

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Metabolismus kryoprotektantů hmyzu:
transkriptomická analýza pomocí RT-qPCR**

Diplomová práce

Bc. Daniela Stachová

Školitel: Prof. Ing. Vladimír Košťál, CSc.

České Budějovice 2019

Diplomová práce:

Stachová Daniela (2019) : **Metabolismus kryoprotektantů hmyzu: transkriptomická analýza pomocí RT-qPCR** (Metabolism of insect cryoprotectants: RT-qPCR transcriptional analysis. Mgr. Thesis, in Czech) - 76p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Anotace:

The aim of this study was to help answering the question, on whether the larvae of *C. Costata* accumulates the trehalose metabolite. Furthermore, the aim was to measure the relative frequencies of the transcripts of the coding genes in the photoperiodically sensitive 3rd instar larvae. Moreover, we created a map of metabolism of trehalose.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

České Budějovice, prosinec 2019

.....

Bc. Daniela Stachová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli panu Prof. Ing. Vladimíru Košťálovi, CSc. za jeho velkou trpělivost, ochotu a poskytování cenných rad pro vypracování této diplomové práce.

Také děkuji ostatním kolegům Entomologického ústavu, kteří mi byli nápomocni v rámci experimentální činnosti. V neposlední řadě patří poděkování mé rodině za velkou podporu při studiu.

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled: Diapauza a chladová odolnost hmyzu	2
2.1. Diapauza.....	2
2.1.1. Pre-diapauza	3
2.1.2. Vlastní diapauza	3
2.1.3. Post-diapauza.....	5
2.2. Chladová odolnost.....	5
2.2.1. Základní strategie chladové odolnosti	6
2.2.2. Fyziologické mechanismy ochrany hmyzu při nízkých teplotách.....	10
2.3. Modelový organismus	14
3. Cíle práce	18
4. Materiál a metodika	19
4.1. Metabolomická analýza.....	19
4.2. Laboratorní aklimace larev.....	22
4.3. Měření relativní četnosti mRNA transkriptů.....	23
5. Výsledky	29
6. Diskuze	64
7. Závěr	67
8. Literatura.....	68

1. Úvod

Během života je téměř každý organismus vystaven proměnlivým podmínkám vnějšího prostředí. Přežití daného organismu závisí na jeho schopnosti přizpůsobit se těmto změnám podmínek, které se často vyskytují v denních či sezónních cyklech. Denní cykly jsou dány otáčením Země kolem své osy. Jejich hlavním faktorem je světlo a jeho intenzita, s čímž souvisí i teplota. Sezónní cykly (dány obíháním Země kolem slunce), tedy cykly střídání roční doby jsou charakteristické změnou poměru mezi světelnou a temnou částí dne (změnou fotoperiody). Řada živočichů vykazuje dokonce endogenní (vnitřně založené, na vnějších podmínkách nezávislé) roční cykly, které umožňují předvídat změnu ročního období, tedy cykly s roční periodou. Příkladem ročního cyklu je např. načasování reprodukce.

Člověk se vnějšími podmínkami prostředí částečně přizpůsobil, ale také je schopen do značné míry tyto podmínky měnit (umělé světlo a teplo). Co se týče hmyzu, ten musí své životní cykly přizpůsobovat okolí. V našich zeměpisných šířkách je jedním z největších sezónních problémů zima, což pro hmyz znamená nedostatek či absenci potravy a nutnost vyrovnat se s nízkými teplotami. Proto řada druhů hmyzu přechází do diapauzy jakožto specifické vývojové fáze. Během diapauzy je hmyz odolnější vůči chladu a mrazu, protože u něj probíhají komplexní fyziologické změny. Mezi tyto změny patří zastavení vývoje orgánů a tkání, významné zpomalení metabolismu, a celá řada dalších adaptací na biochemické a molekulární úrovni. Hmyz je tak schopen přežít i extrémní podmínky vnějšího prostředí. Jedním z hlavních biochemických aspektů diapauzy a chladové aklimace je syntéza a akumulace tzv. kryoprotektantů, což jsou látky, které chrání organismus před poškozením způsobeným chladem a mrazem.

V této práci se budu konkrétně zabývat modelovým příkladem akumulace disacharidu trehalózy u larev mušky *Chymomyza costata* z čeledi octomilkovitých (Drosophilidae) u nichž byla indukována fotoperiodická diapauza a prošly postupnou chladovou aklimací.

2. Literární přehled: Diapauza a chladová odolnost hmyzu

2.1. Diapauza

Během sezónní diapauzy se hmyz přizpůsobuje nepříznivým okolním podmínkám, přičemž efektivně využívá sezónní zdroje. Díky tomu je schopen kolonizovat sezónní, tedy mírné a polární oblasti. Během diapauzy dochází k tzv. diapauznímu vývoji, neboli fyziogenezi, což je protiklad klasické morfogeneze, která probíhá během přímého vývoje (Andrewartha, 1952). Hmyz se tedy v diapauzní fázi svého vývoje neustále dynamicky mění, ale jeho ontogenetický vývoj je pozastaven. Dynamika diapauzního vývoje se projevuje změnami reakcí na mnoho faktorů, např. teplotu, fotoperiodu, vlhkost, hormonální zásahy atd. (Lefevre and de Kort, 1989; Okuda, 1990). Je také důležité definovat přesný význam termínu diapauza a souvisejících termínů dle Lees (1955); Danks (1987) a Košťál (2006):

Dormance - obecný pojem zahrnující jakýkoli stav, kdy je zastaven vývoj. Tento stav je adaptivní (tj. ekologicky nebo evolučně významný) a obvykle doprovázený potlačením metabolismu.

Kviescence - Okamžitá přímá reakce (bez centrální regulace) na pokles či nedostatek jednoho či více omezujících environmentálních faktorů (např. teplota, voda, potrava).

Diapauza – Reakce na nepřímé signály z prostředí (nejčastěji změna fotoperiody). Dojde k centrálně (hormonálně) zprostředkovanému přerušení vývoje. U jedince nedochází dále k přímé morfogenezi, ale nastane alternativní fyziogeneze – diapauza.

Kryptobióza - souvisí s extrémní hloubkou metabolické suprese. Je definována jako „stav, kdy organismus nevykazuje žádné viditelné známky života a jeho metabolická aktivita je neměřitelná“ (Keilin, 1959; Clegg, 2001). Zástupci mnoha taxonů bezobratlých (např. někteří korýši, hlístice, hmyz) se mohou po dehydrataci, vystavení teplotám pod nulou nebo nedostatku kyslíku stát kryptobiotickými v embryonálních, larválních a / nebo i dospělých stádiích. (Clegg, 2001; Joonsson, 2001; Wright, 2001; Watanabe a kol., 2002).

Diapauza má 3 hlavní ekofyziologické fáze: Pre-diapauza (indukční a preparační fáze), vlastní diapauza (iniciační, udržovací a terminační fáze) a post-diapauza (kviescence) (Košťál, 2006).

2.1.1. Pre-diapauza

Během pre-diapauzní fáze pokračuje přímý ontogenetický vývoj, přičemž jedinec vstupuje do vlastní diapauzy až později, v závislosti na specifických environmentálních signálech a podmínkách (tzv. endogenní zastavení vývoje). Pre-diapauza se dělí na indukční a preparační fázi.

Indukční fáze: Diapauza bývá indukována dlouho před nástupem nepříznivých environmentálních podmínek. Diapauzu indukující signály organismus vnímá během přesně dané specifické senzitivní periody. Tato perioda je geneticky determinovaná a může nastávat v různých vývojových stádiích. Indukční signály upozorňují na budoucí příchod horších environmentálních podmínek. Typickým signálem je změna fotoperiody. Pokud je vzorek jedinců z jedné populace vystaven tzv. "kritické fotoperiodě" v jejich senzitivní periodě, polovina z těchto jedinců vstoupí do diapauzy a druhá polovina pokračuje v přímém vývoji. U hmyzu jsou receptory pro fotoperiodické signály lokalizovány v různých částech mozku nebo ve složených očích (Numata et al., 1997).

Jako signály mohou být využity také specifické chemikálie. Např. feromonální látky hlístic (*Nematoda*) signalizují přehuštní populace a možné vyčerpání zdrojů potravy v blízké budoucnosti. Jedinec poté zastaví svůj vývoj a přemění se na morfologicky a fyziologicky odlišný třetí larvální instar (dauer stage, diapauzní stádium). Signální dráhy umožňující tyto procesy jsou u hlístic studovány i na molekulární úrovni (Hekimi et al., 1998; Gerisch et al., 2001; Houthoofd et al., 2004; Matyash et al., 2004).

Preparační fáze od sebe časově odděluje indukční fázi a vstup do vlastní diapauzy u některých druhů hmyzu (typicky např. u druhů s tzv. maternální diapauzou). Informace o indukci diapauzy je dosud neznámým způsobem "uložena" (Denlinger, 2002), přímá ontogeneze nadále pokračuje, a ke vstupu do diapauzy dojde až v pozdějším vývojovém stádiu. Preparační fáze může být charakterizována různými behaviorálními aktivitami nebo fyziologickými procesy, jako je migrace, agregace nebo vytváření energetických rezerv před přechodem do samotné diapauzní fáze.

2.1.2. Vlastní diapauza

Během diapauzy je přímý vývoj (morfogeneze) endogenně zastaven a pokračuje alternativní fyziologický vývoj. Diapauza se dělí na 3 ekofyziologické podfáze: iniciace, udržovací fáze a terminace.

Iniciační fáze nastává v momentě, kdy je přerušena ontogenetický vývoj. V některých případech lze tento moment relativně snadno rozlišit, např. díky přechodu do specifické diapauzní fáze s charakteristickou barvou či tvarem nebo díky tvorbě kokonu (Danks, 1987). Hlavním rysem iniciační fáze je především regulovaný pokles rychlosti metabolismu (suprese metabolismu; Tauber et al., 1986). Metabolická suprese představuje komplexní proces, vyžadující změny ve fosforylaci metabolických enzymů, ve funkci biologických membrán a v genové expresi (Hochachka, 1985; Connett, 1988; Storey and Storey, 1990; Guppy et al., 1994, Brand, 1997). Ačkoliv jsou vývojové procesy blokovány, tak relativně vysoká (avšak postupně klesající) metabolická aktivita je stále ještě nutná k podpoře specifických behaviorálních a fyziologických aktivit. Volně žijící larvy a dospělí jedinci mohou dále přijímat potravu, která je přeměňována na energetické rezervy ve formě triacylglycerolů, glykogenu či hexamerických proteinů (Tauber et al., 1986; Danks, 1987). Jedinci mohou také aktivně hledat vhodný mikrohabitat, dochází tedy k migraci. Iniciační fáze vyžaduje relativně vysoké teplotní optimum (Johnsen et al., 1997).

Důležitým termínem v souvislosti s iniciací diapauzy je **intenzita diapauzy**, která je dána časovým nárokem na ukončení diapauzního vývoje (znovu-započetí viditelné morfogeneze = přímého vývoje) po přenesení diapauzního jedince do specifických terminačních podmínek prostředí (Vinogradova, 1974). Maximální intenzity diapauzy bývá dosaženo právě na konci iniciační fáze a v dalších fázích již intenzita postupně klesá buď endogenně (beze změny vnějších podmínek) anebo exogenně, tedy pod vlivem měnících se vnějších podmínek (snížení teploty, vyschnutí apod.) (Danks, 1987; Wipking, 1995; Varjas a Saringer, 1998; Nakamura a Numata, 2000).

Udržovací fáze. Po ukončení iniciační fáze diapauzy jsou často podmínky okolního prostředí stále vhodné pro to, aby jedinec dále pokračoval v přímém vývoji (relativně vysoká teplota, dostatek potravy, přítomnost reprodukčních partnerů apod.). Pokud ovšem u daného jedince byla indukována diapauza, tak je přímý vývoj i v takové situaci zastaven. Rychlost metabolismu je v této fázi relativně nízká (typicky < 10% rychlosti při přímém vývoji) a konstantní. Intenzita diapauzy obvykle postupně klesá. Hmyz obvykle zahajuje zimní diapauzu (hibernační typ), ještě když je léto, a udržuje ji během teplého konce léta a začátkem podzimu (Tauber and Tauber, 1976). Podobně i hmyz s letním a tropickým typem diapauzy zahajuje a udržuje svou diapauzu dříve, než dojde k nepříznivému období (vyschnutí nebo zaplavení; omezení zdroje potravy) (Masaki, 1980; Denlinger, 1986; Godfrey and Hassell, 1987; Wolda, 1988; Topp, 1990; Tanaka, 2000; Adis and Junk, 2002).

