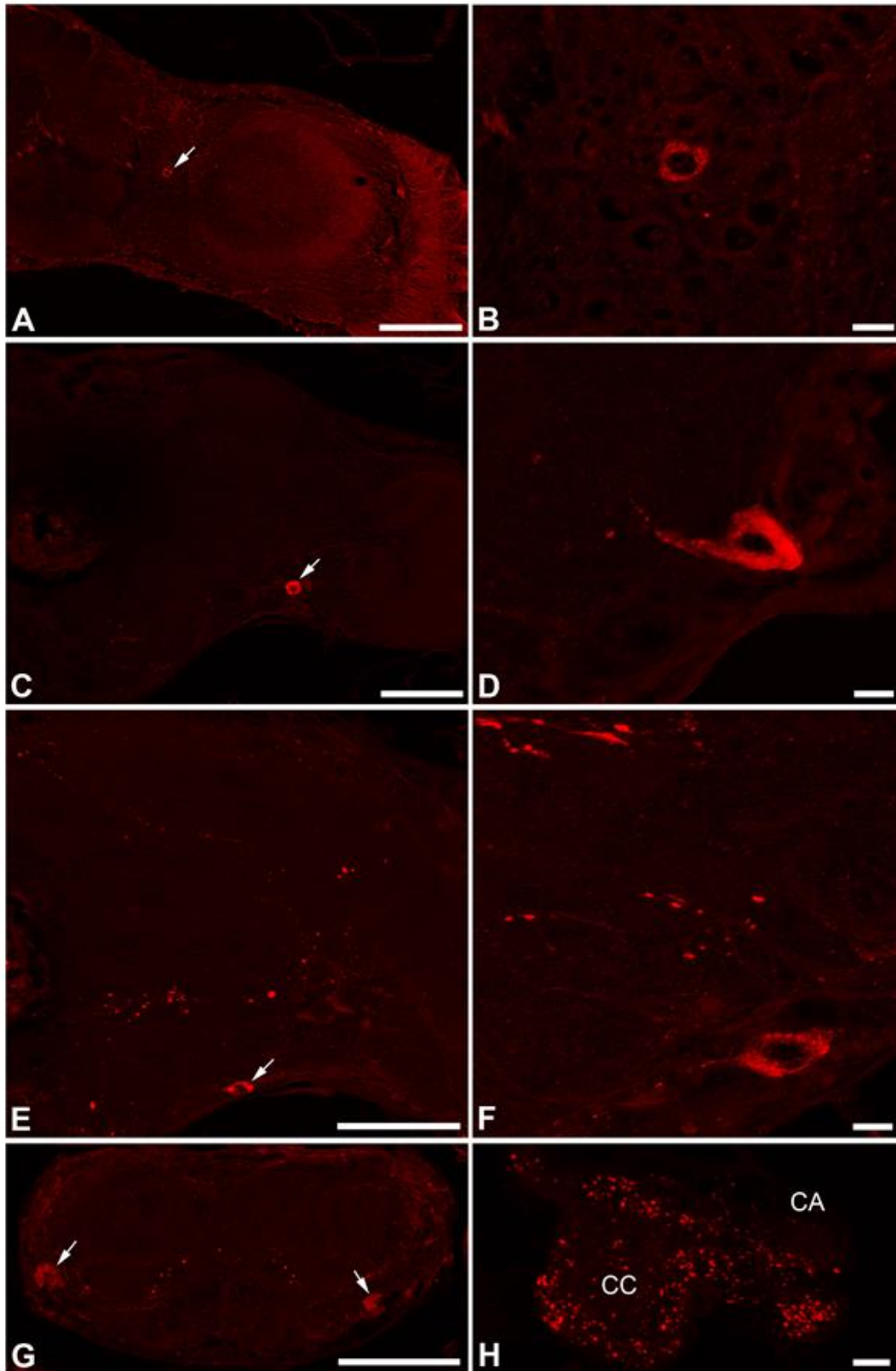
Přestože protilátka proti *Bombyx* AKH-R vykazovala vysokou imunoreaktivitu v larválních mozcích, mozky dospělců byly již pro zpracování totálních preparátů příliš objemné, proto jsem imunodetekci provedla na paraplastových řezech. Celkem jsem v hlavovém gangliu dospělé detekovala 4 páry imunopozitivních bilaterálních neuronů (Obr. 15, Obr. 16).



**Obr. 15:** Schématické znázornění *Bombyx* AKH-R imunoreaktivitu v hlavovém gangliu dospělé *B. mori*.

Jedná se o pár malých neuronů na spojnici optického laloku v blízkosti akcesorické meduly (Obr. 16 A, B), dva bilaterální velké neurony v laterálním mozku mezi deutocerebrem a tritocerebrem (Obr. 16 C, D), pár velkých neuronů v dorzolaterální oblasti tritocerebra (Obr. 16 E, F) a o dva bilaterální velké neurony v oblasti labiální neuromery SOG (Obr. 16 G). Neuronové axony vycházející z výše popsaných buněk tvoří jemnou síť, která jednak postupuje přes deutocerebru do protilehlé mozkové hemisféry, a jednak prochází tritocerebrem k SOG (Obr. 16 E, F). Výrazná síť vláken je rozprostřena v celé oblasti *corpora cardiaca* (Obr. 16 H).

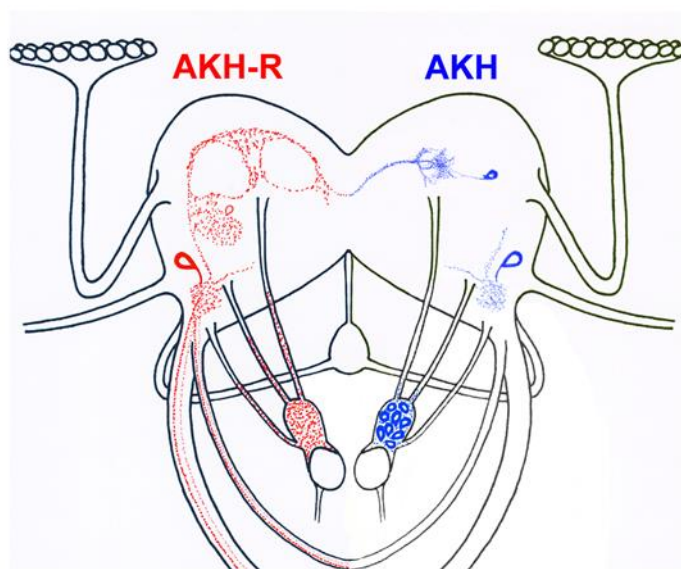




**Obr. 16:** *Bombyx* AKH-R imunoreaktivita na paraplastových řezech hlavového ganglia dospělé *B. mori*. **A, B** Imunopozitivní buňka (šipka) na spojnici optického laloku. **C, D** Velký neuron (šipka) v dorsolaterálním protocerebru. **E, F** Velký neuron (šipka) v dorzolaterálním tritocerebru. **G** Párový neuron (označeny šipkami) v laterální oblasti labiální neuromery SOG. **H** Výrazná síť nervových vláken v *corpora cardiaca*. Měřítka A, C, E, G, H jsou 50  $\mu\text{m}$ . Měřítka B, D, F jsou 10  $\mu\text{m}$ .

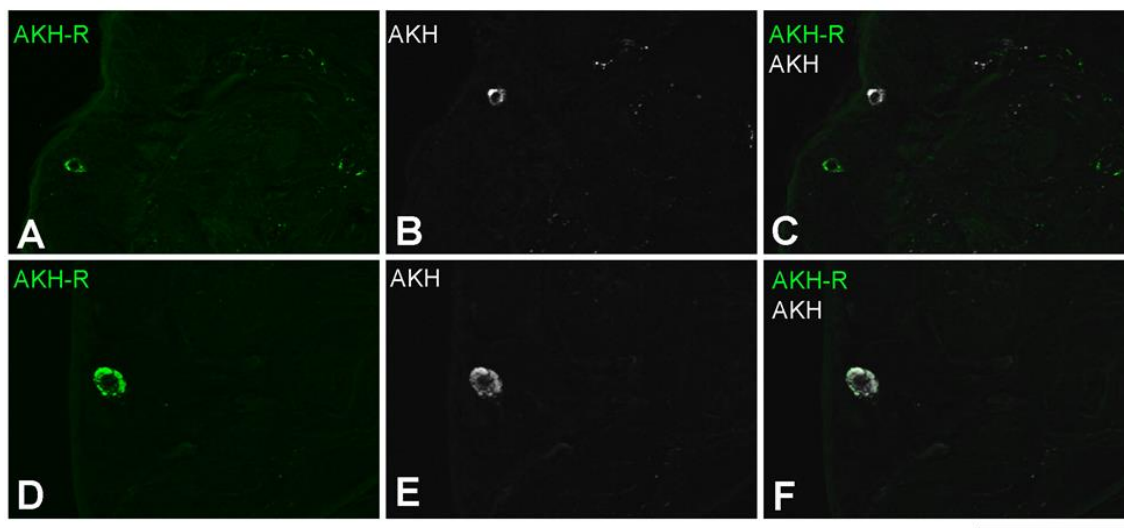
#### 4.5 Kolokalizaci imunoreaktivity *Bombyx* AKH-R a Bommo-AKH v hlavovém gangliu larvy *B. mori*

Protilátky proti Bommo-AKH a proti *Bombyx* AKH-R odhalily dva páry pozitivních neuronů ležících v podobných oblastech centrálního mozku. K určení, zda se jedná o identické buňky, bylo nutné aplikovat obě protilátky současně na jeden preparát. Jelikož obě primární protilátky byly získány ze stejného typu donorového organismu, musely být aplikovány postupně. Pro přesné určení vzájemné polohy *Bombyx* AKH-R a Bommo-AKH jsem použila imunodetekci na paraplastových řezech larválních mozků. Imunoreaktivitu obou antigenů jsem pro zjednodušení zaznamenala do společného schématického znázornění (Obr. 17).



**Obr. 17:** Souběžné znázornění imunoreaktivity *Bombyx* AKH-R a Bommo-AKH v hlavovém gangliu *B. mori*.

Souběžná lokalizace *Bombyx* AKH-R a Bommo-AKH v larválním hlavovém gangliu odhalila totožnost velké imunoreaktivní buňky v oblasti ventrolaterálního deutocerebra a naopak ukázala, že malé neurony vyskytující se v dorzolaterálním protocerebru jsou odlišné (Obr. 18).



**Obr. 18:** Souběžná imunodetekce *Bombyx* AKH-R a Bommo-AKH na parapastových řezech hlavového ganglia larvy *B. mori*. **A, D** AKH-R imunoreaktivita, **B, E** Bommo-AKH imunoreaktivita a **C, F** proložené snímky obou reaktivit na záběrech ukazují detaily pozitivních neuronů nalezených v dorzolaterálním protocerebru (A-C) a ventrolaterálním deutocerebru (D-F) v rámci jedné mozkové hemisféry. Měřítko je 100  $\mu$ m.

## 5 Diskuze

Předkládaná práce pojednává o lokalizaci adipokinetického hormonu Bommo-AKH a jeho receptoru *Bombyx* AKH-R v centrálním nervovém systému bource morušového, *B. mori*, za využití imunohistochemických technik aplikovaných, jak na totálních preparátech, tak na paraplastových řezech. Imunoreaktivita obou antigenů byla detekována v *corpora cardiaca* (CC) a ve dvou bilaterálních neuronech v mozku. Jeden neuron byl umístěn v dorzolaterálním protocerebru a druhý ve ventro-laterálním deutocerebru, přičemž druhý zmiňovaný neuron obsahoval imunoreaktivitu hormonu i receptoru, což ukazuje na možnost vzájemné autoregulační vazby. Imunoreaktivita receptoru byla také nalezena ve dvou párových neuronech podjícnového ganglia a v husté síti nervových vláken, která prostupovala proto-, deuto – i tritocerebrem a vybíhala i do podjícnového ganglia. U larev z této sítě vybíhal pár bilaterálních nervových vláken dále do břišní nervové pásky. Přestože specifická získaných signálů byla ověřena pomocí preimunního séra, vzhledem k podobnosti všech tří AKH u *B. mori* nelze vyloučit, že protilátka proti Bommo-AKH rozpoznává i další typy bourčího AKH, zejména pak velice podobný Manse-AKH. Na druhou stranu s protilátkou proti typu Manse-AKH nebylo v mozku detekován pozitivní signál. To může svědčit o tom, že tato protilátka buď nerozpozná své specifické epitopy nebo zde není syntetizována.