Udržovací fáze představuje vlastně ekologicky nejdůležitější část diapauzy, neboť zabráňuje v dalším vývoji právě tehdy, kdy jsou vnější podmínky ještě příznivé, ale pokračování ve vývoji by bylo pro populaci fatální (vývojová stádia citlivá k chladu by byla později vystavena zimním podmínkám). Přes důležitost udržovací fáze není známo téměř nic o její regulaci a jen málo o její fyziologické povaze. K postupným změnám fyziologického stavu během udržovací fáze pravděpodobně přispívají nevyhnutelné procesy, jako je postupné vyčerpání zásob energie a somatické stárnutí (Tauber and Tauber, 1976).

Terminační fáze. Terminační fáze diapauzy je období, kdy buď spontánně (beze změny vnějších podmínek), ale častěji (v přírodních podmínkách prakticky vždy) pod vlivem změny vnějších faktorů dojde k ukončení endogenní blokace vývoje = ukončení diapauzy. Např. vystavení nízkým teplotám v přírodě po dobu mnoha týdnů až několika měsíců ukončuje zimní diapauzu většinou v době vrcholící zimy - tedy zhruba během ledna (Tauber et al., 1986; Hodek, 1996, 2002). Většina letních diapauz je pak v přírodě ukončována změnou fotoperiodického signálu (zkrácením fotoperiody na konci léta). Terminace má tedy podobu zřetelné ekofyziologické fáze, která vyžaduje *dlouhé* období působení terminačního faktoru, a během níž se intenzita diapauzy sníží až na minimální úroveň, ukončí se endogenní blokace vývoje, a tím je umožněno následné rychlé obnovení přímého vývoje. Na konci terminační fáze se tedy dosáhne fyziologického stavu, ve kterém se *může* přímý vývoj rychle obnovit (potenciál pro vývoj je obnoven), ale pouze pokud to vnější podmínky dovolí (realizace potenciálu = obnovení vývoje čeká až na skutečný příchod příznivých podmínek).

2.1.3. Post-diapauza

Kviescentní fáze. Protože zimní diapauza obvykle končí (je terminována) v období vrcholící zimy, vnější podmínky nedovolí realizaci vývojového potenciálu. Dormance tedy i nadále pokračuje, ale již ve formě nízkoteplotní kviescence. Blokaci vývoje již tedy nezpůsobují endogenní, nýbrž exogenní faktory. K obnovení přímého vývoje (realizaci potenciálu) dochází až po příchodu příznivých podmínek, v případě zimní diapauzy to bývá jarní oteplení, v případě letní diapauzy se může jednat o podzimní srážky.

2.2. Chladová odolnost

V této práci se budu zabývat relativně vysokou chladovou odolností adaptovaných a aklimovaných druhů, tedy druhů, které přezimují za podnulových tělních teplot během temperátní nebo subpolární zimy. Stranou tedy nechávám všechny druhy tropické, jejichž chladová odolnost je obvykle relativně nízká. Vynechávám rovněž ty druhy hmyzu, které jsou

aktivní během temperátní zimy, a mezi které patří např. některé můry schopné letu i v nízkých zimních teplotách (Heinrich, 1993) nebo celá řada druhů které aktivně žijí v subniválním prostředí nebo v listové opadance za stálých teplot blízkých nule (Hagvar, 2010).

Jednou z důležitých fenotypických změn, jež doprovázejí vstup do zimní diapauzy (hibernace), je právě zvýšení chladové odolnosti. Toto zvýšení chladové odolnosti je způsobeno jednak přímo vstupem do diapauzy (a je tedy vázáno na iniciační fázi diapauzy), ale pro dosažení maximální odolnosti vůči chladu a mrazu je většinou potřebné ještě vystavení přímému působení nízkých teplot = **chladová aklimace** (která je tedy paralelní s terminační fází diapauzy).

2.2.1. Základní strategie chladové odolnosti

Literatura obecně rozeznává tři základní strategie chladové odolnosti hmyzu podle toho, co se stane s tělní vodou po poklesu teplot pod bod mrazu (0°C). Jsou čtyři možnosti: (1) voda zůstává v kapalném, tzv. podchlazeném skupenství (supercooling); (2) voda mrzne, neboli přechází do pevného skupenství ledových krystalů (freezing); (3) voda se odpaří (přejde do plynného skupenství) a následně se připojí k ledovým krystalkům v okolním prostředí (evaporation, dehydration); (4) malý kapalný zbytek vody po předchozím mrznutí nebo dehydrataci projde přechodem do pevného amorfního skupenství (vitrification).

Strategie podchlazení (supercooling)

Pro hmyz je typické, že není schopný vyrábět vlastní teplo, tudíž je teplota jeho těla závislá na teplotě prostředí. I když je tento odolný hmyz v chladném prostředí (několik stupňů pod 0°C), v jejich těle se neformuje led. Hrají v tom roli dva důvody. Zaprvé, látky jako ionty, cukry, aminokyseliny, proteiny a další rozpustné látky v hemolymfě snižují teplotu tání (MP, melting point) podle koligativního pravidla: o 1,86°C na 1 osmol/kg rozpuštěné látky (Zachariassen, 1985).

Zadruhé, jakmile se hmyz ochladí na teplotu nižší než je teplota tání hemolymfy, tak poté vstoupí do podchlazeného stavu, ve kterém voda v jeho těle zůstává v kapalném skupenství. Schopnost podchlazení je normální fyzikální vlastností kapalné vody. Malé objemy čisté vody podchlazují hluboko pod nulu a k homogenní nukleaci ledu dochází až při -38°C (Angell, 1982, Zachariassen, 1985). Většina druhů hmyzu se chová tak, jako by to byly malé nádoby s vodou, které jsou relativně odolné vůči spontánnímu promrznutí až do teplot kolem -20°C. Teplota, při které se nakonec vytvoří v organismu led, se nazývá bod podchlazení (SCP, supercooling point). K tomu, aby bylo dosaženo takto nízké teploty SCP, musí být předem

splněna jedna důležitá podmínka: musí být z těla odstraněny tzv. heterogenní nukleátory ledu. To jsou všechny látky, které by mohly katalyzovat přeměnu kapaliny v led. Dosud není zcela zřejmé, které látky či struktury hrají roli heterogenních nukleátorů ledu v hmyzím těle. Jedná se blíže nespecifikované částice potravy, bakteriální nukleátory přítomné v potravě, nečistoty/prach, či fosfátové krystaly v malpighických trubicích (Rozsypal, 2015).

Aby došlo ke zmrznutí, tak je potřeba nejprve shromáždit relativně velký shluk molekul vody s typickým hexagonálním uspořádáním ledu – tzv. zárodečný ledový krystal. Velikost tohoto zárodečného krystalu je závislá na teplotě, dále zde hraje roli viskozita roztoku a také bílkovinné látky typu AFPs (anti-freeze proteins) či PINs (protein ice nucleators), které budou podrobněji zmíněny dále v textu. V okamžiku, kdy zárodečný krystal překročí kritickou velikost, dojde k rychlému promrznání a do krystalové mřížky se připojují další a další molekuly vody. Během tohoto prudkého procesu dochází k uvolnění skupenského tepla mrznutí (exotermní děj), díky čemuž lze snadno změřit SCP.

Dosažení bodu podchlazení, tedy zmrznutí, je pro všechny druhy se strategií podchlazení bez výjimky letální. Proto se tato strategie alternativně nazývá také "freeze avoidance" – vyhýbání se zmrznutí. Mortalita je tedy způsobena přímo tvorbou ledových krystalů v těle. Ovšem u mnoha druhů dochází k mortalitě již za teplot výrazně vyšších, než je SCP. Poškození nízkými teplotami (před dosažením SCP) není dostatečně prostudováno. Předpokládá se, že během poklesu teploty mohou nastat fázové přechody membránových lipidů z tekuté-krytalinní do gelové fáze, která je neslučitelná se správnou funkcí membrány. Co se týče stability proteinů, tak i zde hraje významnou roli teplota: kolem 0°C dochází u většiny polymerních proteinů k depolymeraci a za teplot kolem -15°C dochází u proteinů až k chladové denaturaci nativní struktury (Privalov, 1990). Je také důležité zmínit metabolismus, který je závislý na regulované aktivitě enzymů. Pokud ovšem dojde ke snížení teploty, tak enzymatická funkce různých proteinů je různě snížena, takže může nastat metabolická nerovnováha („metabolic disorder“).

Strategie promrznutí (freezing)

Jedinci, kteří využívají tuto strategii, jsou schopni v určité míře tolerovat mrznutí tělních tekutin. Vždy jde především o to, aby se led netvořil uvnitř buněk. Intracelulární zmrznutí je v kryobiologii považováno za bez výjimky letální (Lee, 2010). Led vznikající uvnitř buněk by narušil delikátní struktury organel a cytoskeletu a, zejména, díky osmotickému "přísávání" vody dovnitř buňky během procesu mrznutí, by nevyhnutelně došlo k mechanickému prasknutí

buňky. Naproti tomu, vznik ledu v mimobuněčném prostoru je tolerován celou řadou organismů, od rostlin až k živočichům, včetně mnoha druhů hmyzu (Toxopeus a Sinclair, 2018). Když se led vytvoří vně buňky, okolní roztok se zkoncentruje (neboť pouze molekuly vody se připojují k ledovým krystalům), což vede k osmotickému "odsávání" vody směrem z cytosolu do mimobuněčných roztoků. Buňky jsou tedy vlivem extracelulárního mrznutí postupně dehydratovány a jejich objem se zmenšuje.

Většina druhů hmyzu se strategií promrznutí musí zmrznout za relativně vysokých teplot (tedy blízko pod nulou), kdy se na led nejprve přemění pouze malé množství kapalné vody. Při dalším pomalém poklesu teploty (v přírodě obvyklém) je pomalá tvorba ledu doprovázena osmotickými přesuny vody z buněk ven a zároveň kryoprotektivních molekul dovnitř buněk. Proces promrznutí je tak prodloužen a díky tomu je zde čas pro vznik osmotické rovnováhy, takže nedojde k osmotickému šoku. Jak je uvedeno výše, fyzikální vlastnosti vody – tedy její schopnost podchlazovat, přímo brání tomu, aby se led tvořil za teplot blízko pod nulou. Principem strategie promrznutí je tedy aktivně stimulovat tvorbu ledu v mimobuněčných roztocích. Toho je možno dosáhnout dvěma způsoby: (1) inokulací okolním ledem, (2) aktivitou specifických proteinových nukleátorů ledu (PINs). První způsob je triviální a spoléhá na to, že v prostředí kde hmyz přezimuje (půda, opadanka, pod kůrou či v prasklinách kůry, atd.) se velmi běžně vyskytují krystaly ledu (sníh, jinovatka, námraza, zmrzlé půdní roztoky). Tyto okolní krystaly ledu mohou poměrně snadno pronikat do těla hmyzu a způsobovat nukleaci jeho mimobuněčných roztoků jako je hemolymfa či obsah střeva (Rozsypal a Košťál, 2018). Druhý způsob bude podrobněji zmíněn dále v textu.

Ačkoli tedy mnoho druhů hmyzu toleruje tvorbu ledu v mimobuněčných roztocích, tak u většiny druhů opět nalézáme spodní teplotní limit (obvykle někde mezi -5 až -40°C), pod nímž již přežití promrzlého jedince není možné (Des Marteaux et al., 2019). Opět je velmi těžké stanovit, co přesně je příčinou smrti po dosažení této limitní nízké teploty. Krystaly ledu postupně rostoucí v mimobuněčných roztocích za snižující se teploty mohou narušit struktury extracelulární matrix, poškodit komunikační spoje či vazby mezi buňkami (vodivé spoje, adhezní a těsné spoje), popřípadě přímo mechanicky narušit cytoplazmatickou membránu. Buněčná dehydratace je patrně nejvýznamnějším limitem tolerance promrznutí (Rozsypal et al., 2018). Pokud je zvýšena koncentrace rozpuštěných látek (solutů) uvnitř buněk, tak nastávají dramatické změny v aktivitě proteinů a může dojít až k jejich denaturaci. Postupná dehydratace nevyhnutelně znamená změny pH (zvýšení aktivity protonů), iontových aktivit (zvýšení koncentrací všech iontů), snížení aktivity vody (a tím narušení četných hydrofilních interakcí),

zvýšení viskozity, snížení mobility molekul, a celkové zahuštění (crowding) makromolekul a organel (Muldrew et al., 2004). Nastává také ztráta elektrochemického potenciálu přes buněčné membrány (Kristiansen and Zachariassen, 2001). Všechny výše uvedené negativní vlivy dehydratace se sčítají a působí na jednotlivé makromolekulární komplexy – proteiny, chromatin, ribozomy, cytoskelet, membrány, apod. Všechny makromolekuly postupně ztrácí svou funkční konformaci a podléhají denaturačním vlivům (proteiny agregují, lipické dvojvrstvy membrán přecházejí do gelové či hexagonální fáze, řetězce DNA se lámou ...). Navíc těsné nahuštění organel může vést až k fúzování jejich membrán a tím ztratě funkčního uspořádání buňky.

Vzhledem k výše uvedeným drastickým vlivům mrazové dehydratace buněk je s podivem, že existuje několik málo druhů živočichů, u kterých nebyla pozorována žádná spodní prahová teplota pro přežití v promrzlém stavu (Des Marteaux et al., 2019). Mezi tyto extrémně odolné druhy, které přežijí i za teploty kapalného dusíku, patří právě modelový druh této práce, *Chymomyza costata* (Košťál et al., 2011; Rozsypal et al., 2018).

Strategie dehydratace

Tato strategie byla poprvé popsána u přezimujících kokonů žížal (Holmstrup & Westh, 1994). Později byla zjištěna u chvostoskoků (Clark et al., 2009) a nyní je považována za velmi rozšířenou u drobného půdního edafonu (Sorensen and Holmstrup, 2011). Pro tyto organismy je typické, že mají malé tělo a jejich tělní povrch je vysoce propustný pro vodu. Princip strategie je následující: po vzniku ledu v půdních prostorech je parciální tlak vodní páry nad ledem nižší oproti tlaku vodní páry nad osmoticky aktivní podchlazenou vodou, vyskytující se v kapalném stavu v organismu. Díky vysoké propustnosti kutikuly se tělní voda rychle odpaří a je připojena k ledovým krystalkům v okolí. Díky tomu je organismus rychle dehydratován, jeho tělní roztoky jsou zahuštěny a nedojde tudíž k promrznutí.

Druhy spoléhající na tuto strategii jsou tedy sice zbaveny nutnosti udržovat homeostázu buněk za velmi nízkých teplot (tak, jako to musejí dělat podchlazující druhy), či vyrovnat se s následky ledové krystalizace (tak, jako to musejí dělat promrzající druhy), ale zato musí přežít někdy téměř úplnou ztrátu vody (anhydrobiotický stav). Tím se vlastně strategie dehydratace velmi podobá strategii promrznutí.

Strategie vitrifikace

Nejedná se vlastně o samostatnou strategii, jako spíš o možnost dalšího fázového přechodu vody po předchozí dehydrataci, ať už vlivem promrznutí nebo ztrátou vody po

evaporaci. Ztráta vody a zahuštění roztoků vedou k jejich vyšší náchylnosti k tzv. skelnému fázovému přechodu. Jde o termodynamický přechod z kapalné do pevné fáze, ovšem *bez* krystalizace a *bez* uvolnění tepla. Vytváří se amorfní pevná fáze (biologické sklo s mechanickými vlastnostmi podobnými spíše gumě). Makromolekuly, organely a další struktury jsou tak jakoby "zachyceny" ve svých původních konformacích a na svých původních místech – obklopeny a chráněny amorfní strukturou biologického skla. Vitifikace byla u hmyzu přímo pozorována pouze ve dvou případech: u dehydratované larvy arktického brouka (Sformo et al., 2010) a dále u promrzlé larvy *C. costata* (Koštal et al., 2011; Rozsypal et al., 2018).

Strategie vitifikace je rovněž široce využívána při praktické kryokonzervaci. Tímto způsobem jsou mikroorganismy, rostlinné tkáně, některé savčí buňky, nebo některá hmyzí embrya skladovány v kapalném dusíku (Fuller et al., 2004).

2.2.2. Fyziologické mechanismy ochrany hmyzu při nízkých teplotách

Ochranu hmyzu při nízkých teplotách je důležité chápat jako složitý adaptivní komplex, na kterém se podílí celá řada jednotlivých fyziologických změn, jež souvisejí jednak se vstupem do diapauzy a dále s chladovou aklimací. V dalším textu postupně zmíním základní mechanismy související s chladovou odolností hmyzu.

Synchronizace sezónního cyklu s vývojovým cyklem

Druhy hmyzu, které jsou schopné silně zvyšovat úroveň chladové odolnosti v průběhu roku obvykle mají celý svůj životní cyklus synchronizovaný v rámci sezónního průběhu klimatu – neboli mají schopnost vstupovat do sezónní diapauzy – viz kapitola 2.1 (Denlinger, 1991; Hodková & Hodek, 1997). Vstup do diapauzy spolu s metabolickou supresí znamená jisté zvýšení chladové odolnosti, ale maximální chladovou odolnost lze dosáhnout až s následnou chladovou aklimací. Možnost jít do chladové aklimace je typická hlavně pro jedince, kteří se již předtím dostali do dormance (především diapauzního typu) (Šlachta et al., 2002a, b; Denlinger, 1991).

Voda a iontová homeostáza

Pro jedince, kteří jsou schopni přežít v podchlazeném stavu, je typické, že jsou plně hydratováni. Tito jedinci se musí chránit před ztrátou vody. Kvůli tomu jsou pro diapauzu a chladovou aklimaci podchlazujících druhů typické změny kutikulárních lipidů a obecně zesílení kutikuly jakožto bariéry proti ztrátám vody a snad také průniku ledu (Hadley, 1994). Ztráta vody během respirace je omezena metabolickou supresí typickou pro diapauzu, dále supresí

vyvolanou nízkými teplotami, příp. někdy i diskontinuálním dýcháním (Chown a Davis, 2003). Také může nastat situace, kdy dojde ke zvýšení podílu tzv. vázané vody oproti tzv. volné vodě. Tato situace je způsobena akumulací polymerů, konkrétně glykogenu a zásobních bílkovin, a dále akumulací nízkomolekulárních kryoprotektantů, vyskytujících se v tělních tekutinách. Voda „vázaná“ v hydratačních obalech zmíněných struktur pak není dostupná pro krystalizaci ledu (Block, 2002). Pro hydratovaný stav je důležitá určitá metabolická aktivita a s tím související elektrochemické potenciály na membránách a epitelech. Jedinci, kteří přežívají v podchlazeném stavu, musí stále udržovat elektrochemické potenciály. Naproti tomu jedinci, kteří přežívají v promrzlém stavu, tyto potenciály rychle ztrácejí a musí je tedy umět rychle obnovit následně po rozmrznutí ledu.

Metabolismus a jeho suprese

Chladová aklimace je vždy doprovázena metabolickou supresí jako důsledek zpomalení enzymatické kinetiky přísně závislé na teplotě. Někdy je však tato suprese ještě vyšší než očekávaná podle pravidla Q_{10} (Hochachka 1986). To se děje díky úplnému zablokování některých procesů (místo pouhého snížení jejich rychlosti). I během hluboké metabolické suprese je ovšem nutné, aby procesy, které generují a spotřebovávají energii ve formě ATP, byly v rovnováze. Jedná se především o regulaci během produkce ATP (glykolýza a oxidativní fosforylace). Hlavní roli v této regulaci hrají kaskády enzymů (kinázy a fosfatázy), hormony a modulátory. Také se zde uplatňuje vliv nižší transkripce genů kódujících klíčové energetické enzymy jakožto důsledek vstupu do diapauzy. Některé specifické metabolické dráhy ovšem zůstávají stále aktivní i přesto, že je celkový metabolismus utlumen. Tyto dráhy jsou totiž důležité pro biosyntézu nízkomolekulárních kryoprotektantů. Komplex enzymů nutných pro tuto biosyntézu je ale často modifikován, a někdy dokonce stimulován, nízkými teplotami u jedinců v diapauze (Košťál et al, 2004a).

Přestavba biologických membrán

Vstupem do diapauzy a následně během působení nízkých teplot dochází v membránách ke změnám ve složení fosfolipidů a díky tomu dojde u membrán k chladové aklimaci (Cossins, 1994). Charakteristickými změnami jsou především tyto: desaturace mastných kyselin (vyšší zastoupení nenasycených mastných kyselin ve fosfolipidech); zkrácení řetězců mastných kyselin; vyšší zastoupení etanolaminu oproti cholinu v molekulách fosfolipidů. Všechny tyto změny ovlivňují "tekutost" (fluiditu) membrány a teploty fázových přechodů membrány. Udržuje se optimální fluidita pro funkci membránových proteinů a brání se neregulovaným

přechodům do gelové nebo hexagonální fáze membrány (Košťál, 2010). Aklimované membrány jsou potom stále schopné plnit svoji funkci a také je zabráněno poškození dehydratací spojenou s promrzáním (Hazel, 1997).

Chaperoniny a antioxidanty

Tyto dva systémy jsou aktivní ve většině stresových situací. Jejich aktivita vzrůstá také během vstupu do diapauzy a dále po chladové aklimaci a to jak u podchlazujících (Rinehart, 2000) tak i u promrzajících druhů hmyzu (Des Marteaux et al., 2019). Chaperoniny (především proteiny typu "heat shock proteins") jsou schopny navázat se na jiné proteiny, které byly poškozeny chladem či mrazem (nízkou teplotou či dehydratací) a částečně denaturovány. Po navázání je doprovázejí ("chaperoning") buď k opravě nebo k degradaci v proteasomovém systému. Antioxidanty pomáhají inaktivovat reaktivní částice kyslíku, které se mohou hromadit při změnách teploty či hydratace a mohly by ohrožovat struktury makromolekul jako je DNA, proteiny či nenasycené lipidy v membránách.

Makromolekulární (proteinové) kryoprotektanty

Obecně se jedná o specifické látky, které hmyz akumuluje před zimní sezónou, a které nějakým způsobem ovlivňují fázové chování vody při snižující se teplotě (viz kapitola 2.2.1). Buď inhibují nebo naopak stimulují tvorbu ledových krystalů:

AFPs („anti-freeze-proteins“) jsou schopné adsorpce na vznikající zárodečný krystal ledu a potlačení jeho růstu (brání připojování dalších molekul vody). Tím je krystalizace *inhibována*, oddálena o přibližně -2 až -8 °C a takto je relativně stabilizován termodynamicky nestabilní stav podchlazení. Aktivita AFPs byla zjištěna také u některých druhů hmyzu spoléhajících se na strategii promrznutí. Funkce AFPs u těchto druhů spočívá pravděpodobně v zabránění rekrystalizace (splývání menších ledových krystalů a tvorba větších) (Duman, 2001).

Princip funkce kryoprotektivních PINs („protein-ice-nucleators“) spočívá v katalýze krystalizace vody. PINs tvoří vhodný povrch, na kterém se molekuly vody orientují do krystalové ledové mřížky (Zachariassen & Kristiansen, 2000) a krystaly ledu se tak tvoří za relativně vysoké teploty (blízko nule). Aktivita PINs tímto způsobem zamezuje nežádoucímu podchlazení (které je normální fyzikální vlastností vodných roztoků) a *stimuluje* se tak mrznutí.

Nízkomolekulární kryoprotektanty

Mezi kryoprotektanty hmyzu patří hlavně cukry, zejména glukóza, fruktóza a trehalóza a dále od nich odvozené polyoly (glycerol, ribitol, sorbitol, myoinositol a další) (Storey a Storey, 1991). Mezi látky s kryoprotektivními funkcemi dále patří také volné aminokyseliny, např. prolin, glutamin, alanin a další (Košťál et al., 2011, 2012). Cukerné látky jsou většinou syntetizovány ze zásobního glykogenu v běžných reakcích glykolýzy a pentózového cyklu. Glycerol může rovněž vznikat při odbourávání zásobních triglyceridů (Storey a Storey, 1991). Aminokyseliny mohou vznikat při odbourávání peptidických řetězců a v následných transaminačních přeměnách.

Látky, které se uplatňují jako hmyzí kryoprotektanty běžně nacházíme i u mnoha jiných organismů, kde se hromadí v souvislosti s jinými stresovými faktory z prostředí než je pouze vliv nízké teploty. Například při dehydrataci (období sucha), změnách osmotických podmínek (zasolení, přesun ze slané do sladké vody), zvýšení teploty (přehřátí), oxidativním stresu (působení nadměrného množství volných radikálů) anebo dokonce během změny hydrostatického tlaku (adaptace pro život v hlubokém oceánu) (Yancey et al., 1982). Tyto látky mají totiž obecně cyto-protektivní vlastnosti. Jsou velmi dobře rozpustné ve vodě a naopak nevytvářejí příliš silné interakce s proteiny a jinými makromolekulami a tím pádem mají relativně nízkou toxicitu i za vysokých koncentrací. Možnost akumulovat tyto látky ve vysokých koncentracích je předurčuje do role osmoprotektantů – tedy látek, které jsou využívány pro balancování osmotických tlaků vznikajících při ztrátě vody z organismu (sucho, zasolení, mrznutí) nebo naopak při vniknutí většího množství vody dovnitř organismu (rehydratace, přesun ze slané do sladké vody, rozmrznutí). Nás ovšem zajímají tyto látky především v souvislosti s chladem (nízkou teplotou) a mrazem (krystalizací vody a následnou mrazovou dehydratací buněk).