Přítomnost AKH v CNS *B. mori* není překvapivá. Je známo, že AKH jsou syntetizovány, ukládány a uvolňovány převážně v neurosekretorických buňkách neurohemálního orgánu, *corpora cardiaca*, který je spojen s mozkovými hemisférami třemi párovými nervy (*nervis corporis cardiaci I, II, III*). U některých hmyzích zástupců jako je *D. melanogaster*, je AKH imunoreaktivita omezena výhradně na buňky *corpora cardiaca* (Kim a Rulifson, 2004; Lee a Park, 2004; Isabel et al., 2005; Noyes et al., 1995; Nässel, 2002; Nässel a Winther, 2010). Naproti tomu u řady hmyzích druhů jako *L. migratoria* (Schooneveld et al., 1985; Moshitzky et al., 1987; Bray et al., 1993), *Carausius morosus* a *Sarcophaga bullata* (Clottens et al., 1989), *Pyrrhocoris apterus* (Kodrík et al., 2003 a Kodrík et al., 2015) nebo *Aedes aegypti* (Kaufmann et al., 2009) byla přítomnost AKH zaznamenána v mozku. V mozku ruměnice pospolné (*P. apterus*) bylo AKH detekováno ve více než 140 neuronech a v síti jejich axonů zasahující do oblastí neuropile (Kodrík et al., 2003). Přítomnost hormonu v mozku *L. migratoria* byla identifikována nejen prostřednictvím

imunohistochemie, ale i radioimunoesejí (Schooneveld et al., 1985; Bray et al., 1993) a vysoce účinnou kapalinovou chromatografií spojenou s analýzou aminokyselinové sekvence (Moshitzky et al., 1987). Pokusy na mozcích inkubovaných *in vitro*, které studují produkci *L. migratoria* AKH (Locmi-AKH) se zainkorporovaným [5-<sup>3</sup>H] tryptofanem ukazují, že tento hormon je syntetizován *de novo* v mozku a není transportován z CC (Moshitzky et al., 1987). V rámci CNS byla AKH imunoreaktivita pozorovaná kromě *corpora cardiaca* a mozku i v několika skupinách neuronů podjícnového ganglia *P. apterus* (Kodrík et al., 2003) a v břišní nervové pásce několika druhů komárů (Kaufmann a Brown, 2006; Kaufmann et al., 2009). Tyto výsledky imunohistochemické detekce AKH v mozcích hmyzu však byly zpochybňovány výzkumem *R. prolixus*, který poukazuje na to, že imunologický důkaz přítomnosti AKH je kvůli krosreaktivitě AKH protilátek s corazoninem nebo AKH-corazonin podobným peptidem značně nepřesný (Patel et al., 2014). Na druhou stranu data získaná pomocí RT-PCR testující zastoupení transkriptu preprohormonu AKH v rozličných tkáních řady hmyzích druhů ukazují na přítomnost AKH mRNA v mozkové tkáni (Abdel-latif a Hoffmann, 2007; Johnson et al., 2014; Wicher et al., 2006; Zhou et al., 2018). Dále AKH mRNA exprese (typ Spofr-AKH) byla stanovena v ováriích a přídatných žlázách, tukovém tělese a svalech u *Spodoptera frugiperda*.

Přítomnost AKH v axonech CNS u *B. mori* podporuje domněnku o možné funkci tohoto hormonu jako mediátoru nervové signalizace. Imunodetekce AKH v axonech mozkových neuronů byla popsána hned u několika druhů hmyzu: *L. migratoria* a *P. americana* (Schooneveld et al., 1986), *P. apterus* (Kodrík et al., 2003), *Anopheles gambiae* (Kaufmann a Brown, 2006) nebo *A. aegypti* (Kaufmann et al., 2009). Prozatím však nebyl nalezen konsensus, který by funkci AKH jako neurotransmiteru uspokojivě potvrdil. Částečným důkazem může být injekce Manse-AKH do mezotorakálního ganglia, která vyvolá nárůst elektrické aktivity příslušných nervů inervujících mezotorakální svaly u *P. apterus* (Milde et al., 1995) nebo injekce KCl do spojení mezi thoraxem a abdomenem plošnice *P. apterus* vedoucí ke zvýšení hladiny AKH v *corpora cardiaca* (Kodrík et al., 2015). Pokusy s podáním většího množství KCl nebo jiných toxických látek jako je deltamethrinu, permethrinu, toxínu z *Bacillus thuringiensis* (Cry 2Aa) nebo paraquat (látka vyvolávající oxidativní stres) v potravě u řady hmyzích druhů, však ke zvýšení hladiny AKH v *corpora cardiaca* nevedly (Candy, 2002; Kodrík a Socha, 2005; Kodrík et al., 2007, Kodrík et al., 201; Večeřa et al., 2007, 2012; Krishnan a Kodrík,

2012; Bednářová et al., 2013). Přestože účinky AKH na neuronovou signalizaci jsou sporné. Lze sledovat dva způsoby odpovědi AKH na stresové podmínky, a to klasickou AKH odezvu projevující se ukládáním hormonu v CC a dále více adaptabilní neuronovou reakci zprostředkovanou neuronovou signalizací AKH.

Exprese AKH-R byla poprvé ukázána v nepárových neuronech abdominálního ganglia u *P. americana* (Wicher et al., 2006). Tyto neurony jsou součástí dráhy octopaminu blízké příbuzný norepinefrinu obratlovců (Roeder, 2005). Stimulací AKH-R pomocí AKH ligandu typu Manse-AKH se u *P. americana* zvyšuje hladina octopaminu, která pak ovlivňuje řadu buněk (Wicher et al., 1994) a hraje významnou roli v řízení procesů dýchání a cirkulace během adaptace jedince na zvýšenou motorickou aktivitu. Octopamin pozitivní neurony v thorakálním gangliu u sarančete ovlivňují svaly křídel. Některé neurony jsou během letu inhibovány, zatímco jiné jsou aktivní (Duch et al., 1999; Pflüger 1999). Octopamin má přímý účinek i na energetické zásobování svalů křídel během dlouhotrvajícího letu, kdy jsou cukry nahrazovány lipidy, které pak slouží jako hlavní zdroj energie (Mentel et al., 2003).

U můry *Spodoptera frugiperda* RT-PCR ukázala expresi AKH-R nejen v CC a mozku, ale také ve středním střevu, tukovém tělese, svalech, ováriích a přídatných reprodukčních orgánech (Abdel-latif a Hoffmann, 2007). Také přítomnost AKH mRNA v ováriích viviparní partenogenetické kyjatky nachové, *Acyrtosiphon pisum*, objasnila roli AKH v regulaci tvorby oocytů (Jedlička et al., 2012). Navíc mRNA exprese AKH-R byla také detekována, jak v mozku, tak i ve slinných žlázách, střevě, ováriích, srdci a lítacích svalech u *P. americana* (Wicher et al., 2006). V neposlední řadě relativní hladina transkriptu AKH-R byla zaznamenána v tukovém tělese u lišaje, *Manduca sexta* (Ziegler et al., 2011).

RT-PCR analýza u *B. mori* ukázala expresi *Bombyx* AKH-R v tukovém tělese, ve slinných žlázách, srdeční tkáni a v mozku s přilehlými *corpora cardiaca* (Obr. 4, Žurovec nepublikovaná data).

Ani s jednou z použitých protilátek proti Manse-AKH, Bommo-AKH a *Bombyx* AKH-R nebyl zaznamenán pozitivní signál u vzorků z tukového tělesa, svalové tkáně, střeva a z pohlavních orgánů dospělců. V těchto tkáních se buď studované antigeny u *B. mori* nevyskytují nebo způsob zpracování tkání pro imunodetekci byl vhodný pouze pro mozkovou tkáň. Zvláště překvapivá byla nepřítomnost *Bombyx* AKH-R

pozitivního signálu v tukovém tělese, kde byla zaznamenána silná expresní aktivita na úrovni mRNA (Obr. 4, Žurovec nepublikovaná data). Konstatování, že výše studované tkáně neobsahují žádné AKH ani jejich receptory vyžaduje ověření pomocí dalších molekulárně biologických technik jako je Western blotová analýza nebo kapalinová chromatografie.

Srovnání získaných výsledků s již známými daty potvrzuje, že expresní aktivita genů kódujících AKH a AKH-R spolu se zastoupením jejich finálních produktů v mozku i v dalších hmyzích tkáních je druhově specifická.

## 6 Závěr

Provedla jsem imunohistochemickou lokalizaci adipokinetického hormonu Bommo-AKH a jeho receptoru *Bombyx* AKH-R v centrálním nervovém systému bource morušového, *B. mori* a srovnala získané výsledky s dostupnými daty pojednávajícími o distribuci produktů genů AKH a AKH-R u jiných druhů hmyzu. V současné době ověřuji získané výsledky pomocí techniky Western blot. Výsledky této práce budou součástí publikace pojednávající o funkci AKH-R u *B. mori*. Cílenou mutagenezí byl AKH-R vyřazen z funkce a u mutantních jedinců byly sledovány změny v metabolismu cukrů a tuků.

Kromě získaných výsledků jsem se zdokonalila v práci s fluorescenčním a konfokálním mikroskopem a naučila se zpracovávat získanou fotodokumentaci k publikačním účelům.



## 7 Seznam použité literatury

Abdel-latif M., Hoffmann K. H. The adipokinetic hormones in the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*: cDNA cloning, quantitative real time RT-PCR analysis, and gene specific location. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37: 999-1014, 2007.

Alquicer G., Kodrík D., Krishan N., Večeřa J., Socha R. Activation of insect anti-oxidative mechanisms by mammalian glucagon. *Comp Biochem. Phys. B* 152: 226-233, 2009.

Aminokyselínová sekvence AKHR: the Gene bank database, accession no. AF403542.

Anatomická schémata: Structure and function of primary messengers in invertebrates: Insect diuretic and antidiuretic peptides; Molecular Comparative physiology, editors: R.K.H. Kinne, E. Kinne-Saffran, K.W. Beyenbach, str.7. [http://cronodon.com/BioTech/Insect\\_anatomy.html](http://cronodon.com/BioTech/Insect_anatomy.html) (19.10. 2018)

Auerswald L. Birgül N., Gäde G., Kreienkamp H. J., Richter D. Structural, functional, and evolutionary characterization of novel members of the allatostatin receptor family from insects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282: 904-909, 2001.

Baumbach J., Xu Y., Hehlert P., Kuhnlein R.P. Galphag, Ggamma1 and Plc21C control *Drosophila* body fat storage. *J. Genet. Genomics* 41: 283-292, 2014.

Bednářová A., Krishnan N., Cheng I. C., Večeřa J., Lee H. J., Kodrík D. Adipokinetic hormone counteracts oxidative stress elicited in insects by hydrogen peroxide: in vivo and in vitro study. *Physiol. Entomol.* 38: 54-62, 2013.

Belmont M., Cazzamali G., Williamson M., Hauser F., Grimmelikhuijzen C.J. Identification of four evolutionarily related G protein-coupled receptors from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344:160-165, 2006.

Berne R.M., Rubio R. Adenine nucleotide metabolism in the heart. *Circ. Res.* 35 (Suppl. 3): 109-120, 1974.

Birgül N., Wese C., Kreienkamp II.J., Richter D. Reverse physiology in *Drosophila*: identification of a novel allatostatin-like neuropeptide and its cognate

receptor structurally related to the mammalian somatostatin/galanin/opioid receptor family. *EMBO J.* 18:5892-5900, 1999.

Bray M.M., Shafi S., Wheeler C.H. Goldsworthy G.J. Quantification by radioimmunoassay of the adipokinetic hormone-I in neural tissues in the head of *Locusta migratoria*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 106: 257-262, 1993.

Caers J., Peeters L., Janssen T., De Haes W., Gade G., Schoofs L. Structure-activity studies of *Drosophila* adipokinetic hormone (AKH) by a cellular expression system of dipteran AKH receptors. *Gen. Comp. Endocrinol.* 177: 332-337, 2012.

Candy D. J. Adipokinetic hormones concentrations in the haemolymph of *Schistocerca gregaria*, measured by radioimmunoassay. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1361-1367, 2002.

Clottens F., Gäde G., Huybrechts R., De Loof A. Immunohistochemical localisation of the hypertrehalosemic hormone II (Cam-HrTH-II) and related peptides in the nervous system of *Carausius morosus* and *Sarcophaga bullata*. *Cell Tissue Res.* 258: 631-636, 1989.

Doležal T., Gazi M., Zurovec M., Bryant P.J. Genetic analysis of the ADGF multigene family by homologous recombination and gene conversion in *Drosophila*. *Genetics* 165:653-666., 2003.