Relativně nízké koncentrace kryoprotektantů nacházíme u aktivních vývojových stádií hmyzu a u nediapauzních jedinců. Zde tyto látky mají své běžné metabolické role. Trehalóza je například obvyklým zásobním cukrem v hmyzí hemolymfě (Reyes-DelaTorre, 2012), glycerol je základním stavebním kamenem metabolismu lipidů, aminokyseliny jsou stavebními kameny bílkovin. Některé látky mohou mít i další specifické funkce. Například metabolismus prolinu (tzv., prolinový cyklus) generuje volné elektrony, které mají signalizační funkce v regulacích proliferace buněk a buněčné smrti (Phang, 2015). Prolin i trehalóza mohou být antioxidanty (Reyes-DelaTorre, 2012). Nízkomolekulární kryoprotektanty se často začínají akumulovat dlouho před příchodem zimy, již díky sezónní změně vývojového programu, tedy při vstupu do

diapauzy. Někdy ovšem je při vstupu do diapauzy pouze pozměněn enzymatický aparát tak, aby byl později připraven reagovat na chlad. Během chladové aklimace, zejména poté, co je dosažen specifický teplotní práh (obvykle pod +5°C), pak dochází k prudké biosyntéze a akumulaci kryoprotektantů (Storey a Storey, 1991).

Kryoprotektivní funkce jednotlivých kryoprotektantů se liší podle toho, kterou strategii chladové odolnosti (viz kapitola 2.2.1) ten který druh či jedinec hmyzu volí. Podchlazující druhy využívají akumulace kryoprotektantů k oddálení mrznutí. Čím vyšší je koncentrace nahromaděných kryoprotektantů, tím nižší je SCP (koligativní zákon). Byly pozorovány koncentrace dosahující až molárních řádů: 5M glycerol u vosičky *Bracon cephi* (Salt, 1961), 3M etylenglykol u lýkožrouta *Ips acuminatus* (Gehrken, 1984). Při takto vysokých koncentracích jsou tělní tekutiny velmi viskózní, mobilita molekul vody je silně omezená a mrznutí je téměř vyloučeno i za teplot velmi hluboko pod bodem mrazu (Lee, 2010). Promrzající druhy nemají zájem zvyšovat kapacitu pro podchlazení, přesto však velmi často akumulují kryoprotektanty. U těchto druhů převažuje stabilizační role kryoprotektantů, které účinně chrání funkční (nativní) konformaci proteinů a biologických membrán – například brání denaturaci proteinů vlivem chladu a zejména vlivem mrazové dehydratace (Bolen and Baskakov, 2001). Kromě toho nahromaděné kryoprotektanty zvyšují osmolaritu roztoku, tím omezují množství vytvořeného ledu, a tím také snižují úroveň mrazové dehydratace buněk. Za dané teploty je množství ledu vytvořeného v roztoku bez kryoprotektantu vždy vyšší než v roztoku s kryoprotektantem (Meryman, 1971). Po silném zahuštění roztoku (ať už vlivem vysoké akumulace, mrznutí nebo dehydratace) mohou kryoprotektanty stimulovat přechod nezmrzlého zbytku roztoku do amorfni fáze biologického skla (Rudolph and Crowe, 1986).

Trehalóza má navíc jednu specifickou roli při silné dehydrataci buněk. Molekuly trehalózy se velmi dobře svým tvarem a velikostí hodí k tomu, aby zastoupily mizející molekuly vody z hydratačních obalů fosfolipidických dvojvrstev neboli membrán. Tím je zabráněno kolapsu dehydratované membrány do hexagonální fáze a zároveň jsou tak dvě oddělené membrány chráněny před vzájemným fúzováním při nahuštění organel (Crowe, 2007).

2.3. Modelový organismus

Modelovým druhem této práce je muška *Chymomyza costata* patřící do třídy Hmyz (Insecta), řád Dvouřídli (Diptera), čeleď Octomilkovití (Drosophilidae). Tato muška je relativně blízkou příbuznou octomilky *Drosophila melanogaster*, což je jeden z nejznámějších a nejvíce prozkoumaných modelových organismů současné biologie. Pro naši práci není ovšem *D.*

melanogaster vhodným cílovým objektem (slouží především jako srovnávací systém), jelikož se vyvinula v tropickém pásmu, není tak odolná vůči chladu a má nízkou schopnost chladové aklimace (Košťál et al., 2011 PLoS). Naproti tomu, *C. costata* se vyskytuje v oblastech chladnějšího mírného pásu až po subpolární oblasti. Dospělé mušky jsou aktivní především na jaře a v létě, kdy vystřídají zhruba 2-4 generace. V laboratoři, kde je teplota 18°C, potřebuje jedna generace pro celý svůj vývojový cyklus přibližně jeden měsíc. Larvy *C. costata* žijí pravděpodobně pod kůrou padlých stromů (ve skutečnosti nebyly larvy tohoto druhu dosud v přírodě pozorovány, ale larvy ostatních druhů rodu *Chymomyza* byly nalezeny právě pod kůrou padlých stromů). Larvy se živí tlejícím lýkem a pod kůrou padlých stromů také patrně přezimují. Jejich mikrohabitat je tedy obvykle vlhký až mokrý, což má zásadní důsledky pro strategii chladové odolnosti.

Přezimujícím stádiem u *C. costata* je larva třetího instaru s ukončeným žírem a ve své finální velikosti (někdy také nazývaná jako stadium prepupy – předkukly). Tyto larvy vstupují koncem léta do diapauzy pod vlivem krátkého dne a snižující se teploty. Kritická fotoperioda je 14 h světlo : 10 hodin tma (Košťál et al., 2016). Fotoperiodický signál je vnímán patrně pomocí neuronální sítě biologických hodin a je dále transformován na změnu hormonálního prostředí. Nesyntetizuje se základní vývojový hormon ekdyzon, neboli svlékací hormon, (Stehlík et al., 2008; Poupardin et al., 2015). Diapauzní larva se tedy nevyvíjí, její imaginální terčky nerostou a buňky v nich nediferencují (Košťál et al., 2009). Diapauzní larva nepřijímá potravu, nehýbe se a má tudíž pomalý metabolismus, který není zaměřen primárně na výrobu energie a podporu rychlého růstu (jako u aktivní larvy) nýbrž na udržování základní homeostázy buněk, orgánů a celého organismu. Zásadní změna životního stylu (aktivita → diapauza) je podmíněna hlubokou změnou genové transkripce týkající se většiny metabolických i regulačních drah (Košťál et al., 2017).

Diapauzní larvy na podzim procházejí chladovou aklimací. Postupné snižování teploty vede k další sérii transkripčních a biochemických změn (Košťál et al., 2017). Metabolická rychlost je nízkou teplotou silně snižena, ale dokud jsou tělní tekutiny v kapalném stavu, larva musí udržovat základní homeostázu buněk, tedy například udržovat stálou bilanci ATP/ADP+AMP, stálý i když relativně nízký obrat proteinů, a stálý elektrochemický potenciál na membránách (Košťál et al., 2004). Jednou z významných fenotypických změn spojených se vstupem do diapauzy a s chladovou aklimací je zvýšení chladové odolnosti. Přezimující larvy mají poměrně nízký bod podchlazení. Průměrná hodnota SCP je -16,5°C u aktivních larev a -21,5°C u diapauzních larev (Košťál et al., 2011). Diapauzní larvy mohou přežít v silně

podchlazeném stavu až do teploty SCP, ale následné promrznutí za teploty SCP je pro ně bez výjimky letální (Enomoto, 1981). Na první pohled by se tedy zdálo, že hlavní strategií larev je **podchlazování**. Ovšem je třeba si uvědomit, že mikrohabitat přezimujících larev je vlhký až mokrá, tedy silně náchylný k vytváření ledových krystalů za podnulových teplot. Tyto okolní ledové krystaly velmi snadno pronikají přes kutikulu hmyzu a inokulují ledem jeho tělní tekutiny – hemolymfu a střevní obsah (Rozsypal et al., 2018 JEB; Rozsypal and Košťál, 2019 JIP). Larvy *C. costata* jsou tedy velmi náchylné k inokulaci ledem a pokud promrznou za teplot již nehluboko pod nulou (okolo -2°C) a pokud se teplota snižuje velmi pomalu (pomaleji než $0,1^{\circ}\text{C} / \text{min}$), pak zmrznutí přežijí (Shimada, 1988). V přírodě larvy tedy volí spíše strategii **promrznutí** po inokulaci okolním ledem. Všechna volná voda postupně promrzne po dosažení teploty kolem -10°C . Tehdy je 67,9% veškeré tělní vody přeměněno na led (Rozsypal et al., 2018 JEB). Zbytek vody (vázaná voda) je nekovalentně vázán vodíkovými můstky na různé nabitě částice (anorganické ionty, metabolity, makromolekuly) a je relativně nedostupný pro mrznutí. Všechny led se tvoří v extracelulárním prostoru (Košťál et al., 2011). Protože velká část kapalně vody se přeměnila v led, zbylý roztok se silně zahustil a osmoticky odsál vodu zevnitř buněk – došlo tedy k mrazové dehydrataci buněk. Jestliže teplota dále klesá pod -10°C , množství ledu se již dále nezvyšuje, ale zbylý nepromrzlý, silně hustý roztok může projít dalším fázovým přechodem – **vitřifikací**, neboli "zasklením". To se odehraje v rozmezí teplot -20°C až -30°C (Rozsypal et al., 2018). Po zasklení se larva stává extrémně odolnou vůči mrazu. Je možné ponořit ji do kapalného dusíku (-196°C), opět ji rozmrazit a larva přežije, dokáže se zakuklit a přeměnit se na plně plodného dospělce (Košťál et al., 2011). Larvy *C. costata* jsou tak jedním z mála organismů, jež dokáží přežít v kapalném dusíku bez předchozího vysušení (anhydrobióza) a je určitě nejsložitějším a zároveň nejlépe prostudovaným modelovým organismem extrémní tolerance k promrznutí (Košťál et al., 2011; Rozsypal et al., 2018; Des Marteaux et al., 2019).

Klíčovou adaptací larev *C. costata*, jež umožňuje jejich extrémní toleranci k promrznutí, je schopnost akumulovat nízkomolekulární kryoprotektanty. Schopnost akumulace je vyvinuta pouze u diapauzních larev (nikoli u aktivních) a je vázána na proces chladové aklimace (Košťál et al., 2011; Rozsypal et al., 2018). Larvy akumulují zejména prolin (max. 313 mmol/kg tělní vody), dále trehalózu (max. 108 mmol/kg tělní vody); glutamin (max. 55 mmol/kg tělní vody); asparagin (max. 28 mmol/kg tělní vody), a betain glycinu (max. 10 mmol/kg tělní vody) (všechna data pocházejí z dosud nepublikované metabolické studie: Moos and Košťál, nepublikovaná data). Kromě toho se silně mění koncentrace mnoha dalších látek, ale jejich

hladiny zůstávají na sub-milimolárních hodnotách a tudíž je jejich kryoprotektivní vliv nepravděpodobný. Všechny kryoprotektanty byly nalezeny nejen v hemolymfě ale prakticky ve všech orgánech diapauzních a chladově aklimovaných larev (Moos and Košťál, nepublikovaná data). Umělé zvýšení hladin prolinu a dalších kryoprotektantů v těle aktivních larev *C. costata* dramaticky zvýšilo jejich chladovou odolnost a také navodilo schopnost přežít v kapalném dusíku (Košťál et al., 2011). Jednoduchá metoda krmení larev na dietě obohacené prolinem, či jiným kryoprotektantem, se dokonce osvědčila i pro markantní zvýšení chladové odolnosti u larev tropické octomilky *D. melanogaster* (Košťál et al., 2012; Košťál et al., 2016). Přirozeně se vyskytující kryoprotektanty, jako je prolin, se tak jeví jako možná náhrada za syntetické a relativně silně toxické kryoprotektivní látky, jako jsou dimetyl sulfoxid a etylén glykol, které jsou běžně dosud využívány v kryobiologické praxi pro zamrazování zvířecího i lidského spermatu, vajíček, dalších buněk, tkáňových štěpů a v budoucnu snad i celých orgánů (Zhang et al., 2016). Další studium kryoprotektantů u *C. costata* může tedy přispět nejen k rozšíření poznání, ale může mít i velmi praktické důsledky. Cílem této práce je právě rozšířit znalosti o metabolismu kryoprotektantů u *C. costata*.

3. Cíle práce

Hlavní cíle práce jsou tyto:

3.1. Prakticky zvládnout komplexní metodiku analýzy relativní četnosti vybraných genových transkriptů.

Tato metodika je široce využívána jako základní analytický nástroj v mnoha zdravotnických, veterinárních, environmentálních a policejních laboratořích.

3.2. Stanovit relativní četnost vybraných genových transkriptů *C. costata*, jež kódují klíčové enzymy a transportní proteiny související s metabolismem trehalózy.

Trehalóza je jedním z potenciálních kryoprotektantů *C. costata*, který se hromadí po vstupu do diapauzy a následné chladové aklimaci. Změna relativní četnosti transkriptů by mohla napomoci odhalit metabolické dráhy, které se aktivizují v souvislosti s fenotypickou proměnou larvy – se zvýšením její chladové odolnosti a dosažením schopnosti přežít v kapalném dusíku.

3.3. Porovnat výsledné změny v transkriptómu se známými změnami v metabolómu (Moos and Košťál, nepublikovaná data).

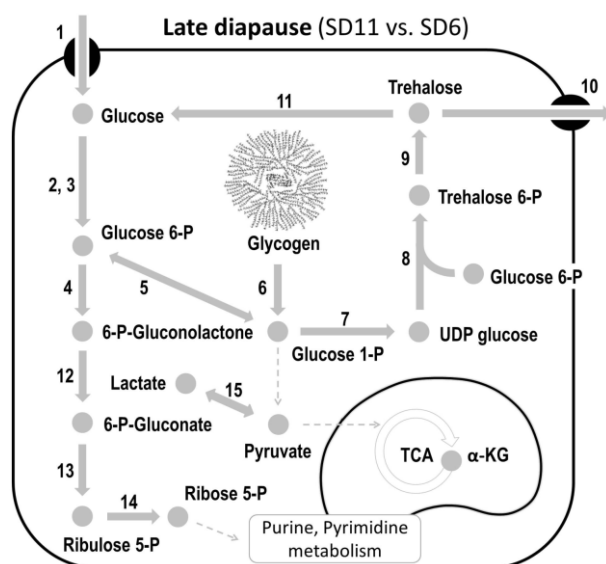
Finálním výstupem bude mapa metabolismu trehalózy, která bude názorně ukazovat aklimační změny v transkripci genů a zároveň akumulaci metabolitů (trehalózy).

4. Materiál a metodika

4.1. Metabolomická analýza

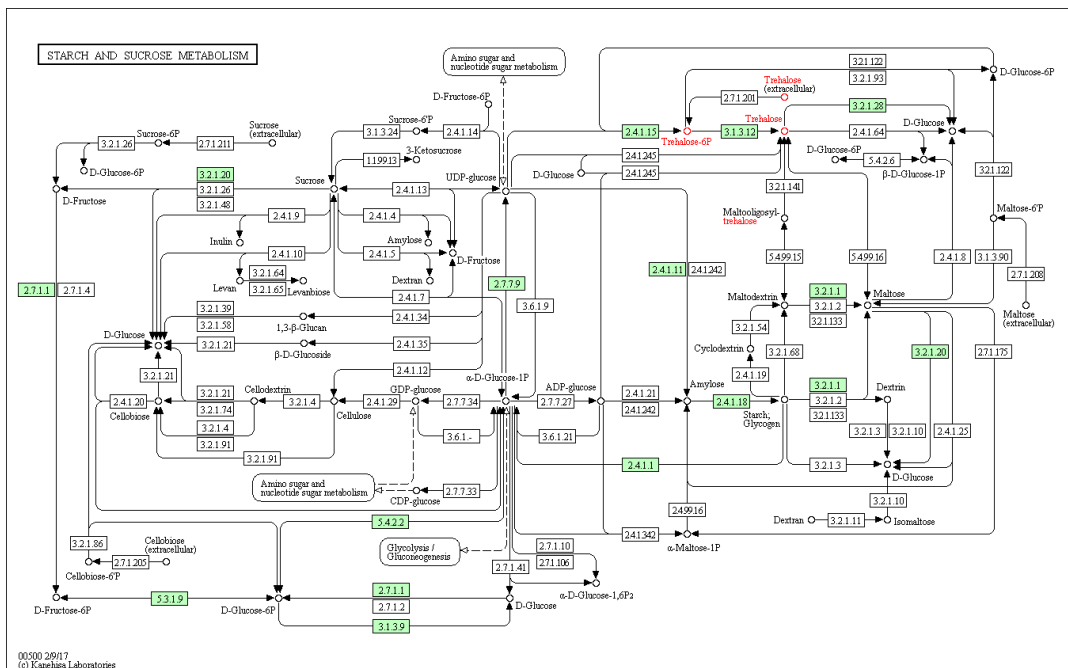
Metabolomická analýza nebyla přímo předmětem této bakalářské práce, ale byla provedena v laboratoři školitele na vzorcích larev odebíraných paralelně se vzorky odebíranými pro analýzu genové exprese. Jednalo se o necílenou analýzu několika tisíc neidentifikovaných látek (komponent) pomocí kombinace kapalinové chromatografie na koloně hydrofilních interakcí (HILIC) a hmotnostní spektrometrie (ESI-MS) (Moos and Košťál, nepublikovaná data). Následně byla provedena statistická analýza získaných dat a ty komponenty, jejichž vysoké koncentrace silně korelovaly s extrémní tolerancí promrznutí (aklimační varianta SDA) byly identifikovány. V souladu s předchozími znalostmi získanými z cílených metabolomických analýz (Košťál et al., 2011; Štětina et al., 2018; Rozsypal et al., 2018) bylo potvrzeno, že dominantními metabolity spojenými s SDA variantou jsou: prolin, glutamin, asparagin a trehalóza. Necílená analýza odhalila několik dalších látek, jež by mohly být součástí kryoprotektivního "koktejlu" *C. costata* (např. betain glycinu, prolyl-prolin, glycerofosfocholin ad.).

Školitelem mi byla zadána jedna z látek z kryoprotektivního koktejlu – trehalóza. Zjednodušená metabolická mapa trehalózy je uvedena na Obr. 1.



Obr. 1: Zjednodušená metabolická mapa trehalózy.

Tato zjednodušená mapa vychází z komplexní mapy uvedené v KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Obr. 2).



Obr. 2: KEGG Schéma metabolismu trehalózy. Zeleně jsou vyznačeny lokusy, které jsou známy u *Drosophila melanogaster*. Červeně je vyznačena pozice trehalózy.

Na metabolickém schématu je celkem 14 látek, jejichž relativní koncentrace (plochy chromatografických peaků) byly porovnány u jednotlivých aklimačních variant larev. Výsledek je uveden v diagramatické tabulce (Tab. I). Hodnoty ploch peaků jsou provnány pomocí třibarevné škály (heatmapa, funkce Excel), kde červená pole označují maximální hodnotu, modrá pole značí minimální hodnotu, a bílá pole jsou blízko střední hodnoty (50% percentil).

Tab. I: Relativní koncentrace u jednotlivých aklimačních variant larev.

		formatted as a whole matrix:				
		třibarevná škála				
		percentil: 50				
metabolites:		LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
LC/GC peak area	Glucose	1781037	1791878	1781776	1827434	3965852
	Glucose 6-P	1,94E+08	1,81E+08	1,48E+08	1,7E+08	1,3E+08
	Glucose 1-P	1,63E+08	1,26E+08	1,04E+08	1,44E+08	1,41E+08
	UDP glucose	10678629	9388782	24481073	45907766	37516861
	Trehalose 6-P	2890848	1305259	1243055	1168871	2107592
	Trehalose	1,43E+09	1,43E+09	1,56E+09	1,55E+09	3,44E+09
	Pyruvate	16659669	18205586	14322999	20214371	8674646
	Lactate	97779975	94910207	43237193	44009448	25771554
	alpha-Ketoglutarate	5,04E+08	5,61E+08	5,11E+08	4,71E+08	2,95E+08
	Gluconolactone-6-P	589800	773205,8	734397,3	754204,5	894035,5
	Gluconate-6-P	1547420	1194743	1976903	6970487	10104516
	Ribulose-5-P	2081899	1462603	681447,8	1337908	824415,5
	Ribose-5-P	2999107	2630051	2246560	2877908	3572142
	Ribose	20690088	25734257	66785985	20367808	21633516

Heatmapa jasně naznačuje, že dominantním metabolitem je trehalóza, jejíž koncentrace systematicky roste s přechodem larev do diapauzy (LD3 → SD3) a dále zejména s chladovou aklimací diapauzních larev (SD6 → SD10). Naproti tomu koncentrace trehalózy zůstává téměř beze změny při pouhém udržování diapauzy za relativně vysoké teploty (SD3 → SD6 → SD10).

Metabolická mapa (Obr. 1) zároveň ukazuje enzymatické a transportní dráhy (šipky). U každé šipky je číslo (1 – 15), které kóduje zodpovědný enzym či transportní systém. Ve spolupráci se školitelem jsem pro každý enzym či transport (1 – 15) našla kódující gen (CG...) u *Drosophila melanogaster* pomocí databází KEGG a FlyBase. Následně jsme pomocí nástroje Blast (Geneious) našli ke každému genu *D. melanogaster* nejlépe odpovídající sekvenci z transkriptomické databáze *C. costata* (Seq... nebo comp...) (Poupardin et al., 2015). Na této sekvenci *C. costata* jsme poté našli vhodný pár oligonukleotidových primerů (funkce Geneious) pro RT-qPCR. Primery byly voleny tak, aby produkovaly relativně krátký amplicon (max. 200 párů bazí), a to uvnitř kódující sekvence genu, ale zároveň v té části sekvence, která není příliš konzervativní (která kóduje katalytické místo či obvyklý DNA motiv, který se může vyskytovat v mnoha různých genech). Jinými slovy, snažili jsme se primery umístit na unikátní část sekvence. Zároveň jsme volili primery s relativně vysokou teplotou tání ($T_m \approx 61^\circ\text{C}$), tak, aby byla zajištěna vysoká specifita PCR reakce. Seznam všech sekvencí *Drosophily*, *Chymomyzy* a také sekvence příslušných primerů jsou uvedeny v Tabulce II.

Tab. II: Sekvence *Drosophily*, *Chymomyzy* a sekvence příslušných primerů.

No.	Drosophila gen name, CG	Chymomyza Seq ID	Forward primer	Reverse primer
TARGET genes				
1	Glucose transporter 1, CG43946	Seq17	Cc Glut F1 GTTGGCTCCGCCACTGATTA	Cc Glut R1 AGTTCATGAACAGCCGAGTG
2	Hexokinase A, CG3001	Seq2286	Cc HexA F1 TGTGCTGAATACGGCTGGTC	Cc HexA R1 GCTTAGACCCAGCTCTCCA
3	Hexokinase C, CG8094	Seq83173	Cc HexC F1 GGAACGTGTGGAGTGGTAG	Cc HexC R1 GTGGCAAAAAGTCCAGCTG
4	Zwischenferment, Glucose-6-P dehydrogenase, CG12529	comp36235	Cc Zw F1 ACACAGGGTCTGGTGGTTA	Cc Zw R1 GGTTTCTCCATGGCCACGAG
5	Phosphoglucose isomerase, CG8251	Seq93285	Cc Pgi F1 CCGGTGACAGTTGATGGACG	Cc Pgi R1 GCGCATACTCCAGAGAGGA
6	Glycogen phosphorylase, CG7254	comp33345	Cc GlyP F1 ACTGCACGTCACCTTGCAAA	Cc GlyP R1 TGATGCGCTTGTCCATCC
7	UTP-glucose-2-phosphate uridylyltransferase, CG4347	comp33503	Cc UGP F1 ATGTCACTTTCGGACGTGGC	Cc UGP R1 GCGCATGTTCGGACACTA
8	Trehalose-6-P synthase 1, N/terminus, synthase activity, CG4104	Seq83280	Cc Tps F2 GGTTCTGTTAGCGCCGTCTG	Cc Tps R2 CCAAGTGTATGCCAGGCCAG
9	Trehalose-6-P synthase 1, C-terminus, phosphatase activity, CG4104	Seq83280	Cc TPS F1 ATGGTGGAAAAGCCGCTAG	Cc TPS R1 TTGATGCGCTGTCCAGTC
10	Trehalose transporter 1-1, CG30035	Seq356	Cc Treh F1 CCGGGCACTTTGGGTCTATT	Cc Treh R1 GCAACGCCCTACCCAAAAG
11	Trehalase, CG9364	Seq56437	Cc Treh F1 ACCTACGGACTGGAAGGAGC	Cc Treh R1 GTGACGCCCCATTGCTTTA
12	Gluconolactone hydrolase, CG17333	Seq56302	Cc GLH F1 CGCCACAGAAAGCATAACT	Cc GLH R1 GCAACTGAGATCCGACTCC
13	Gluconate dehydrogenase, CG3724	comp35923	Cc Pgd F1 GTTCTCTTGGCAGCTCAC	Cc Pgd R1 CCGCCAGTGTGCTAATTT
14	Phosphopentose isomerase, CG30410	comp42273	Cc Rpi F1 GGGAAACAGAGCCATTGGAG	Cc Rpi R1 AAAAGATCGCTGCTGGG
15	Lactate dehydrogenase, CG10160	Seq80328	Cc LDH F1 CGTCAAAAAGGAGGGCGAGTC	Cc LDH R1 ATCGGGGCTGTATCCACCA
REFERENCE genes				
	Rpl11, CG7726	Seq79097	Cc Rpl11 F1 GCTACACTGTGGCTCTTT	Cc Rpl11 R1 TCAACTGTTATCGGCCACC
	Rpl19, CG2746	comp25181	Cc Rpl19 F2 CGCGCTTGTCTTGAACAGG	Cc Rpl19 R2 CGTCACTGCGGATTCGGAAA
	Rpl32, CG7939	comp14494	Cc Rpl32 F1 ATGCCAAGCTGTCCGACA	Cc Rpl32 R1 GAAGCAAGTGGGGAGCAT
	Rp511, CG8857	Seq79068	Cc Rp511 F1 GTGAAAACCCGATCACCAC	Cc Rp511 R1 GCGTCAATGCGGTTCAGAA
	Rp527A, CG5271	Seq58622	Cc Rp527A F1 TGGTGCACCTCTATCCGACT	Cc Rp527A R1 TCTTGTCTTTCGGACCA