Doležalová E., Zurovec M., Dolezal T., Simek P., Bryant P.J. The emerging role of adenosine deaminases in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35: 381-389, 2005.

Duch C., Mentel T., Pflüger H. J. Distribution and activation of different types of octopaminergic DUM neurons in the locust. *J Comp Neurol* 403: 119-134, 1999.

Fan Y., Sun P., Wang Y., He X., Deng X., Chen X., Zhang G., Chen X., Zhou N. The G protein-coupled receptors in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40: 581-591, 2010.

Fassold K., El-Damanhoury H.I., Lorenz M.W. Age-dependent cyclic locomotor activity in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, and the effect of adipokinetic hormone on locomotion and excitability. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 196: 271-283, 2010.

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

Gäde G. The adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone peptide family: Structures, interrelationships and functions. *J. Insect Physiol.* 36:1-12, 1990.

Gäde G. The revolution in insect neuropeptides illustrated by the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family of peptides. *Z. Naturforsch.* 51 C: 607-617, 1996.

Gäde G., Goldsworthy G. J. Insect peptide hormones: a selective review of their physiology and potential application for pest control. *Pest Manag.Sci.* 59: 1063-1075, 2003.

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

Gäde G., Marco H. G., Simek P., Audsley N., Clark K. D., Eaver R. J. Predicted versus expressed adipokinetic hormones, and other small peptides from the corpus cardiacum-corpora allata: a case study with beetles and moths. *Peptides* 29: 1124-1139, 2008.

Gimpl G., Fahrenholz F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 81: 629-683, 2001.

Hansen F., Grimmelikhuijzen C. J. P. Evolution of the AKH/corazonin/ACP/GnRH receptor superfamily and their ligands in the Protosomia. *General and Comparative Endocrinology* 209: 35-49, 2014.

Hansen K. K., Stafflinger E., Schneider M., Hauser F., Cazzamali G., Williamson M., Kollmann M., Schachtner J., Grimmelikhuijzen C. J. Discovery of a novel insect neuropeptide signaling system closely related to the insect adipokinetic hormone and corazonin hormonal systems. *J. Biol. Chem.* 285: 10736-10747, 2010.

Hansen K.K., Hauser F., Cazzamali G., Williamson M., Grimmelikhuijzen C.J. Cloning and characterization of the adipokinetic hormone receptor from the cockroach *Periplaneta americana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:638-643, 2006.

Hauser F., Nothacker H.P., Grimmelikhuijzen C.J.P. Molecular cloning, genomic organization, and developmental regulation of a novel receptor from *Drosophila*

melanogaster structurally related to members of the thyroid-stimulating hormone, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor family from mammals. *J.Biol. Chem.* 272: 1002-1010, 1997.

Hauser F., Søndergaard L., Grimmelikhuijzen C.J.P. Molecular cloning, genomic organization and developmental regulation of a novel receptor from *Drosophila melanogaster* structurally related to gonadotropin-releasing hormone receptors for vertebrates. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 249: 822-828, 1998.

Hewes R. S., Taghert P. H. Neuropeptides and neuropeptide receptors in the *Drosophila melanogaster* genome. *Genome Res.* 11: 1126-1142, 2001.

Huang H., He X., Deng X., Li G., Ying G., Sun Y., Shi L., Benovic J. L., Zhou N. Bombyx adipokinetic hormone receptor activates extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 via G protein-dependent PKA and PKC but  $\beta$ -arrestin-independent pathways. *Biochemistry* 49: 10862-10872, 2010.

Chapman R.F. The insects, structure and function, fourth ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1998.

Isabel G., Martin J.R., Chidami S., Veenstra J.A., Rosay P. AKH-producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioral changes in *Drosophila*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: R531-R538, 2005.

Ishibashi J., Kataoka H., Nagasawa H., Isogai A., Suzuki A. Isolation and identification of adipokinetic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 66-70, 1992.

Jaffe II., Raina A. K., Riley C. T., Fraser B. A., Bird T. G., Tseng C. M., Zang Y. S., Hayes D. K. Isolation and primary structure of a neuropeptide hormone from *Heliothis zea* with hypertrehalosemic and adipokinetic activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155: 344-350, 1988.

Jedlička P., Steinbauerová V., Šimek P., Zahradníčková H. Functional characterization of the adipokinetic hormone in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 162: 51-58, 2012.

Johnson J. I., Kavanaugh S. I., Nguyen C., Tsai P-S. Localization and functional characterization of a novel adipokinetic hormone in the mollusk, *Aplysia californica*. PLoS ONE 9(8): e106014, 2014.

Jones B.J., Tan T., Bloom S.R. Minireview: glucagon in stress and energy homeostasis. *Endocrinology* 153: 1049-1054, 2012.

Kaufmann C., Brown M.R. Adipokinetic hormones in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*: identification and expression of genes for two peptides and a putative receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36: 466-481, 2006.

Kaufmann C., Merzendorfer H., Gäde G. The adipokinetic hormone system in Culicinae (Diptera: Culicidae): Molecular identification and characterization of two adipokinetic hormone (AKH) precursors from *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* and two receptor variants from *A. aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39:770-781, 2009.

Kim S. K., Rulifson E. J. Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila corpora cardiaca* cells. *Nature* 431: 316-320, 2004.

Knight D., Harvey P.J., Iliadi K.G., Klose M.K., Iliadi N., Dolezelova E., Charlton M.P., Zurovec M., Boulianne G.L. Equilibrative nucleoside transporter 2 regulates associative learning and synaptic function in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 30: 5047-5057, 2010.

Kodrík D. Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiol. Entomol.* 33: 171-180, 2008.

Kodrík D., Bartu I., Socha R. Adipokinetic hormone (Pyrap-AKH) enhances the effect of a pyrethroid insecticide against the firebug *Pyrrhocoris apterus*. *Pest Manag. Sci.* 66: 425-431, 2010.

Kodrík D., Krishnan N., Habušťová O. Is the titer of adipokinetic peptides in *Leptinotarsa decemlineata* fed on genetically modified potatoes increased by oxidative stress? *Peptides* 28: 974-980, 2007.

Kodrík D., Socha R., Simek P., Zemek R., Goldsworthy G.J. 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, 2000.

Kodrík D., Socha R., Syrová Z. Developmental and diel changes of adipokinetic hormone in CNS and haemolymph of the flightless wingpolymorphic bug, *Pyrrhocoris apterus*. *J. Insect Physiol.* 49: 53-61, 2003.

Kodrík D., Socha R., Zemek R. Topical application of Pya-AKH stimulates lipid mobilization and locomotion in the flightless bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Physiol. Entomol.* 27:15-20,2002.

Kodrík D., Stašková T., Jedličková V., Weyda F., Závodská R., Pfliegerová J. Molecular characterization, tissue distribution, and ultrastructural localization of adipokinetic hormones in the CNS of the firebug *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Insecta). *General and Comp. Endocrinology* 210: 1-11, 2015.

Köllish G.V., Lorenz M.W., Kellner R., Verhaert P.D., Hoffmann K. H. Structure elucidation and biological activity of an unusual adiponetic hormone from *corpora cardiaca* of the butterfly, *Vanessa cardui*. *Eur. J. Biochem.* 267: 5502-5508, 2000.

Kramer K. J., Tager H.S., Childs C.N. Insulin-like and glucagon-like peptides in insect hemolymph. *Insect Biochem.* 10:179-182, 1980.

Krishnan N., Kodrík D. Endocrine control of oxidative stress in insects. In: Farooqui T., Farooqui A.A. (Eds.). *Oxidative stress in vertebrates and invertebrates: Molecular aspects of oxidative stress on Cell Signalling*. Wiley-Blackwell, New Jersey. Pp. 261-270, 2012.

Lee G., Park J. H. Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167: 311-323, 2004.

Lenz C., Søndergaard L., Grimmelikhuijzen C. J. P. Molecular cloning and genomic organization of a novel receptor from *Drosophila melanogaster* structurally related to mammalian galanin receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269:91-96, 2000.

Lenz C., Williamson M., Grimmelikhuijzen C. J. P. Molecular cloning and genomic organization of a second probable allatostatin receptor from *Drosophila melanogaster*. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 273: 571-577, 2000.

Lenz C., Williamson M., Grimmelikhuijzen C. J. P. Molecular cloning and genomic organization of an allatostatin preprohormone from *Drosophila melanogaster*. *Biophys. Res. Commun* 273: 1126-1131, 2000.

Lenz C., Williamson M., Hansen G. N., Grimmelikhuijzen C. J. P. Identification of four *Drosophila* allatostatins as the cognate ligands for the *Drosophila* orphan receptor DAR-2. *Biophys. Res. Commun* 286: 1117-1122, 2001.

Lindemans M., Janssen T., Beets I., Temmerman L., Meelkop E., Schoofs L. Gonadotropin-releasing hormone and adipokinetic hormone signaling systems share a common evolutionary origin. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* 2:16, 2001.

Lorenz M. W., Kellner R., Völkl, Hoffmann K. H., Woodring J. A comparative study on hypertrehalosaemic hormones in the Hymenoptera: sequence determination, physiological actions and biological significance. *J. Insect Physiol.* 47:563-571, 2001.

Masino S.A., Dunwiddie T.V. Temperature-dependent modulation of excitatory transmission in hippocampal slices is mediated by extracellular adenosine. *J. Neurosci.* 19: 1932-1939, 1999.

Mentel T., Duch C., Stypa H., Wegener G., Müller U., Pflüger H. J. Central modulatory neurons control fuel selection in flight muscle of migratory locust. *J Neurosci* 23: 1109-1113, 2003.

Milde J.J., Ziegler R., Wallstein M. Adipokinetic hormone stimulates neurons in the insect central nervous system. *J.Ex.Biol.* 198:1307-1311, 1995.

Mordue W., Stone J.V. Relative potencies of locust adipokinetic hormone and prawn red pigment-concentrating hormone in insect and crustacean systems. *Gen. Comp. Endocrinol.* 33:103-108, 1977.

Moshitzky P., Henzel W.J., Rafaeli A., Ramachandran J., Applebaum S.W. Synthesis of adipokinetic hormone (AKH-I) in the locust brain. *Insect Biochem.* 17: 1133-1137, 1987.

Nässel D. R. Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Prog. Neurobiol.* 68: 1-84, 2002.

Nässel D. R., Winther A. M. E. *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. *Prog. Neurobiol.* 92: 42-104, 2010.

Noyes B. E., Katz F.N., Schaffer M. H. Identification and expression of the *Drosophila* adipokinetic hormone gene. *Mol. Cell. Endocrinol* 109: 133-141, 1995.

O'Shea M., Witten J., Schaffer M. Isolation and characterization of two myoactive neuropeptides: further evidence of an invertebrate peptide family. *J. Neurosci.* 4: 521-529, 1984.

Obr. 19: Připojení signální molekuly k receptoru spřaženým s G proteinem prostřednictvím fosfolipázy C na povrchu cytoplazmatické membrány buňky.

Obr. 20: Shrnutí signalizace přes receptory spřažené s G-proteinem. Ahern K. a Rajagopal I. G-protein coupled receptors (GPCRS). LibreTexts™ Biology: 1-7, 2019.

Orchard I. Adipokinetic hormones-an update. *J. Insect Physiol.* 33:451-463, 1987.

Park Y., Kim Y. J., Adams M. E. Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRX amide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 11423-11428, 2002.

Patel H., Orchard I., Veenstra J. A., Lange A. B. The distribution and physiological effects of three evolutionarily and sequence-related neuropeptides in *Rhodnius prolixus*: adipokinetic hormone, corazonin and adipokinetic hormone/corazonin-related peptide. *Gen. Comp. Endocrinol.* 195: 1-8, 2014.

Pflüger H. J. Neuromodulation during motor development and behavior. *Curr Opin Neurobiol* 9: 683-689, 1999.

Roeder T. Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu Rev Entomol* 50: 447-477, 2005.

Roller L., Yamanaka N., Watanabe K., Daubnerova I., Zitnan D., Kataoka H., Tanaka Y. The unique evolution of neuropeptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38: 1147-1157, 2008.

Rubio R., Berne R.M., Bockman E.L., Curnish R.R. Relationship between adenosine concentration and oxygen supply in rat brain. *Am. J. Physiol.* 228:1896-1902, 1975.

Sajwan S., Sidorov R., Staskova T., Zaloudikova A., Takasu Y., Kodrik D., Zurovec M. Targeted mutagenesis and functional analysis of adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 61:79-86, 2015.