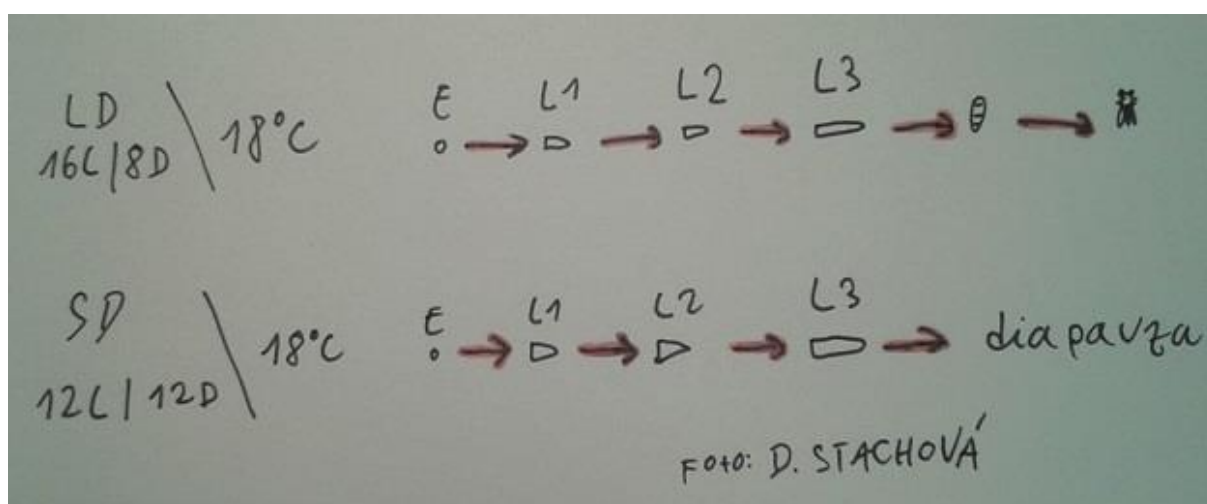
Až potud jsem postupovala ve své práci pod přímým dohledem školitele a následující kroky (od odebírání vzorků aklimovaných larev) jsem již provedla sama.

4.2. Laboratorní aklimace larev

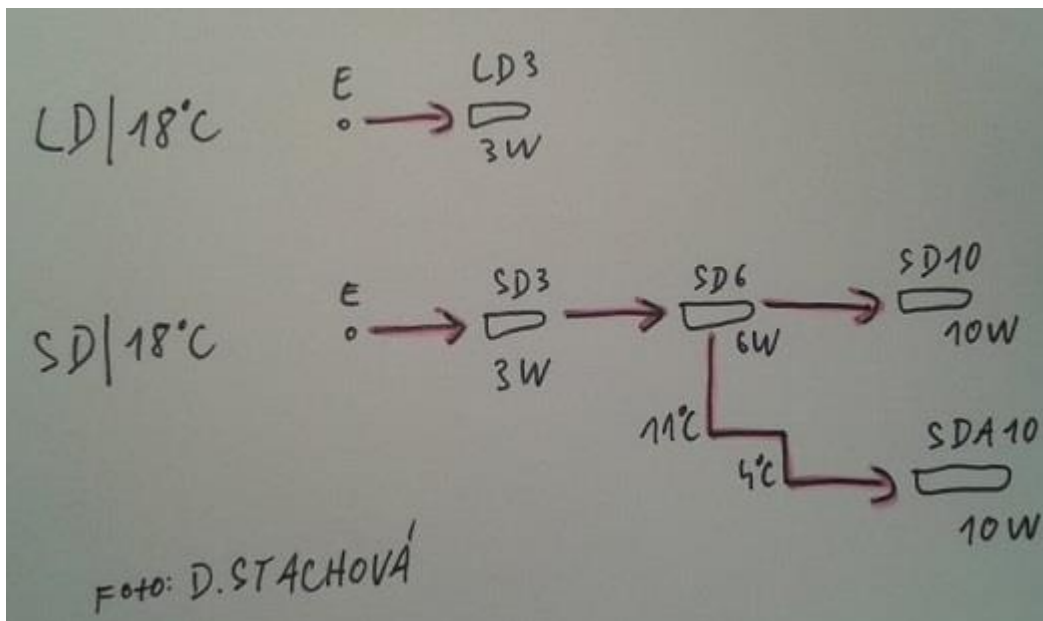
Pro experimenty jsme použili larvy *C. costata*, divoký kmen Sapporo, který byl získán v roce 1983 blízko Sappora, Hokkaido v Japonsku. Mušky jsou od té doby chovány z původních jedinců na Entomologickém ústavu AV ČR v Českých Budějovicích. Pro tento experiment byli dospělci uchovávaní v 250 ml sklenicích a larvy v 50 ml zkumavkách. Jedinci dostávali potravu ve formě umělé diety, kterou tvořil agar, kukuřičný šrot, ječný slad a sušené kvasinky. Na kousek jablka kladly mušky svá vajíčka. Tyto kousky jablka se po naklazení vajíček přenesly do nové zkumavky obsahující diety, díky čemuž nastal larvální vývoj. Aklimace larev probíhala v inkubátorech Sanyo MIR 154, teplota byla 18°C. Chov byl kontinuální během dlouhého dne – LD 16L/8D (obr.), což znamená 16 hodin světla a 8 hodin tmy; a během krátkého dne - SD 12L/12D (obr.), kdy jsou larvy vystaveny 12 hodin světlu a 12 hodin tmě (larvy jsou schopny reakce na temnou fázi dne). Dále byly použity chladově aklimované larvy (SDA) z krátkého dne při 4°C (obr.). Diapauza je primárně indukovaná krátkým dnem. Pro chladovou aklimaci je zásadní snížení teploty na 11°C, poté na 4 °C.

Je důležité rozlišit:

- a) Larvy nediapauzní: LD3
- b) Larvy diapauzní: SD3, SD6, SD10
- c) Larvy diapauzní, chladem aklimované: SDA10



Obr. 3: Larvální vývoj během dlouhého dne (LD 16L/8D) za teploty 18°C. Zač.: embryo (E), poté vývojová stadia (L1-L3), následně kuklení a vývoj imaga. Dále, larvální vývoj během krátkého dne (SD 12L/12D) za teploty 18°C. Zač.: embryo (E), pokračuje diapauza po třetím instaru (L3), kterou lze udržovat až do smrti larev.



Obr. 4: Průběh aklimačního protokolu. Larvy aklimované chladem při stáří 6 týdnů (SD6) při počáteční teplotě 18°C, následně 11°C, nakonec 4°C pro získání chladově aklimovaných larev o stáří 10 týdnů (SDA10).

4.3. Měření relativní četnosti mRNA transkriptů

Larvy byly vloženy do Ribozolu™ a poté uloženy do -80°C. Sledování exprese genů bylo provedeno dle následujících protokolů:

1) Izolace RNA

Chemikálie: Ribozol™ (RNA Extraction Reagent - Amresco, Solon, OH, USA), isopropanol, chloroform, 75% EtOH v DEPC H₂O, DEPC H₂O

1. 5 larev *C. costata* bylo vloženo do 400 µl RNA Blue a skladovány při teplotě -80°C.
2. Pracovní plocha byla vyčištěna etanolem.
3. Vzorky *C. Costata* byly rozpuštěny na ledu, larvy byly důkladně rozstříhány nůžkami.
4. Vzorky byly důkladně homogenizovány (30sec) na ledu pomocí homogenizéru. Nástavce byly vyměňovány po sérii vzorků.
5. Ke vzorkům bylo přidáno 600 µl RNA Blue (celk. objem 1000 µl), každý vzorek byl promíchán.
6. Vzorky byly ponechány při pokojové teplotě 5 minut, fáze se oddělily. Během této doby byly vzorky promíchány na vortexu každé 1-2 minuty.

7. Špička pipety byla promyta chloroformem. Bylo přidáno 200 μ l chloroformu (stabilizovaným amylenem). Vzorky byly prudce protřepány po dobu 15s, poté promíchány na vortexu.
8. Vzorky byly ponechány při pokojové teplotě po dobu 5minut, 2 fáze se viditelně oddělily.
9. Mezitím byly připraveny 1,5 mL RNA zkumavky se 400 μ l isopropanolu, které byly vloženy na led.
10. Vzorky byly centrifugovány 12.000g/15min/4°C, oddělily se 2 fáze a střední bílá mezifáze s genomovou DNA. Bylo odebráno 400 μ l horní vodné bezbarvé fáze.
11. 400 μ l vodné fáze z kroku 10 bylo přidáno do připravených isopropanových vzorku z kroku 9.
12. Vzorky byly ponechány 30minut na ledu, přičemž proběhlo srážení RNA.
13. Vzorky byly centrifugovány 22.000g/20min/4°C, všechna tekutina (isopropanol) byla odstraněna, pelet byl ponechán.
14. Pelet byl omyt 500 μ l 75%EtOH v DEPC vodě, opatrně zamíchán 5x otočením zkumavky.
15. Vzorky byly centrifugovány 22.000/5min/4°C , všechna tekutinu byla odstraněna (nejprve pomocí 1000 μ l pipety, poté pomocí 200 μ l pipety)
16. Pelet byl vysoušen 5-6min v otevřených zkumavkách na vzduchu na Petriho misce.
17. Pelet byl rozpuštěn ve 12 μ l sterilované vody (z kitu). Vzorky byly centrifugovány na ruční centrifuze, poté zahřáty na 70°C/5minut a vloženy na led.
18. Bylo použito 2 μ l pro měření koncentrace total RNA (NaNoDrop), podle výsledků bylo rozpuštěno zbývajících 50 μ l na finální koncentraci 1ug total RNA/1 μ l(1ug/ μ l)

2) Ošetření DNázou (Invitrogen, 18068-015)

Chemikálie: 10x DNase I reakční pufr, DEPC H₂O, DNase I (Ambion, Life Technologies, Foster City, CA, USA), glykogen, isopropanol, EDTA, 75% EtOH v DEPC H₂O

1. Heater byl nastaven na 65°C
2. Bylo smícháno 5 μ L vzorku (obsahujícího 5 μ g tRNA) a 20 μ L MM.

Výpočet MM:

MM 1x:

2,5 µl 10x DNase I Reaction buffer

15 µl DEPC H₂O

2,5 µl DNase I

Celkem: 20 µl

MM 19x:

47,5 µl 10x DNase I Reaction buffer

285 µl DEPC H₂O

47,5 µl DNase I

Celkem: 380 µl ÷ 19 = 20 µl

3. Vzorky byly promíchány na vortexu a stočeny v ruční centrifuze, poté inkubovány 15 minut při pokojové teplotě.
4. Ke vzorkům bylo přidáno 2,5 µL EDTA a poté byly vloženy na led.
5. Vzorky byly zahřáty na 65°C 10 minut.
6. Vzorky byly stočeny na ruční centrifuze a poté k nim bylo přidáno 27,5 µL isopropanolu.
7. Ke vzorkům bylo přidáno 2 µL glykogenu, vzorky byly promíchány převrácením v ruce a ponechány 30 minut na ledu (došlo k vysrážení RNA). Poté byly vzorky promíchány na vortexu a stočeny v ruční centrifuze.
8. Vzorky byly stočeny 22 000g/5min/4°C. Poté byla vylita tekutina a pelet ponechán.
9. K peletu bylo přidáno 500 µL 75% EtOH v DEPC vodě (-20°C), vzorky byly promíchány pětkrát otočením v ruce.
10. Vzorky byly stočeny 22 000g/5min/4°C. Poté byla odstraněna tekutina a pelet ponechán.
11. Otevřené zkumavky byly položeny na Petriho misku, aby se rozpustila sraženina (5-6 minut).
12. Ke vzorkům bylo přidáno 5,5 µL DEPC vody a poté byly stočeny na ruční centrifuze.
13. Vzorky byly zahřáty na 70°C/5minut, poté vloženy na led.
14. Bylo odebráno 5 µL pro syntézu cDNA. Vzorky byly zamrazeny na -80°C.

2) Reverzní transkripce

Během reverzní transkripce byla získána mRNA (z celkové RNA, tedy tRNA) pomocí Oligo(dT) 23 anchored primer. mRNA byla současně přepsána díky enzymu Superscript III na cDNA, mající funkci templátu pro PCR polymerázu.

Následující kroky byly prováděny v 200 μL PCR zkumavkách a PCR destičce (T3000).

Chemikálie: Oligo (dt) 23 anchored primer (500 ng/ μl) (Sigma-Aldrich), DEPC H_2O , 10mM dNTP mix, 5x First Strand buffer (součást Superskript kitu), 0,1 M DTT (součást Superskript kitu), 200 U/ μl Superskript III(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 40U/ μl RNasin (z RT System kitu)

1. Heater byl zahřán na 65°C.
2. Bylo smícháno 5 μL (tj. 5 μg) vzorku (DNázou ošetřená total RNA) a 8 μL premix.

1x premix:

1 μL Oligo(dT) anchored primer (500 ng/ μL)

1 μL 10 mM dNTP mix

6 μL sterilní voda

Celkem: 8 μL

19x premix:

19 μL Oligo(dT) anchored primer (500 ng/ μL)

19 μL 10 mM dNTP mix

114 μL sterilní voda

Celkem: 152 μL \div 19 = 8 μL

3. vzorky byly inkubovány v heater, 65°C, 10 minut.
4. Vzorky byly vloženy na led a inkubovány 1 minutu.
5. Ke vzorkům bylo přidáno 7 μL MM premix (celkový objem byl 20 μL)

1x MM:

4 μL 5x First Strand Buffer (from Superscript Kit)

2 μL 0,1 M DTT (from Superscript Kit)

0,25 μL 40 U/ μL RNasin (from RT System Kit)

0,75 μL 200 U/ μL Superscript III

Celkem: 7 μL

19x MM:

76 μL 5x First Strand Buffer (from Superscript Kit)

38 μL 0,1 M DTT (from Superscript Kit)

4,75 μL 40 U/ μL RNasin (from RT System Kit)

14,25 μL 200 U/ μL Superscript III

Celkem: 133 μL \div 19 = 7 μL

6. Vzorky byly inkubovány v T3000 PCR block.

Program:

46°C na 2 hodiny

65°C na 15 minut

0°C na 10 minut

7. Vzorky byly vloženy na led.

8. Ke vzorkům bylo přidáno 480 µL sterilní vody a vzorky byly promíchány.

9. Byly připraveny 3 aliquoty po 44 µL od každého vzorku a uloženy (včetně zbylé cDNA) do -80°C.

4) qPCR

V tomto postupu se použila metoda RT-qPCR (Real-time/quantitative polymerase chain reaction). Tato metoda slouží ke kvantifikaci DNA a transkripce. Princip této metody je klasická PCR, ovšem důležitý je zde navíc cyklus, zaznamenávající množství DNA v průběhu cyklů. Detekce množství DNA byla provedena díky fluorescenčnímu substrátu SYBR G. Tento substrát je schopen vazby na DNA, po čemž dojde k vyzáření fluorescence, která je zaznamenávána detektorem a odpovídá množství dané DNA.

Chemikálie: sterilní voda, LA mix, cDNA, Primer up, Primer down, SYBR G, RP (ribosomální protein)

Analýza byla prováděna na 96-jamkové PCR destičce (BioRad)

1. Vzorky byly vloženy do ledu a zahřáty, poté promíchány na vortexu a stočeny v ruční centrifuze.

2. Byl připraven MM:

Příprava MM 1x:

LA Mix	10 µL
Sterilní voda	3,4 µL
SYBR G	0,08 µL
cDNA	5,0 µL
primer up	0,4 µL
primer down	0,4 µL

Celkem: 20 µL

Příprava MM 19x:

LA Mix	190 µL
Sterilní voda	64,6 µL
SYBR G	1,52 µL
cDNA	95 µL
primer up	7,6 µL
primer down	7,6 µL

Celkem: 380 µL ÷ 19 = 20

3. Na PCR destičku bylo napipetováno 5 μL cDNA a 15 μL MM.
4. PCR destička byla vložena do qPCR přístroje.
5. Na destičku byla dána transparentní folie, jejíž okraje byly zafixovány.
6. Byl zahájen proces qPCR:

95°C/ 3min

94°C/ 15 sec

60°C/ 30 sec

72°C/ 30 sec

95°C/ 15 sec

5. Výsledky

Naměřené hodnoty z qPCR (kritický cyklus, parametr CT) pro jednotlivé geny jsou uvedeny v Excelových tabulkách, které sloužily pro výpočet relativní četnosti transkriptů pro cílový gen vzhledem k četnosti transkriptů pro referenční gen (ddct hodnota).

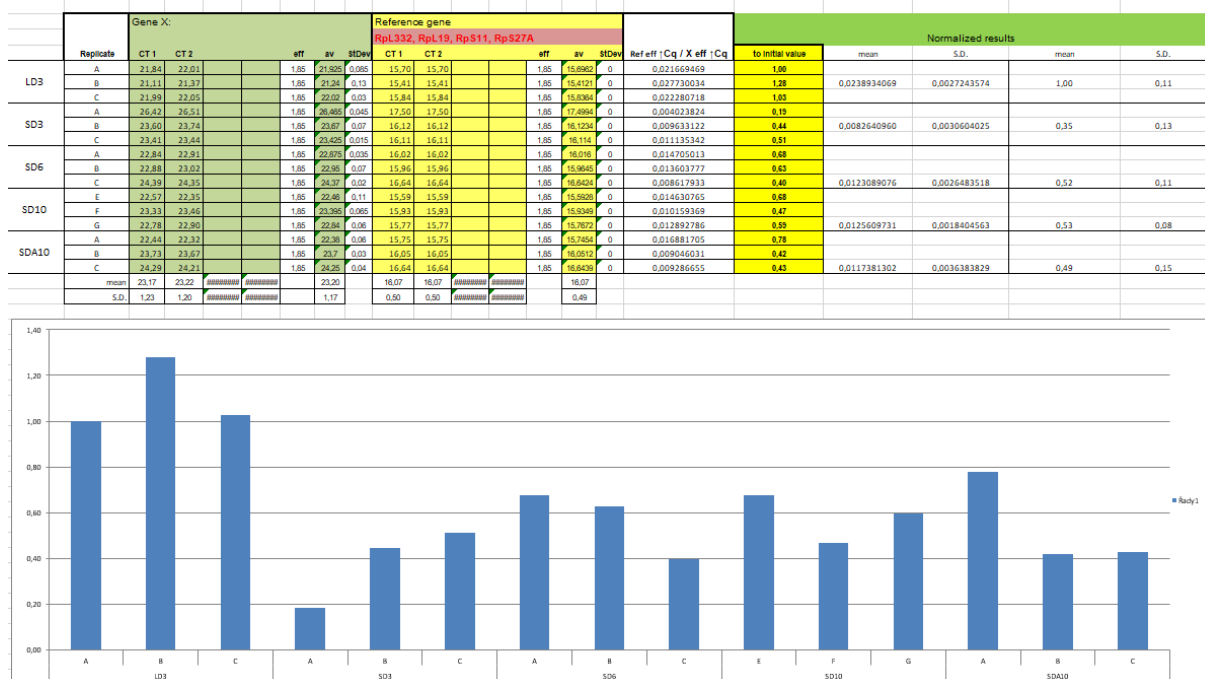
Z grafu na obrázku 6 byla získána hodnota CT jakožto přímý výstup RT-qPCR. CT je nazývána jako kritický cyklus. Po dosažení kritického cyklu PCR dochází k exponenciálnímu navýšení množství produktu (amplikonu dvouvláknové DNA). Přístroj CFX96 PCR light cycler umožňuje stanovit optimální hodnotu CT dle algoritmu pro každou křivku v každém cyklu. Pokud je hodnota CT vysoká, lze z toho vyčíst, že na počátku byla relativně nízká četnost cílové cDNA ve vzorku, a křivka tedy exponenciálně roste později. A naopak.

Hodnota EFF vyjadřuje tzv. eficienti, která koresponduje se specifickým párem primerů pro určitou sekvenci a s teoretickým zdvojnásobením obsahu produktu během každého kroku PCR. Pro každý pár primerů je konkrétní eficienta. Protože v tomto projektu jsme pracovali s velkým množstvím různých sekvencí (řádově stovky různých transkriptů, genů) nebylo by efektivní stanovovat specifickou EFF pro každý jeden pár. Eficienta pro naše primery byla proto arbitrárně stanovena na hodnotu 1,85. Pro relativní posouzení změn četnosti v závislosti na aklimační variantě arbitrární stanovení EFF vyhovuje.

Hodnoty ddct na obr. 5 byly vypočteny dle vztahu: $ddct = (EFF_{ref}^{CT_{ref}}) / (EFF_{target}^{CT_{target}})$.

Pro každou RT-qPCR reakci bylo použito vždy naprosto shodné množství vstupní celkové RNA (5 mg). Jako referenční geny byly využity čtyři různé ribozomální proteiny (RP). Tyto RP kódují geny, jejichž transkripce je poměrně stálá, RP se syntetizují v buňkách se zhruba stále stejnou frekvencí. Proto je hodnota CT pro reference velmi podobná ve všech variantách.

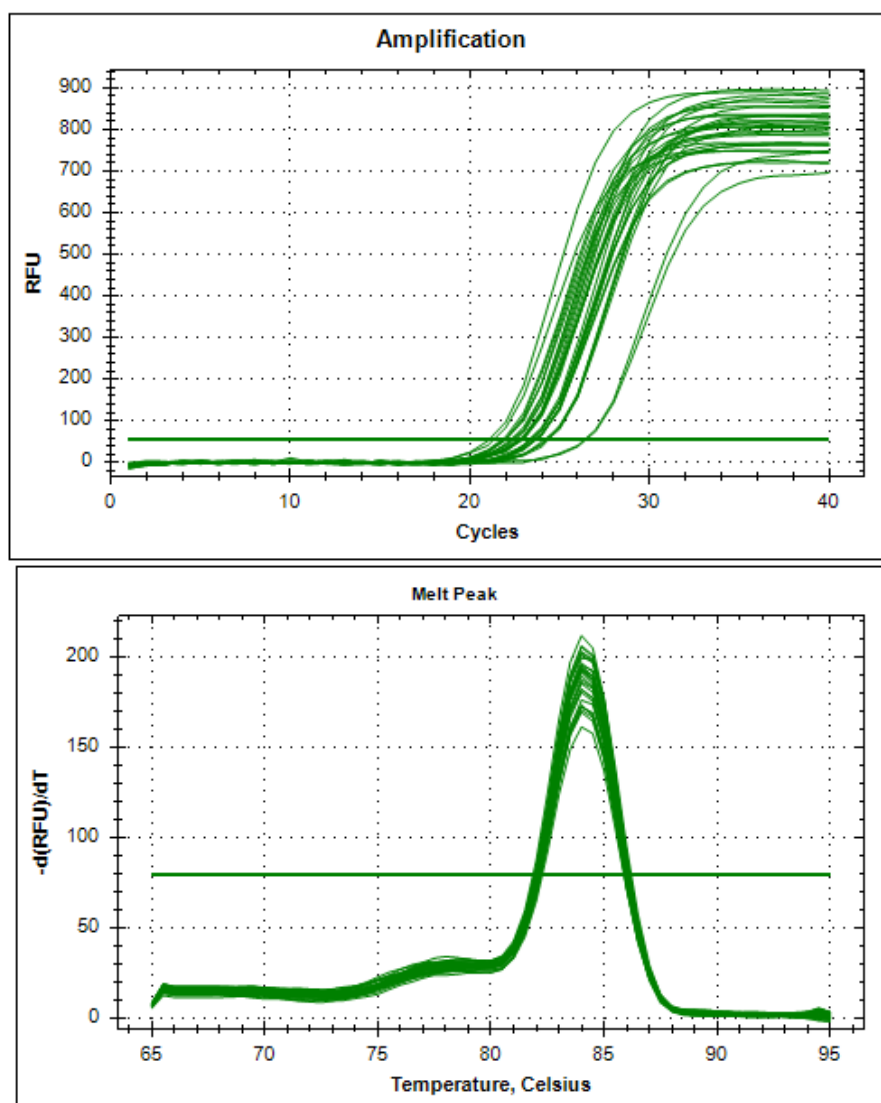
Obr. 5 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *Glucose transporter 1 (Glut)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Relativní exprese genů v jednotlivých aklimačních variantách a také v jednotlivých biologických opakováních je zobrazena na dolním sloupcovém grafu. Tyto hodnoty byly nakonec zprůměrovány přes biologická opakování a převedeny na barevnou škálu heatmapy (obr. 35).



Obr. 5: tabulka a graf s výsledky pro *Glucose transporter 1 (Glut)*.