Scarborough R.M., Jamieson G. C., Kalish F., Kramer S.J., McEnroe G. A., Miller C.A., Schooley D. A. Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the *corpora cardiaca* of *Periplaneta americana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 5575-5579, 1984.

Secher T., Lenz C., Cazzamali G., Sørensen G., Williamson M., Hansen G. N., Svane P., Grimmelikhuijzen C. J. P. Molecular cloning of a functional allatostatin gut/brain receptor and an allatostatin preprohormone from the silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 276: 47052-47060, 2001.

Schaffer M. H., Noyes B. E., Slaughter C. A., Thorne G. C. Gaskell S. J. The fruitfly *Drosophila melanogaster* contains a novel charged adipokinetic-hormone-family peptide. *Biochem. J.* 269: 315-320, 1990.

Schoofs L., Veelaert D., Broeck J. V., De Loof A. Peptides in the Locusts, *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. *Peptides* 18: 145-156, 1997.

Schooneveld H., Romberg-Privee H. M., Veenstra J. A. Adipokinetic hormone-immunoreactive peptide in the endocrine and central nervous system of several insect species: a comparative immunocytochemical approach. *Gen Comp. Endocrinol.* 57: 184-194, 1985.

Schooneveld H., Romberg-Privee H. M., Veenstra J. A. Immunocytochemical differentiation between adipokinetic hormone (AKH)-like peptides in neurons and glandular cells in the *corpus cardiacum* of *Locusta migratoria* and *Periplaneta americana* with C-terminal and N-terminal specific antisera to AKH. *Cell Tissue Res.* 243: 9-14, 1986.

Siegert K.J., Kellner R., Gäde G. A third active AKH is present in the pyrgomorphid grasshoppers *Phymateus morbillosus* and *Dictyophorus spumans*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30: 1061-1067, 2000.

Socha R., Kodrik D., Zemek R. Adipokinetic hormone stimulates insect locomotor activity. *Naturwissenschaften* 88:85-86, 1999.

Staubli F., Jorgensen TJ, Cazzamali G., Williamson M., Lenz C., Sondergaard L., Roepstorff P., Grimmelikhuijzen C.J. Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 3446-3451., 2002.

Staubli F., Jørgensen T.J.D., Cazzamali G., Williamson M., Lenz C., Søndergaard L., Roepstorff P., Grimmlikhuijzen C. J.P. Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 3446-3451, 2002.

Stone J. V., Mordue W., Batley K.E., Morris H.R. Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature* 263: 207-211, 1976.

Storey K.B. Adventures in oxygen metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 139:359-369, 2004.

Van Kesteren R. E., Smit A. B., De Lange R. P., Kits K. S., Van Golen F. A., Van der Schors R. C., De With N. D., Burke J. F., Geraerts W. P. M. Structural and functional evolution of the vasopressin/oxytocin superfamily: vasopressin-related conopressin is the only member present in Lymnaea, and is involved in the control of sexual behavior. *J. Neurosci.* 15: 5989-5998, 1995.

Van Kesteren R.E., Tensen C. P., Smit A. B., Van Minnen J., Kolakowski L. F., Meyerhof W., Richter D., Van Heerikhuizen H., Vreugdenhil E., Geraerts W. P. M. Co-evolution of ligand-receptor pairs in the vasopressin/oxytocin superfamily of bioactive peptides. *J. Biol. Chem.* 271: 3619-3626, 1996.

Večeřa J., Krishnan N., Alquicer G., Kodrík D., Socha R. Adipokinetic hormone-induced enhancement of antioxidant capacity of *Pyrhocoris apterus* hemolymph in response to oxidative stress. *Comp. Biochem. Phys. C* 146: 336-342, 2007.

Večeřa J., Krishnan N., Mithöfer A., Vogele H., Kodrík D. Adipokinetic hormone-induced antioxidant response in *Spodoptera littoralis*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 155: 389-395, 2012.

Velki M., Kodrík D., Vecera J., Hackenberger B.K., Socha R. Oxidative stress elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172: 77-84, 2011.

Vroemen S. F., Van Marrewijk W.J., Van der Horst D.J. Stimulation of glycogenolysis by three locust adipokinetic hormones involves Gs and cAMP. *Mol. Cell. Endocrinol.* 107: 165-171, 1995.

Vroemen S.F. Van der Horst D.J., Van Marrewijk W.J. New insights into adipokinetic hormone signaling. *Mol. Cell. Endocrinol.* 141:7-12, 1998.

Wicher D., Walther C., Penzlin H. Neurohormone D induces ionic current changes in cockroach central neurones. *J Comp Physiol [A]* 174: 507-515, 1994.

Wicher, D., Agricola, H. J. Sohler, S., Gundel, M., Heinemann, S.H. Wollweber, L., Stengl M., Derst C., Differential receptor activation by cockroach adipokinetic hormones produces differential effects on ion currents, neuronal activity, and locomotion. *J. Neurophysiol.* 95: 2314-2325, 2006.

Yamanaka N., Yamamoto S., Zitnan D., Watanabe K., Kawada T., Satake H., Kaneko Y., Hiruma K., Tanaka Y., Shinoda T., Kataoka H. Neuropeptide receptor transcriptome reveals unidentified neuroendocrine pathways. *PLoS One* 3: e3048, 2008.

Zhou Y. J., Fukumura K., Nagata S. Effects of adipokinetic hormone and its related peptide on maintaining hemolymph carbohydrate and lipid levels in the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 82: 274-284, 2018.

Zhu C., Huang H., Hua R., Li G., Yang D., Luo J., Zhang C., Shi L., Benovic J. L., Zhou N. Molecular and functional characterization of adipokinetic hormone receptor and its peptide ligands in *Bombyx mori*. *FEBS Lett.* 583: 1463-1468, 2009.

Ziegler R., Isoe J., Moore W., Riehle M. A., Wells M. A. The putative AKH receptor of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and its expression. *Journal of Insect Science* 11: 1-20, 2011.

## 8 Příloha

### Does the interaction of hCRY2 and hMUPP1 with Calmodulin depend on the presence of Calcium?

Final report from the Erasmus+ traineeship

**Bc. Štěpánka Tomková**

Erasmus+ trainee

Faculty of Science, University of South Bohemia in České Budějovice

The Czech Republic

**Supervisor: Gabriella Margherita Mazzotta, Ph.D.**

Department of Biology, the laboratory of Neurogenetics and Chronobiology

University of Padova, Italy

Annotation:

The project from the Erasmus+ traineeship was focused on the question whether an interaction between two proteins, namely *Homo sapiens* cryptochrome circadian regulator 2 (hCRY2) and human Multiple PDZ domain protein (hMUPP1) with Calmodulin (CaM) was dependent on calcium. The task was based on the recently published novel Ca<sup>2+</sup> dependent interaction between *Drosophila* cryptochrome (dCRY) and CaM where it was identified and characterized a CaM binding motif in the dCRY N terminus (Mazzotta et al., 2018). Calmodulin pull down assay showed clearly that hCRY2 binds CaM in a Ca<sup>2+</sup> independent manner. Nevertheless, interaction hMUPP1 with CaM did not implied evident calcium binding.

## 8.1 Introduction

The main aim of my traineeship was to demonstrate whether the interaction between two proteins, namely *Homo sapiens* cryptochrome circadian regulator 2 (hCRY2) and human Multiple PDZ domain protein (hMUPP1) with Calmodulin (CaM) was dependent on calcium. This work is based on the recently published novel Ca<sup>2+</sup> dependent interaction between *Drosophila* cryptochrome (dCRY) and CaM where the authors were able to identify and characterize a CaM binding motif in the dCRY N terminus (Mazzotta et al., 2018). Similarly, they also detailed the CaM binding site of the scaffold protein Inactivation No Afterpotential D (INAD) and demonstrated that CaM bridges dCRY and INAD to form a ternary complex *in vivo*. They suggested a process whereby a rapid dCRY light response stimulates an interaction with INAD, which can be further associated with a novel mechanism regulated by CaM (Mazzotta et al., 2018).

Cryptochromes (CRYs) belong to a class of flavoproteins that detect blue light response. In animals, CRYs are expressed in the eyes and in the clock neurons that control cycles of sleeping and waking included in circadian rhythmicity (Schlichting et al., 2018). Two major groups of CRYs were found in animals, based on both their phylogenetic position and function in the regulation of circadian clocks (Yuan et al., 2007). *Drosophila*-like type 1 CRYs, which have been found only in insects, are sensitive to blue light and function mainly as circadian photoreceptors. On the other hand, vertebrate like type 2 CRYs, which are found in both vertebrates and insects, are thought to function mainly as negative regulators of the transcriptional feedback loop in a light-independent manner (Griffin et al., 1999). In contrast, hCRY2 has the molecular capability to function in a light-dependent magnetoreception system, either as a light-sensitive magnetosensor or as a part of the magnetosensing pathway. However, it is not yet known whether this capability is translated into a downstream biological response in the human retina (Foley et al., 2011). Both Human proteins hCRY1 and hCRY2 that belong in the photolyase/blue-light photoreceptor family were presumed to function as photoreceptors because they lacked DNA repair activity (Hsu et al., 1996). hCRY2 is expressed more than hCRY1 in the adult retina, especially in the ganglion cells responsible for circadian entrainment and pupillary responses (Tresher et al., 1998; Thompson et al., 2003). Nevertheless, many studies report that melanopsin in the retinal ganglion cells is the major mammalian circadian

photopigment (Hattar et al., 2002; Panda et al., 2002; Ruby et al., 2002; Lucas et al., 2003; Peirson and Foster, 2006). Similarly, mammalian CRYs could stabilize the phototransduction complex at the membrane of retinal cells. Since melanopsin ganglion cells have an insect-like rhabdomeric phototransduction cascade including Gq/11-class G proteins and Phospholipase C (Graham et al., 2008). The hypothesis is reinforced by finding that hCRY2 is able to interact with human actin-beta (hActin-Beta; reported to be one of the two non-muscle cytoskeletal actins; RefSeq, NCBI Reference Sequence Database) in a light-independent manner. Therefore, a role of hCRY2 is rather in stabilizing the signalplex components at the rhabdomeres (Schlichting et al., 2018).

Indeed, INAD, a five PDZ containing protein, is used frequently as a model system for the role of scaffolds in signal transduction of microvilli in *Drosophila's* photoreceptor cells (Huber, 2001) The central scaffold in the assembly signalling complex, signalplex is INAD and together with the three target proteins namely TRP (Transient Receptor Potential), PLC (Phospholipase C) and PKC (Protein Kinase C) form the core of the complex (Montell, 2012) Loss of INAD results in instability of these three proteins and disrupts their localization in the rhabdomeres (Tsunoda et al., 1997). Similarly, INAD is able to form homodimers to increasing the ability of the complex to simultaneously link multiple targets (Xu et al., 1998). The specific interaction has been shown between dCRY C-terminus and the INAD region containing the PDZ2-PDZ3 tandem (Mazzotta et al., 2013). Therefore, *Drosophila* cryptochrome as the circadian photoreceptor relates to the visual transduction complex, where it regulates visual responses.

The intracellular signaling machinery is often organized around scaffolding proteins localized at the plasma membrane, and multiple PDZ proteins bind to the various constituent of the transduction pathway, bringing them into proximity and precisely defined stoichiometry, ultimately ensuring a rapid and specific signal transduction (Manjunath et al., 2018). Thus, the question was whether also mammalian CRYs can act through a PDZ scaffolding/CaM mediated signaling pathway. By search on public databases the sequence of MUPP1 was retrieved as mammal scaffolding protein homologous to INAD (unpublished results). A pairwise alignment was performed to find which PDZ domains

of hMUPP1 showed the highest sequence similarity with PDZ2-3 domains of INAD. Indeed, hCRY2 presents functional binding sites for both CaM and MUPP1 (unpublished results), the unique mammalian multi-PDZ scaffolding protein with a key role

in several processes, including the organization of neural synapses and the regulation on synaptic plasticity (Lynn et al., 2012; Won Hee Jang et al., 2014).

Human Multiple PDZ domain protein (hMUPP1), is a large ubiquitously expressed scaffolding protein, which is composed of 13 homologous PDZ domains. Initially, hMUPP was identified as a protein that interacts with the C-terminus of the serotonin (5-HT<sub>2C</sub>) receptor (Ullmer et al., 1998). It has been shown that hMUPP1 binds to the G protein-coupled MT<sub>1</sub> melatonin receptor and directly regulates its G<sub>i</sub>-dependent signal transduction (Guillaume et al., 2008). Likewise, it was described a Ca<sup>2+</sup> sensitive protein complex involved in the regulation of  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor synaptic plasticity. The complex is comprised of MUPP1, a synaptic GTPase-activating protein (SynGAP) and the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase (CaMKII). The synaptic N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) complex of hippocampal neurons, SynGAP and CaMKII are coupled via direct binding to PDZ domains of the multi-PDZ domain protein MUPP1. CaMKII only binds MUPP1 in its Ca<sup>2+</sup> free state (Krapivinsky et al., 2004).

Several aspects of the visual response in both vertebrates and invertebrates are regulated by a Ca<sup>2+</sup>/CaM dependent signalling mechanism. CaM is a ubiquitous sensor protein of 148 amino acids containing two domains connected by a flexible linker and is extremely conserved from yeast to human. Calmodulin is shaped like a dumbbell, but with a flexible joint in its middle (Meador et al., 1992, 1993). The EF hands of calmodulin have distinct affinities for Ca<sup>2+</sup>, and their binding affinities are often increased by interaction with target proteins (Clapham, 2007). Binding of Ca<sup>2+</sup> is associated with large conformational changes in each CaM domain. In many cases, both domains wrap around the target, compacting the structure into a globular shape. CaM interaction regulates the activity of Ca<sup>2+</sup>/CaM dependent kinase II (CaMKII), which is abundant in fly retina and involved in the negative regulation of visual responses (Lu et al., 2009).

## 8.2 Methods

### 8.2.1 Construct creation for the genes hCRY2 and hMUPP1

#### 8.2.1.1 Design primers for hCRY2 and hMUPP1 in silico

Specific forward and reverse primers were designed separately for *Homo sapiens* cryptochrome circadian regulator 2 (hCRY2), transcript variant 1 (Fig. 1) and HUMAN Multiple PDZ domain protein (MUPP1), nucleotide sequence corresponding to PDZ 8 and 9 (Fig. 2). The Forward primer of hCRY2 also contained 10 bases overlapping with the cloning site of pAc 5.1/V5-His A vector, in order to allow the cloning with the InFusion system and the sequence encoding for a HA (HemaAgglutinin) tag. Reverse primer of hCRY2

was designed as a reverse complement to the gene sequence, a restriction enzyme NotI and 7 bases overlap of pAc 5.1/V5-His A vector were included (Tab. 1). Forward and reverse primers of MUPP1 were constructed with the same overlapping of the vector and restriction enzymes as well as forward and reverse hCRY2 primers. His-V5 tag was already included in the vector sequence (Tab. 1).



ATGGCGCAACTGTGGCAACGGCGCAGCTGTGGCCCCGGCGCCAGCGCCCGGCACGGACAGCGCCTCTT  
 CGGTGCACTGGTTCGCGCAAAGGGCTGCGACTCCACGACAACCCGGCGTTGCTGGCGGCCGTGCGCGGGGGC  
 CGCTGCGTGCCTGCGTTTACATTCTCGACCCGTGGTTCGCGGCCTCCTCCTCAGTCGGGATCAACCGATGG  
 AGGTTCCACTTTCAGTCTCTGGAAGATTTGGACACAAGTTTAAAGGAACTGAACTCCCGCCTGTTTGTAGTC  
 CGGGGACAGCCAGCCGACGTGTTCCCAAGGCTGTTCAAGGAATGGGGAGTGACCCGCTTGACCTTTGAATA  
 TGACTCTGAACCCTTTGGGAAAGAACGGGATGCAGCCATCATGAAGATGGCCAAGGAGGCTGGTGTGGAA  
 GTAGTGACGGAGAATTCTCATACCCTCTATGACCTGGACAGGATCATTGAGCTGAATGGGCAGAAGCCACC  
 CCTTACATAACAAGCGTTTCAGGCCATCATCAGCCGCATGGAGCTGCCAAGAAGCCAGTGGGCTTGGTGA  
 CCAGCCAGCAGATGGAGAGCTGCAGGGCCGAGATCCAGGAGAACCACGACGAGACCTACGGCGTGCCCTC  
 CCTGGAGGAGCTGGGGTTCCCCACTGAAGGACTTGGTCCAGCTGTCTGGCAGGGAGGAGAGACAGAAGCT  
 TTGGCCCGCTGGATAAGCACTTGAACCGGAAGGCCTGGGTTGCCAACTATGAGAGACCCCGAATGAACG  
 CCAACTCCCTCTGGCCAGCCCCACAGGCCTCAGCCCCTACCTGCGCTTTGGTTGTCTCTCCTGCCGCTCTT  
 CTACTACCGCCTGTGGGACCTGTATAAAAAGGTGAAGCGGAACAGCACACCTCCCTCTCCCTATTTGGGC  
 AACTCCTATGGCGAGAGTTCTTCTACACGGCAGCTACCAACAACCCAGGTTTGACCGCATGGAGGGGAAC  
 CCCATCTGCATCCAGATCCCCTGGGACCGCAATCCTGAGGCCCTGGCCAAGTGGGCTGAGGGCAAGACAGG  
 CTTCCCTTGGATTGATGCCATCATGACCAACTGAGGCAGGAGGGCTGGATCCACCACCTGGCCCGCATG  
 CCGTGGCCTGCTTCyGACCCGCGGGGACCTCTGGGTCAGCTGGGAGAGCGGGGTCCGGGTATTTGATGAG  
 CTGCTCCTGGATGCAGATTCAGCGTGAACGCAGGCAGCTGGATGTGGCTGTCTGCAGTGCTTTCTCCAG  
 CAGTTCTTCCACTGCTACTGCCCTGTGGGCTTTGGCCGTCGCACGGACCCAGTGGGGACTACATCAGGCG  
 ATACCTGCCCAAATTGAAAGCGTTCCTCTCGATACATCTATGAGCCCTGGAATGCCCCAGAGTCAATTCA  
 GAAGGCAGCCAAGTGCATCATTGGTGTGGACTACCCACGGCCCATCGTCAACCATGCCGAGACCAGCCGGC  
 TTAACATTGAACGAATGAAGCAGATTTACCAGCAGCTTTCGCGCTACCGGGGACTCTGTCTACTGGCATCT  
 GTCCCTTCTGTGTGGAAGACCTCAGTCACCCTGTGGCAGAGCCCAGCTCGAGCCAGGCTGGCAGCATGAG  
 CAGTGCAGGCCCAAGACCACTACCCAGTGGCCAGCATCCCCAAACGCAAGCTGGAAGCAGCCGAGGAA  
 CCACCTGGTGAAGAACTCAGCAAACGGGCCCGGGTGGCAGAGTTGCCAACCCAGAGCTGCCGAGCAAGG  
 ATGCCTGA

Fig. 1: Nucleotide sequence of Homo sapiens cryptochrome circadian regulator 2 (hCRY2), transcript variant 1 (NCBI Reference Sequence: NM\_021117.4).

GAAATGGGTAGTGATCACACACAGTCATCTGCAAGCAAAATCTCACAGATGTGGACAAAGAGGATGAGTTTGGTTACA  
 GCTGGAAAAATATCAGAGAGCGTTATGGAACCCTAACAGGCGAGCTGCATATGATTGAACTGGAGAAAGTCATAGTGG  
 TTTGGGCCTAAGTCTGTGGAACAAAGACCGATCCAGGATGAGTGTCTTCATAGTGGGGATTGATCCAAATGGAGCTG  
 CAGGAAAAGATGGTGCATTGCAAATTGCAGATGAGCTTCTAGAGATCAATGGTCAGATTTTATATGGAAGAAGTCATCAG  
 AATGCCTCATCAATCATTAAATGTGCCCTTCTAAAGTGAATAAATTTTATCAGAAATAAAGATGCAGTGAATCAGAT  
 GGCCGTATGCTCCTGGAATGCAGTAGAACCTTTGCCTTCTAACTCAGAAAATCTTCAAATAAAGGAGACAGAGCCAACTG  
 TTAATACTTCTGATGCAGCTGTGGACCTCAGTTCATTTAAAAATGTGCAACATCTGGAGCTTCCAAGGATCAGGGGGTT  
 TGGGTATTGCTATCAGCGAAGAAGATACACTCAGTGGAGTCATCATAAAGAGCTTAACAGAGCATGGGGTAGCAGCCAC  
 GGATGGACGACTCAAAGTCGGAGATCAGATACTGGCTGTAGATGATGAAATTGTTGTTGGTTACCCTATTGAAAAGTTTA  
 TTAGCCTTCTGAAGACAGCAAAGATGACAGTAAAACCTACCATCCATGCTGAGAATCCAGATTCCAGGCTGTTCCCTCA  
 GCAGCTGGTGCAGCCAGTGGAGAAAAAAGAACAGCTCCCAGTCTCTGATGGTCCCACAGTCTGGCTCCCCAGAACCGG  
 AGTCCATCCGAAATACAAGCAGATCATCAACACCAGCAATTTTTGCTTCTGATCCTGCAACCTGC

Fig. 2: Nucleotide sequence of HUMAN Multiple PDZ domain protein (hMUPP1), corresponding with PDZ 8 and 9 (upstream region 1329-1350).

### 8.2.1.2 Polymerase chain reaction (PCR): hCRY2, hMUPP1

Each reaction was performed using 2x master mix (In-Fusion cloning kit), specific forward and reverse primers (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific) for both genes.

Tab. 1 Primers of hCRY2 and hMUPP1.

primer name	sequence (5' to 3')	concentration (μM)
pAc_HA_hCRY2 F	bases from the vector <b>EcoRI</b> <b>HA tag</b> CAGTGTGGTGG <b>GAATTCATG</b> TACCCATACGATGT <b>TCCAGATTACGCT</b> GCGGCAACTGTGGCAACGGC	10
pAc_HA_hCRY2 R	bases from the vector <b>NotI</b> GACTCGA <b>GCGGCCGC</b> TCAGGCATCCTTGCTCGGCAG	10
pAc_hMUPP1F	bases from the vector <b>EcoRI</b> CAGTGTGGTGG <b>GAATTCATG</b> GAAATGGGTAGTGATCACACACAGTC	10
pAc_hMUPP1R	bases from the vector <b>NotI</b> GACTCGA <b>GCGGCCGC</b> AAGCAGGTTGCAGGATCAGAAG	10

The coding sequences of hCRY2 and hMUPP1 cloned in other vectors were used as template (DNA dilution approximately 20 ng/reaction). The milli-Q water was added to a final volume of 50 μl. Entire reaction is summarized in the Tab. 2.

Tab. 2: PCR reaction for hCRY2 and hMUPP1.

	μl
DNA	1
forward primer	2,5
reverse primer	2,5
2X master mix	25
milli-Q H <sub>2</sub> O	19
total volume	50

The PCR program including denaturation, annealing and elongation steps in 30 repeated cycles is shown in the Tab. 3.

Tab. 3: PCR program for hCRY2 and hMUPP1.

initialization	98°	1′
denaturation	98°	15″
annealing	58°	15″
extension/elongation	72°	30″
final elongation	72°	7′
final hold	4°	∞

### 8.2.1.3 Gel electrophoresis

PCR was visualized by gel electrophoresis. 1% agarose gel was prepared in 50 ml final volume of 1X TAE buffer (Tris base, acetic acid, EDTA). 2,5 µl EtBr (10 mg/ml) was added into dissolved and cold agarose solution. Each PCR reaction with 6x loading dye was loaded into gel including 1kb DNA ladder (Thermo scientific, Fig. 3). Agarose gel was run for 40 min, 100 V and it was visualized by the molecular imager (Bio RAD).

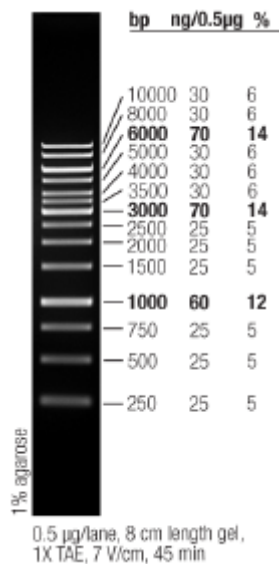


Fig. 3 DNA ladder 1 kb (Thermo scientific).

#### 8.2.1.4 DNA purification from the agarose gel

Both DNA fragments were cut from the gel and were extracted separately by Wizard SV gel and PCR clean-up system kit (Promega). Each DNA fragment was weighed in 1,5 ml microcentrifuge tube. The weights were recorded to add membrane binding solution

at ratio of 10  $\mu$ l solution per 10 mg agarose gel slice. DNA fragments were incubated at 60°C for 10 min and tubes were vortexed every few minutes. Each dissolved gel slice was transferred to the SV Minicolumn in a collection tube and it was incubated for 1 min at RT. The SV Minicolumns were centrifuged at 14000 rpm for 1min and the supernatants were discarded from the collection tube and the SV Minicolumns were returned to the tubes. The columns were washed by adding 700  $\mu$ l of Membrane wash solution and centrifuged

for 1 min at 14000 rpm. The supernatants were again discarded. The wash step was repeated with 500  $\mu$ l of Membrane wash solution and the columns were centrifuged for 5 min

at 14000 rpm. The supernatants from collection tube were discarded carefully not to wet the bottom of the column with the flowthrough and the columns were recentrifuged for 1min

to evaporate of any residual ethanol. The SV Minicolumns were transferred carefully to clean 1,5 ml microcentrifuge tubes and 100  $\mu$ l the milli-Q water was added to each minicolumns. The samples were incubated for 15 min at 50°C for better DNA elution. They were centrifuged for 1 min at 14000 rpm and the SV Minicolumns were discarded. The eluted DNA samples were stored at -20°C.

#### 8.2.1.5 DNA concentration measurement in NanoDrop

DNA concentration of hCRY2 and hMUPP1 including the purity rate was measured by NanoDrop 2000 spectrofotometer (Thermo Scientific). The spectrophotometer

was established firstly to add 1 $\mu$ l of the milli-Q water as a blank. 1 $\mu$ l of sample was used for each easurement and concentrations and purity rate were recorded (Tab. 4.)

Tab. 4 Measurement of concentration and purity rate of hCRY2 and hMUPP1.

Name of the sample	c (ng/ $\mu$ l)	260/280
--------------------	-----------------	---------

hCRY2	47,1	1,91
hMUPP1	83	1,89

### 8.2.1.6 Cloning of hCRY2 and hMUPP1 into pAc 5.1/V5-His A vector

Good cloning efficiency was achieved using 50 ng of pAc 5.1/V5-His A vector and 100-200 ng of inserts (hCRY2: 1926 bp, hMUPP1: 1096 bp) respectively. Before In-Fusion cloning reaction the vector (5375 bp) was linearized by restriction enzymes EcoR I and

Not I in MCS (received from the supervisor). Map of the pAc 5.1/V5-His A vector including MCS (Fig. 4).

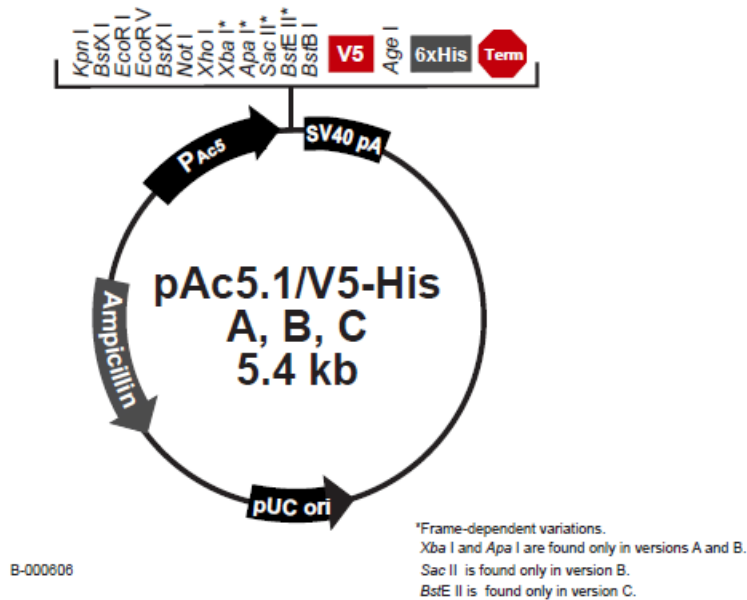


Fig. 4: The genetic map of pAc 5.1/V5-His A vector.

The In-Fusion cloning reaction also contained 5X In-Fusion HD Enzyme premix and the milli-Q water was reached to the total volume of 10  $\mu$ l (Tab. 5). The reaction was incubated for 15 min at 50°C and placed on ice immediately.

Tab. 5: In-Fusion cloning reaction

	hCRY2	hMUPP1
pAc 5.1/V5-His A vector	1,3	1,3
PCR product	1,8	0,7

5X In-Fusion HD Enzyme Premix	2	2
milli-Q H <sub>2</sub> O	4,9	6
total volume (μl)	10	10

#### 8.2.1.7 Transformation of competent cells

2 μl of In-Fusion cloning reaction were used for a transformation of Stellar competent cells. The competent cells were thawed on ice and then 50 μl of the competent cells were added into 14ml roundbottom tubes separately. After adding each In-Fusion cloning reaction to round-bottom tubes it was placed on ice for 30 min. Subsequently, the cells underwent the heat shock for exactly 45 s at the 42°C water bath and immediately they were placed on ice for 2 min. Prewarmed SOC medium at 37°C was added to bring the final volume to 500 μl for each transformation. They were incubated by shaking for 50 min at 37°C. After incubation each transformation were spread proportionally on ampicillin selective medium plates. Concentration of ampicillin (AMP) was 50 mg/ml of LB medium. The plates were incubated upside down overnight at 37°C.

#### 8.2.1.8 Isolation of minipreps

6 independent colonies for each transformation were inoculated into 4 ml of LB medium with AMP (50 mg/ml) in round-bottom tubes and they were incubated overnight at 37°C. Isolation of minipreps was performed with GenElute HP plasmid miniprep kit (Sigma-Aldrich). 3 ml of growth cultures in the microcentrifuge tubes were centrifuged gradually at 12000 x g for 1min and the supernatants were always discarded. Subsequently, the bacterial pellets were resuspended with 200 μl of the Resuspension solution containing RNase A and vortexed until homogenous solutions. Resuspended cells were lysed by adding 200 μl of the Lysis buffer and immediately the contents were mixed gently by tube inversion (6-8 times) until clear and viscous solutions. The lysis reaction was in progress no more than 5 min for protection of supercoiled plasmid DNA. The cell debris was precipitated by adding 350 μl of the Neutralization/Binding buffer, the substances were mixed gently by tube inversion (6-8 times) and they were centrifuged at 12000 x g for 10 min. In the meantime, miniprep binding columns were prepared by adding 500 μl of the Column preparation solution. They were centrifuged at 12000 x g for 1 min and

flow-through liquids were discarded. The cleared lysates were transferred to the prepared columns, they were centrifuged at 12000 x g for 1 min and the flow-through liquids were discarded. Columns were washed with 500 µl of the Wash solution 1 to lower contaminants, they were centrifuged at 12000 x g for 1 min and the flow-through liquids were discarded. Adding 750 µl of the diluted Wash solution 2 to the columns it removed residual salt. Centrifugation and liquid discards were repeated. The columns were centrifuged again to remove excess ethanol. The columns were transferred to new microcentrifuge tubes. DNA elution was performed by adding 100 µl of the milli-Q water to each column. The samples were incubated for 15 min at 50°C to improve DNA elution step. Finally, they were centrifuged at 12000 x g for 1 min and stored at -20°C. DNA concentration of each hCRY2 and hMUPP1 isolated colony was measured and the values were recorded (Tab. 6).

Tab. 6: Measurement of concentration and purity rate of each clone hCRY2 and hMUPP1.

Name of the sample	c (ng/ µl)	260/280	Name of the sample	c (ng/ µl)	260/280
pAc hCRY2_1	23,8	1,98	pAc hMUPP1_1	17,4	-
pAc hCRY2_2	21,4	1,96	pAc hMUPP1_2	18,4	1,99
pAc hCRY2_3	23,1	1,97	pAc hMUPP1_3	19,8	1,95
pAc hCRY2_4	22,9	1,99	pAc hMUPP1_4	17,8	1,99
pAc hCRY2_5	23,8	2,00	pAc hMUPP1_5	22,5	2,11
pAc hCRY2_6	21,7	2,00	pAc hMUPP1_6	20,2	1,93

#### 8.2.1.9 Sequencing of pAc 5.1/V5-His A hCRY2 and pAc 5.1/V5-His A hMUPP1 plasmids

Each pAc 5.1/V5-His A hCRY2 and pAc 5.1/V5-His A hMUPP1 isolated plasmid was sequenced by Sanger method.

#### 8.2.1.10 Isolation of midipreps

After sequencing, pAc hCRY2\_6 and pAc hMUPP1\_5 were chosen for subsequent experiments. Selected colonies were inoculated to 50 ml of LB medium with AMP (50 mg/ml) in the Erlenmeyer flasks and they were incubated overnight at 37°C. Isolation of plasmid was performed with PureLink HiPure plasmid DNA purification kit (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Firstly, the HiPure Midi Columns were equilibrated by adding 10 ml of the Equilibration buffer and the solutions in each column were drained by gravity flow. The growth cultures were removed to the falcons and centrifuged at 4000 x g for 10 min and the supernatants were removed. The bacterial pellets were resuspended with 4 ml of the Resuspension buffer included RNase. Resuspended cells were lysed by adding 4 ml of the Lysis buffer and they were mixed gently by inverting the capped tube five times. The falcons were incubated at RT for 5 min. Subsequently, the lysates were precipitated by adding 4 ml of the Precipitation buffer and immediately mixed by inverting the tubes until the mixtures were homogeneous. The falcons were centrifuged at 6000 x g for 30min. The supernatants were loaded onto the equilibrated columns and the solutions were drained by gravity flow. The columns were washed twice with 10 ml of the Wash buffer and the flow-through was discarded. A sterile 15 ml centrifuge tubes were placed under the columns, it was added 5 ml of the Elution buffer to each column and the solutions were drained by gravity flow. The purified DNA which was precipitated with 3,5 ml of isopropanol, mixed well and centrifuged at 6000 x g for 1 h at 4°C. The supernatants were discarded subsequently. For wash step it was added 3 ml of 70% of ethanol to the pellets and the tubes were centrifuged at 6000 x g for 15 min at 4°C. The supernatants were discarded, and the pellets were let air-dry for 10 min. Purified plasmid DNA was resuspended in 100 µl of the milli-Q water and stored at -20°C.

DNA concentration was measured, and the values were recorded (Tab. 7)

Tab. 7: Measurement of concentration and purity rate of the pAc hCRY2\_6 and pAc hMUPP1\_5.

Name of the sample	c (ng/ µl)	260/280
pAc hCRY2_6	556,6	1,88



pAc hMUPP1_5	288,9	1,85
--------------	-------	------

### 8.2.2 Transfection of S2R+ *Drosophila* embryonic cells with pAc 5.1/V5-His A hCRY2 and pAc 5.1/V5-His A hMUPP1

The day before transfection, the S2R+ *Drosophila* embryonic cells were counted in the Bürker chamber. For counted reaction were used 50 µl of the cells, 50 µl TRYPAN blue colour and 300 µl PBS. Subsequently, the concentration of the cell was calculated  $5,7 \times 10^6$  cells/ml.  $8 \times 10^5$  the S2R+ *Drosophila* embryonic cells were seeded per the 12-well plate in 6 ml Schneider's *Drosophila* medium (1ml medium per well, Thermo Scientific). Two wells were used for each sample of hCRY2, hMUPP1 and empty cells. The cells were incubated at 25°C overnight.

The day of transfection, 1 µg diluted DNA of hCRY2 (1,5 µl) and hMUPP1 (3,5 µl) was dissolved separately with the DNA-condensation buffer to reach a total volume of 75 µl. Subsequently, 8 µl of enhancer was added to the both samples and mixed by vortexing for 1 s. The samples were incubated at RT for 5 min then they were spinned down for few seconds

to remove drops from the top of the tubes. 25 µl of Effectene Transfection reagent (QIAGEN) were added to the DNA-enhancer mixtures and mixed by vortexing for 10 s. The samples were incubated for 10 min at RT to allow transfection-complex formation. While the complex formation took place, the old growth medium was aspirated gently from each well and 800 µl of the fresh medium was added to the cells. After incubation the growth medium (reach to volume 400 µl) was added to the tube containing the transfection complexes, mixed twice by pipetting up and down, and immediately the transfection complexes were added dropwise onto the cells in the 12-well plates. The 12-wells plate were swirled gently to ensure uniform distribution of the transfection complexes. The cells with the transfection complexes were incubated for 72 hours at 25°C.

### 8.2.3 Calmodulin pulldown assay

72 hours after transfection, the Schneider's *Drosophila* medium was removed, and the cells were washed with 1ml of PBS (Phosphate Buffered Saline). Subsequently, the cells were transferred to new tubes and centrifuged at 14000 x g for 2

min. The supernatants were removed, the pellets were resuspended with 200  $\mu$ l lysis buffer containing inhibitors (20 mM Hepes pH 7,5; 100 mM KCl; 5% glycerol; 0,5% TritonX-100;

1 mM DTT; 1X Complete Protease Inhibitor Cocktail-Roche) and incubated on ice for 40 min. The samples were centrifuged at 14000 x g for 10 min at 4°C. The supernatants were transferred to new tubes, centrifuged at 14000 x g for 3 min at 4°C and the supernatants were transferred to new tubes again. 1  $\mu$ l of lysates (hCRY2 and hMUPP1) were used for Bradford reaction (800  $\mu$ l H<sub>2</sub>O and 200  $\mu$ l Bradford) to measure protein concentration. For the blank sample was used 1  $\mu$ l lysis buffer (800  $\mu$ l H<sub>2</sub>O and 200  $\mu$ l Bradford). The Bradford reaction was incubated at RT for 5 min. In the meantime, 400  $\mu$ l

of the Calmodulin-Sepharose beads (BioVision) were centrifuged at 14000 x g for 1 min at 4°C, the supernatants were discarded carefully. The beads were washed with H<sub>2</sub>O, centrifuged again and riequilibrated in lysis buffer. Protein concentration of hCRY2 and hMUPP1 were measured at the wavelength of 595 nm in the Life science UV/Vis spectrophotometer (Beckman Coulter) and the optical density of each sample was recorded (Tab. 8).

Tab. 8: OD measurement of hCRY2 and hMUPP1.

Name of the sample	OD
hCRY2	0,080
hMUPP1	0,071

The lysates of 200  $\mu$ l hCRY2 and 100  $\mu$ l hMUPP1 were divided equally in two conditions; CaCl<sub>2</sub> or EDTA were added up to 2 mM and 5 mM concentration, respectively. The lysis buffer was added to reach the final volume of 1ml per sample. 100  $\mu$ l of beads were added to each sample and the samples were incubated at 4°C for 2 hours on a rotating wheel. The samples were centrifuged at 14000 x g for 1 min at 4°C. The supernatant (containing unbound protein) was removed carefully and the beads were washed three times using 1 ml of lysis buffer. The pellets containing bound proteins were resuspended in 100  $\mu$ l LDS (4X loading buffer, Invitrogen) and 20  $\mu$ l DTT, stored at -80°C. A scheme of CaM pulldown assay is shown in the Fig. 5.

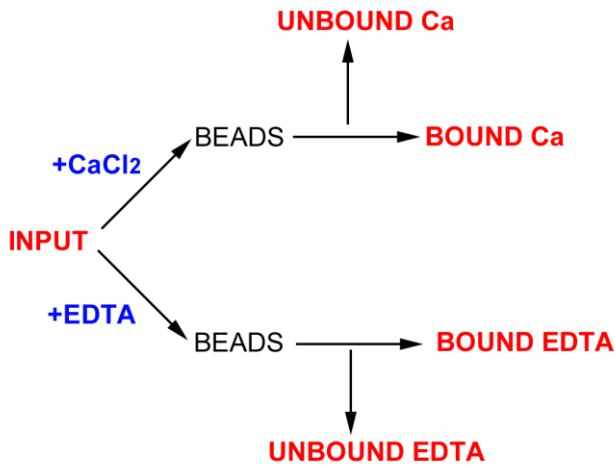


Fig. 5: The scheme of CaM pulldown assay.

#### 8.2.4 Western Blot

The CaM pulldown assay was evaluated by Western Blot. 35µl of the unbounded protein fractions were mixed with LDS and DTT in 50 µl of the total volume. 20 µl of each lysate hCRY2 and hMUPP1 were used as the input and mixed with LDS and DTT to reach final volume of 30 µl. The CaM bounded and unbounded proteins with inputs were incubated at 70°C for 10 min to allow protein denaturation. In the meantime, 1X running buffer was prepared from 20X MOPS to reach the final volume of 800 ml. The samples were analysed by SDS-PAGE on 4-12% NuPAGE Novex Bis-Tris Gels (Thermo Fisher). Before running of SDS-PAGE, 500 µl of antioxidant NuPAGE (Invitrogen by ThermoFisher Scientific) was added to SDS-PAGE gel box covered 1X running buffer. 10 µl of each lysate, 30 µl of bound and 40 µl of unbound protein samples were loaded into SDS-PAGE gel. The gel was running 2 hours approximately, 100-150 V.

In the meantime, a 1X transfer buffer was prepared by adding 12,5 ml of 20X transfer buffer, 25 ml of 10% methanol and the final volume was reached to 250 ml. An electroblotting was used to transfer proteins from the gel onto nitrocellulose membrane.

A transfer stack was prepared by adding a sponge containing 1x transfer buffer on the bottom and gradual adding to the filter paper, the gel, the nitrocellulose membrane, another filter paper. Finally, it was covered by soaked sponge with 1x transfer buffer (Fig. 6). The transfer stack was incubated for 1h at the X Cell Sure Lockbox at 30 V.

Total protein staining in the membranes was performed by adding Ponceau S red acid and washed subsequently by milli-Q H<sub>2</sub>O. Non-specific bindings in the membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in 1X TPBST (Tris Buffered Saline with 0,05% of tween; 10X TPBST: 2 M Tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl) for 1 hour at RT. The membranes were incubated with 5 ml of monoclonal anti-HA primary antibody for hCRY2 (1:2000; Sigma Aldrich, St. Louis. MO, USA) and 5 ml of monoclonal anti-His primary antibody for hMUPP1 (1:2000) overnight at 4°C. Next day, the membranes were washed three times in TBST for 10 min by shaking at 60 rpm. Subsequently, the membranes were incubated with anti-mouse IgG HRP secondary antibody (1:5000; Sigma Aldrich, St. Louis. MO, USA) for 1,5 h at RT by shaking at 80 rpm.

The membranes were washed three times in TBST for 10 min by shaking at 60 rpm.

Horseshradish peroxidase (HRP) was linked to secondary antibody to allow the detection of target proteins of hCRY2 and hMUPP1 by enhanced chemiluminescence (ECL). For ECL reaction it was added 50 µl of luminol, 22 µl of coumaric acid and 3 µl of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to 1 ml of ECL buffer (1 M Tris pH 8,5). The reaction was immediately added to the membranes, wrapped in a plastic film and incubated for 1 min at RT. Subsequently, the membranes were put into the developing box. Next steps were performed in the dark room. A photographic film was applied to the membranes in the developing box and incubated for 2 min. The film was removed to a developing buffer, time was depended on an intensity of signal, and then was placed a fixing buffer. Finally, the film was washed with H<sub>2</sub>O and allowed to dry. The film was evaluated visually to compare the bands of hCRY2 and hMUPP1 with the relevant input.



Fig. 6: The scheme of transfer stack.

## 8.3 Results

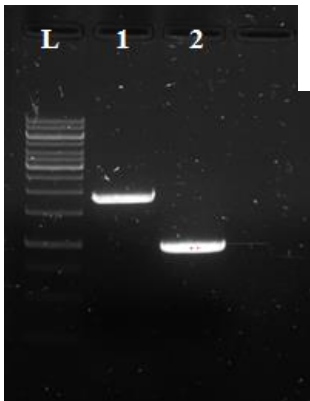
### 8.3.1 PCR of hCRY2 and hMUPP1, gel electrophoresis

PCR reactions were performed to amplify hCRY2 and hMUPP1 genes separately, using specific forward and reverse primers for each gene (Tab. 1). 5  $\mu$ l of each PCR reaction

was loaded on a 1 %

agarose gel (Fig. 7).

Fig. 7: PCR reaction of hCRY2 and hMUPP1. L – DNA ladder 1 kb (Thermo scientific). 1 – PCR product of hCRY2, band size is 1926 bp. 2 – PCR product of hMUPP1, band size is 1096 bp.



### 8.3.2 DNA purification from the agarose gel, DNA concentration measurement in NanoDrop

After having verified that the amplification had correctly occurred, the rest of the PCR product was loaded on the gel (Fig. 8). Both DNA fragments were cut from the gel under molecular imager (Bio RAD) and DNA subsequently extracted from the gel by Wizard SV gel and PCR clean-up system kit (Promega). DNA concentration and purity rate were measured using NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific) (Table IV.).

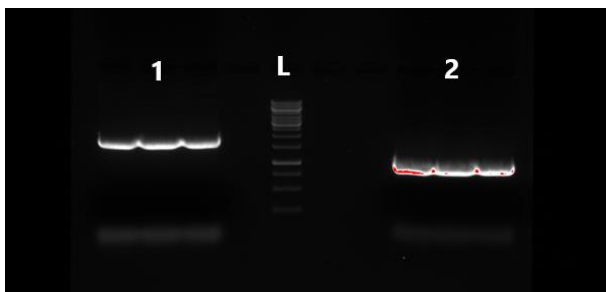


Fig. 8: PCR products of hCRY2 and hMUPP1 before gel extraction. L - DNA ladder 1 kb (Thermo scientific). 1 – PCR product of hCRY2, band size is 1926 bp. 2 – PCR product of hMUPP1, band size is 1096 bp.

### 8.3.3 In-Fusion cloning of hCRY2 and hMUPP1 to pAc 5.1/V5-His A vector, minipreps and sequencing, midipreps

The isolated PCR products with 10 and 7 bases extensions complementary to the vector were cloned as inserts into pre-linearized pAc 5.1/V5-His A vector with restriction enzymes EcoR I and Not I. Each construct was transformed into competent cells and transformant colonies were selected on ampicillin selective medium plates. 6 transformant colonies for each construct were inoculated in LB+ampicillin medium, plasmid DNA was isolated and sequenced to check for unwanted mutations. pAc\_hCRY2\_6 and pAc\_hMUPP1\_5 were isolated plasmid DNA with GenElute HP plasmid miniprep kit (Sigma-Aldrich). I measured DNA concentration of each plasmid clones and I recorded the values (Tab. 6). I verified all the plasmids by sequencing and I selected 6<sup>th</sup> clone of the hCRY2 and 5<sup>th</sup> clone of the hMUPP1. I inoculated into 50 ml of LB medium+ampicillin to isolate enough amounts of DNA using PureLink HiPure plasmid DNA purification kit for transfection of S2R+ *Drosophila* embryonic cells.

### 8.3.4 Transfection of pAc 5.1/V5-His A hCRY2 and pAc 5.1/V5-His A hMUPP1 into S2R+ *Drosophila* embryonic cells

The day before transfection, S2R+ *Drosophila* embryonic cells were seeded in the Schneider's *Drosophila* medium (Thermo Scientific) to adhere to the 12-well plate at 25°C overnight. In a first experiment the expression of the two constructs was verified. After incubation for 72 hours at 25°C, cells were lysed and analyzed by western blot (Fig. 9) Protein concentration of each lysate including control empty lysate was measured in the Life science UV/Vis spectrophotometer. Subsequently, the protein extracts were incubated at 70°C to allow protein denaturation. 40 µl of each sample including 5 µl of ladder (Prestained protein Sharpmass VI 5-245 kDa, Tris-Glycine 4-20 %, Euro Clone) were analyzed by SDS PAGE. I performed an electroblotting to transfer proteins from the gel to nitrocellulose membrane. The electroblotting was verified by total protein staining with Ponceau S red acid. Before incubation with anti-HA and anti-His monoclonal primary antibodies, non-specific bindings in the membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in TPBST. Finally, the membranes were incubated with anti-mouse IgG HRP

secondary antibody in order to allow the target protein detection of hCRY2 and hMUPP1 by enhanced chemiluminescence (ECL) in the photographic film (Fig. 9).

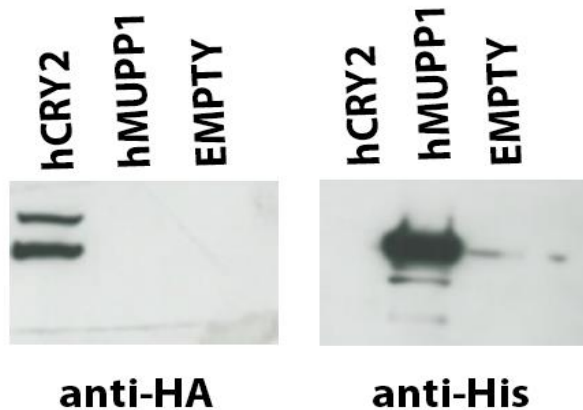


Fig. 9: Western blot evaluation of control transfection. Left part of the film: protein expression of hCRY2 detected by monoclonal anti-HA primary antibody, band sizes are 63 kDa and 75 kDa. Right part of the film: protein expression of hMUPP1 detected by monoclonal anti-His primary antibody, band size is 48 kDa.

Firstly, two protein bands, corresponding to hCRY2, with the expected size of 63 and 75 kDa were detected by monoclonal anti-HA primary antibody. With respect to hMUPP1 line wasn't detected any specific protein band. The control S2R+ *Drosophila* embryonic cells (EMPTY) didn't carry any construct and serve as a negative control. Next, the band with the expected size of 48 kDa were detected in the hMUPP1 line by monoclonal anti-His primary antibody. In relation to hCRY2 line wasn't determined any specific band. As a negative control also served empty S2R+ *Drosophila* embryonic cells.

### 8.3.5 Calmodulin pulldown assay and western blot

72 hours after transfection, proteins from hCRY2 and hMUPP1 were extracted as previously described. Each lysate was subjected to a CaM binding assay in presence of CaCl<sub>2</sub> or EDTA respectively (Fig. 5). The CaM binding was analyzed by western blot. (Fig. 10).

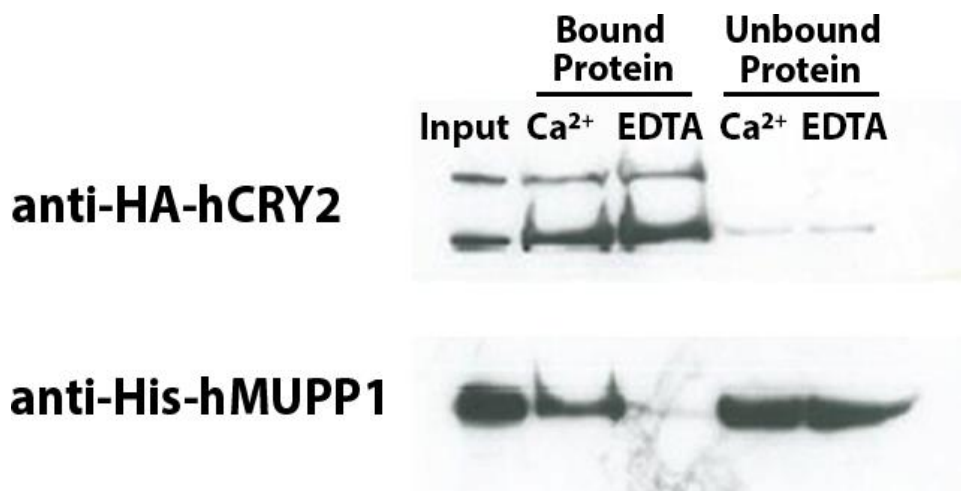


Fig. 10: Western blot evaluation of Calmodulin pulldown assay. Upper part of the film: bound and unbound proteins of hCRY2 in presence of CaCl<sub>2</sub> or EDTA respectively detected by monoclonal anti-HA primary antibody, *Drosophila* S2R+ cells overexpressing hCRY2 used as an input. Lower part of the film: bound and unbound proteins of hMUPP1 in presence of CaCl<sub>2</sub> or EDTA respectively detected by monoclonal anti-His primary antibody, *Drosophila* S2R+ cells overexpressing hMUPP1 used as an input.

Western blot evaluated specific bands corresponding to the bound protein expression of hCRY2 in the presence CaCl<sub>2</sub> and EDTA respectively. The bound protein expression including hCRY2 protein lysate (input) were detected by monoclonal HA primary antibody. Unbound protein expression of hCRY2 was detected neither in the presence of CaCl<sub>2</sub> or EDTA. That is to say, the interaction of hCRY2 with Calmodulin isn't depended on the presence of calcium.

In case of hMUPP1, specific protein bands were detected in the line of bound proteins in the presence of CaCl<sub>2</sub> and unbound proteins in presence of CaCl<sub>2</sub> or EDTA including hMUPP1 protein lysate (input) by monoclonal anti-His primary antibody. No specific band of hMUPP1 bound proteins was recorded in the presence of EDTA.

Even though the signal strength of the individual bands was very intense, the result didn't show a clear interaction between hMUPP1 and calmodulin in the presence of calcium.



## 8.4 Discussion

The main aim of my traineeship was to demonstrate whether the interaction between two proteins, hCRY2, hMUPP1 with Calmodulin (CaM) was dependent on calcium.

Firstly, both genes were amplified with design specific forward and reverse primers that added 10 and 7 bases extensions complementary to pAc 5.1/V5-His A vector. Each genetic construct containing the given inserts was transformed into competent cells. I verified all the plasmids from each transformant colonies by sequencing. The most appropriate clones were selected for subsequent transfection into S2R+ *Drosophila* embryonic cells. I previously verified control transfection by western blot. It has been shown that each overexpressing protein extract from *Drosophila* S2R+ cells were detected

by monoclonal antibodies either anti-HA for hCRY2 or anti-His for hMUPP1.

Subsequently, I performed a new transfection of both proteins that they were undergone Calmodulin pulldown assay in presence of CaCl<sub>2</sub> and EDTA respectively. The CaM binding assay again was analyzed by western blot. The result clearly shows that hCRY2 binds CaM in a Ca<sup>2+</sup> independent manner. In comparison, *vivo Drosophila* CRY experiments showed that CaM is part of the complex formed by dCRY and INAD in fly photoreceptors and this association depends on Ca<sup>2+</sup> (Mazzotta et al., 2018). In contrast, the Ca<sup>2+</sup> oscillation observed in pacemaker neurons was found to be independent from dCRY (Liang et al., 2016). However, dCRY plays different functions. For instance, in circadian clock neurons, dCRY acts as a circadian photopigment contributing to the resetting of the molecular clock by promoting light-dependent TIM degradation (Yoshii et al., 2016).

Nevertheless, interaction hMUPP1 with CaM does not indicate obvious calcium binding. With respect to forthcoming experiment, the calmodulin pulldown assay will be repeated

with a smaller volume of hMUPP1 lysate. For instance, it will be used 25 µl of the lysate instead of 100 µl.

## 8.5 References

- Clapham D. E. Calcium signaling. *Cell* 131: 1047-1058,2007.
- Fig. 6: The scheme of transfer stack. Available from <https://www.abcam.com/protocols/general-western-blot-protocol>.
- Foley L. E., Gegear R. J., Reppert S. M. Human cryptochrome exhibits light-dependent magnetosensitivity. *Nature Communications* 2: 356, 2011.
- Graham D. M., Wong K. Y., Shapiro P., Frederick C., Pattabiraman K., Berson D. M. Melanopsin ganglion cells use a membrane-associated rhabdomic phototransduction cascade. *J. Neurophysiol.* 99: 2522-2532, 2008.
- Griffin E. A. Jr., Staknis D., Weitz C. J. Light-independent role of CRY1 and CRY2 in the mammalian circadian clock. *Science* 286: 768–771, 1999.
- Guillaume J.-L., Daulat A. M., Maurice P., Levoye A., Migaud M., Brydon L., Malpoux B., Borg-Capra C., Jockers R. The PDZ protein Mupp1 promotes G<sub>i</sub> coupling and signalling of the Mt<sub>1</sub> melatonin receptor. *J. Biol. Chem* 283: 16762-16771, 2008.
- Hattar S., Liao H. W., Takao M., Berson D. M., Yau K. W. Melanopsin-containing retinal ganglion cells, architecture, projections and intrinsic photosensitivity. *Science* 295: 1065-1070, 2002.
- Hsu D. S., Zhao X., Zhao S., Kazantsev A., Wang R. P., Todo T., Wei Y. F., Sancar A. Putative human blue light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry* 35: 13871-13877,1996.
- Huber A. Scaffolding proteins organize multimolecular protein complexes for sensory signal transduction. *Eur. J. Neurosci.* 14: 769-779, 2001.
- Krapivinsky G., Medina I., Krapivinsky L., Gapon S., Clapham D. E. SynGAP-MUPP1-CaMKII Synaptic Complexes Regulate p38 MAP Kinase Activity and NMDA Receptor-Dependent Synaptic AMPA Receptor Potentiation. *Neuron* 43: 563-574, 2004.
- Liang X., Holy T. E., Taghert P. H. Synchronous *Drosophila* circadian pacemakers display nonsynchronous Ca<sup>2+</sup> rhythms in vivo. *Science* 351: 976–981, 2016.

Lu H., Leung H. T., Wang N., Pak W. L., Shieh B. H. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II in Drosophila photoreceptors. *J. Biol. Chem.* 284: 11100-11109, 2009.

Lucas R. J., Hattar S., Takao M., Berson D. M., Foster R. G., Yau K. W. Diminished Pupillary Light Reflex at High Irradiances in Melanopsin-Knockout Mice. *Science* 299: 245-247, 2003.

Lynn B.D., Li X., Nagy J.I. Under Construction: Building the Macromolecular Superstructure and Signaling Components of an Electrical Synapse. *J Membrane Biol* 245 (5-6): 303-317, 2012.

Manjunath G.P., Ramanujam P.L., Galande S. Structure function relations in PDZ-domain-containing proteins: Implications for protein networks in cellular signalling. *J Biosci.* 43(1):155-171,2018.

Mazzotta G. M., Bellanda M., Minervini G., Damulewicz M., Cusumano P., Aufiero S., Stefani M., Mammi S., Costa R., Tosatto S. C. Calmodulin enhances cryptochrome binding to INAD in Drosophila photoreceptors. *Front Mol Neurosci* 11: 280, 2018.

Mazzotta G. M., Rossi A., Leonardi E., Mason M., Bertolucci C., Caccin L., Spolaore B., Martin A. J. M., Schlichting M., Grebler R., Helfrich-Förster Ch., Mammi S., Costa R., Tosatto S. C. E. Fly cryptochrome and the visual system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110: 6163-6168, 2013.

Meador W.E., Means A.R., Quijcho, F.A. Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 Å structure of a calmodulin-peptide complex. *Science* 257: 1251–1255, 1992.

Meador, W.E., Means, A.R., and Quijcho, F.A. Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of x-ray structures. *Science* 262: 1718–1721, 1993.

Montell, C. Drosophila visual transduction. *Trends Neurosci* 35: 356-363, 2012.

Panda S., Sato T. K., Castrucci A. M., Rollag M. D., DeGrip W. J., Hogenesch J. B., Provencio I., Kay S. A. Melanopsin (Opn4) requirement for normal light-induced circadian phase shifting. *Science* 298: 2213-2216, 2002.

Peirson S. and Foster R. G. Melanopsin: another way of signalling light. *Neuron* 49: 331-339, 2006.

Ruby N. F., Brennan T. J., Xie X., Cao V., Franken P., Heller H. C., O'Hara B. F. Role of melanopsin in circadian responses to light. *Science* 298: 2211-2213, 2002.

Schlichting M., Rieger D., Cusumano P., Grebler R., Costa R., Mazzotta G. M., Helfrich-Förster C. Cryptochrome interacts with actin and enhances eye-mediated light sensitivity of the circadian clock in *Drosophila melanogaster*. *Front. Mol. Neurosci.* 11: 238, 2018.

Thompson C. L., Rickman C. B., Sbw S. J., Ebright J. N., Kelly U., Sancar A., Rickman D. W. Expression of the blue-light receptor cryptochrome in the human retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44: 4515-4521, 2003.

Thresher R. J., Vitaterna M. H., Miyamoto Y., Kazantsev A., Hsu D. S., Petit C., Selby Ch. P., Dawut L., Smithies O., Takahashi J. S., Sancar A. Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science* 282: 1490-1494, 1998.

Tsunoda S., Sierralta J., Sun Y., Bodner R., Suzuki E., Becker A., Socolich M., Zuker Ch. S. A multivalent PDZ-domain protein assembles signalling complexes in a G-protein-coupled cascade. *Nature* 388: 243-249, 1997.

Ullmer C., Schmuck K., Figge A., Lubbert H. Cloning and characterization of MUPP1, a novel PDZ domain protein. *FEBS Lett.* 424: 63-68, 1998.

Won H. J., Sun H. Ch., Joo Y. J., Jung-Hwa P., SangJin K., Dae-Hyun S. Neuronal cell-surface protein neurexin 1 interaction with multiPDZ domain protein MUPP1, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 78 (4): 644-646, 2014.

Xu X. Z., Choudhury A., Li X., Montell C. Coordination of an array of signalling proteins through homo- and heteromeric interaction between PDZ domains and target proteins. *J. Cell Biol.* 142: 545-555, 1998.

Yoshii T., Hermann-Luibl C., Helfrich-Förster C. Circadian light-input pathways in *Drosophila*. *Commun. Integr. Biol.* 9: e1102805, 2016.

Yuan Q., Metterville D., Briscoe A. D., Reppert S. M. Insect cryptochromes: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Mol. Biol. Evol.* 24: 948–955, 2007.