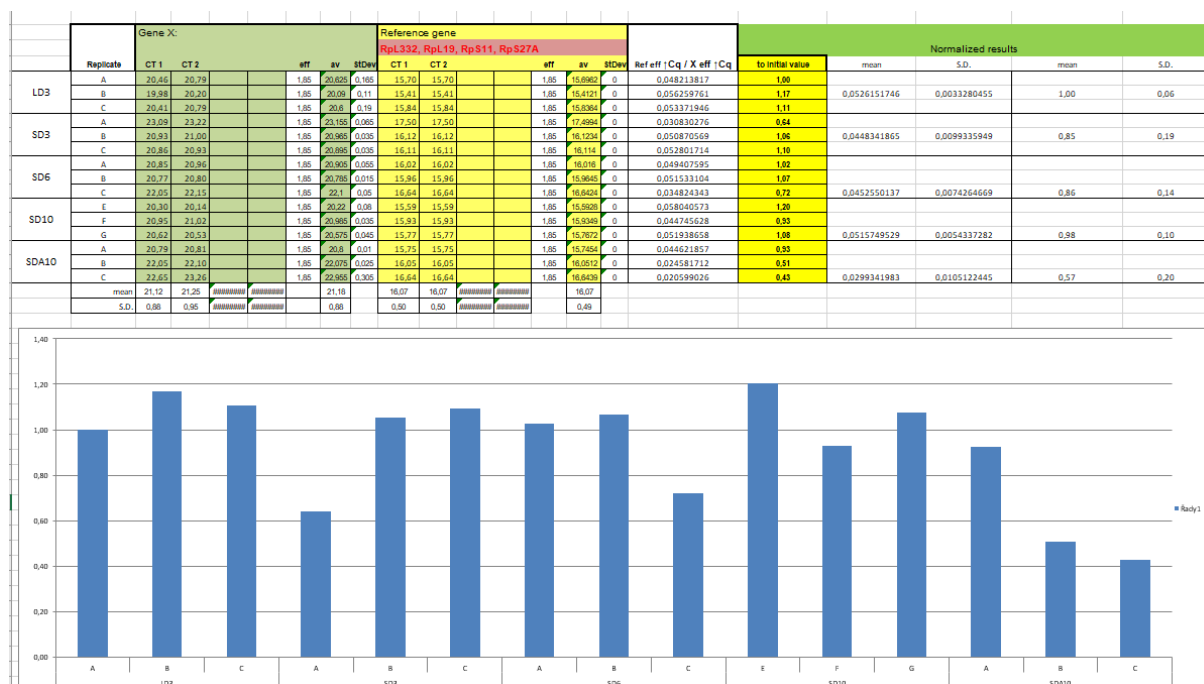
Na obr. 6 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *Glut*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,0238934069	0,0082640960	0,0123089076	0,0125609731	0,0117381302



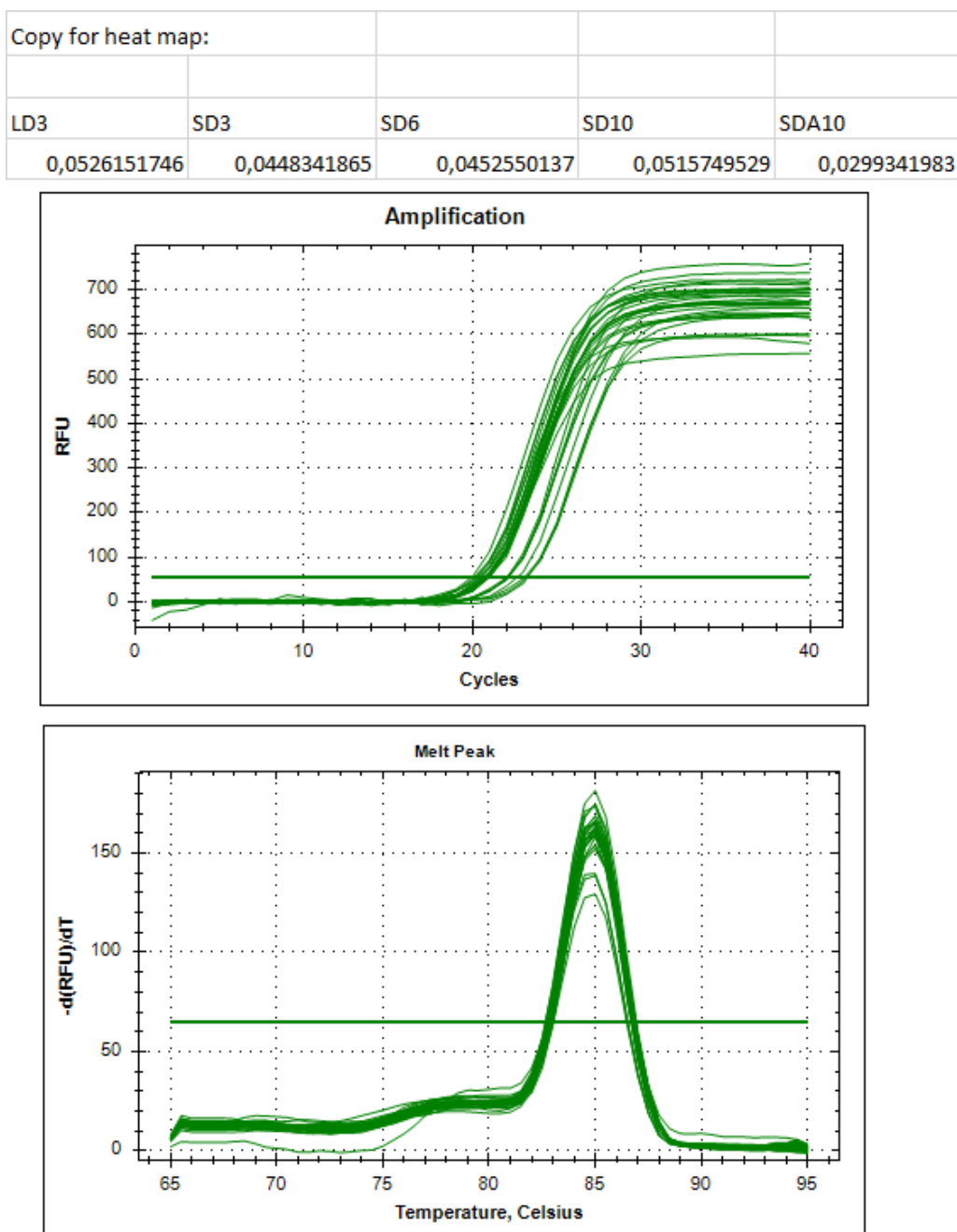
Obr. 6: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *Glut*.

Obr. 7 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *Hexokinase A (Hex A)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Expresce genů je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



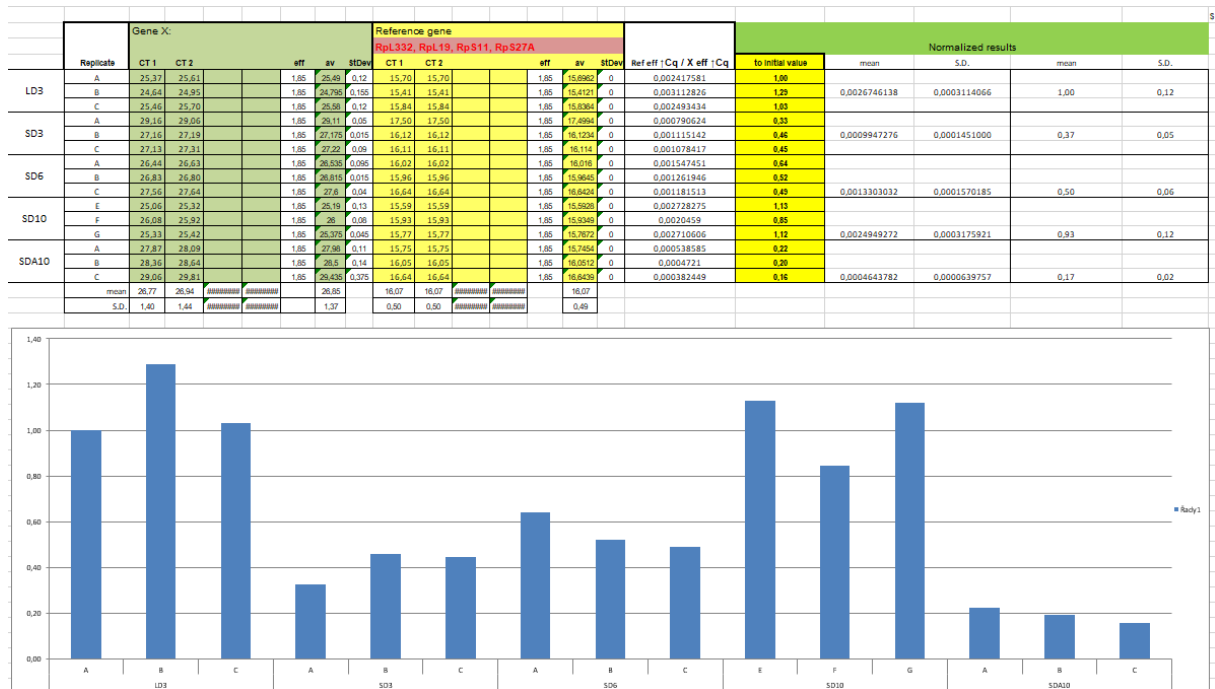
Obr. 7: tabulka a graf s výsledky pro *Hexokinase A (Hex A)*.

Na obr. 8 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *Hex A*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.



Obr. 8: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *Hex A*.

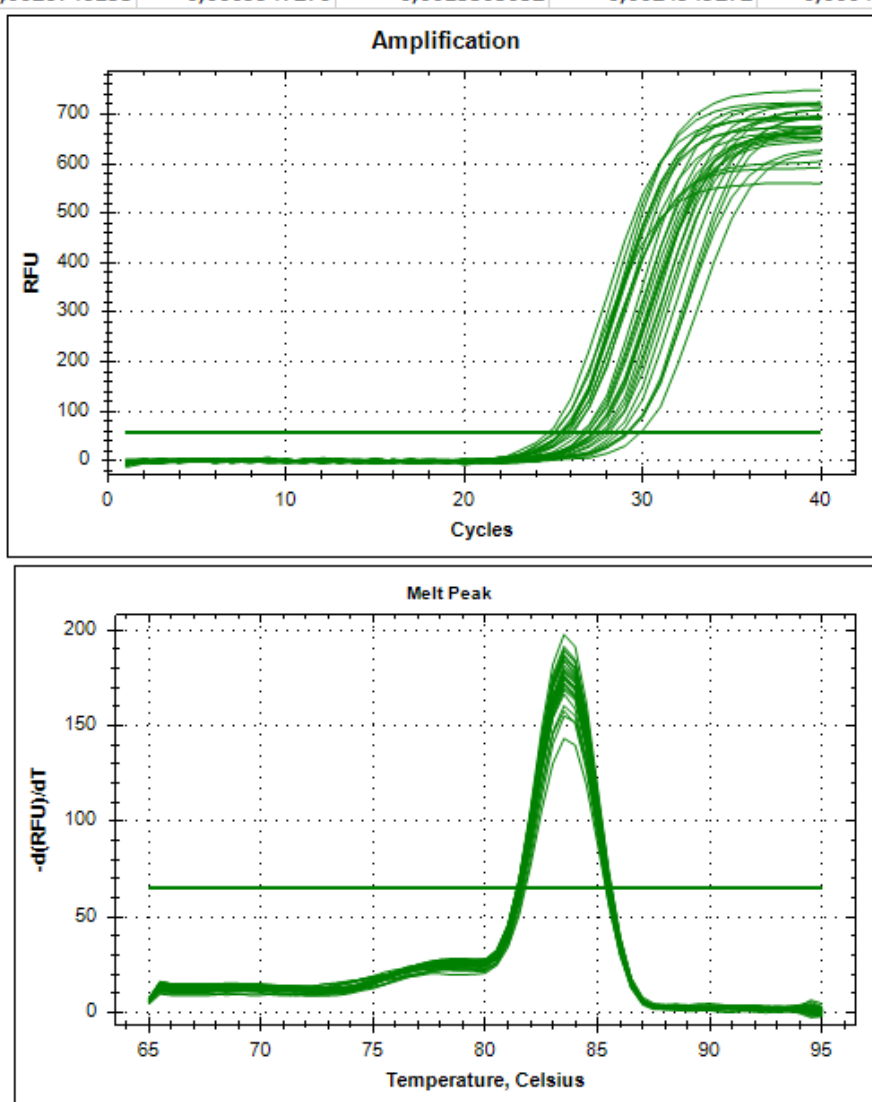
Obr. 9 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *Hexokinase C (Hex C)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Expresí genů je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



Obr. 9: tabulka a graf s výsledky pro *Hexokinase C (Hex C)*.

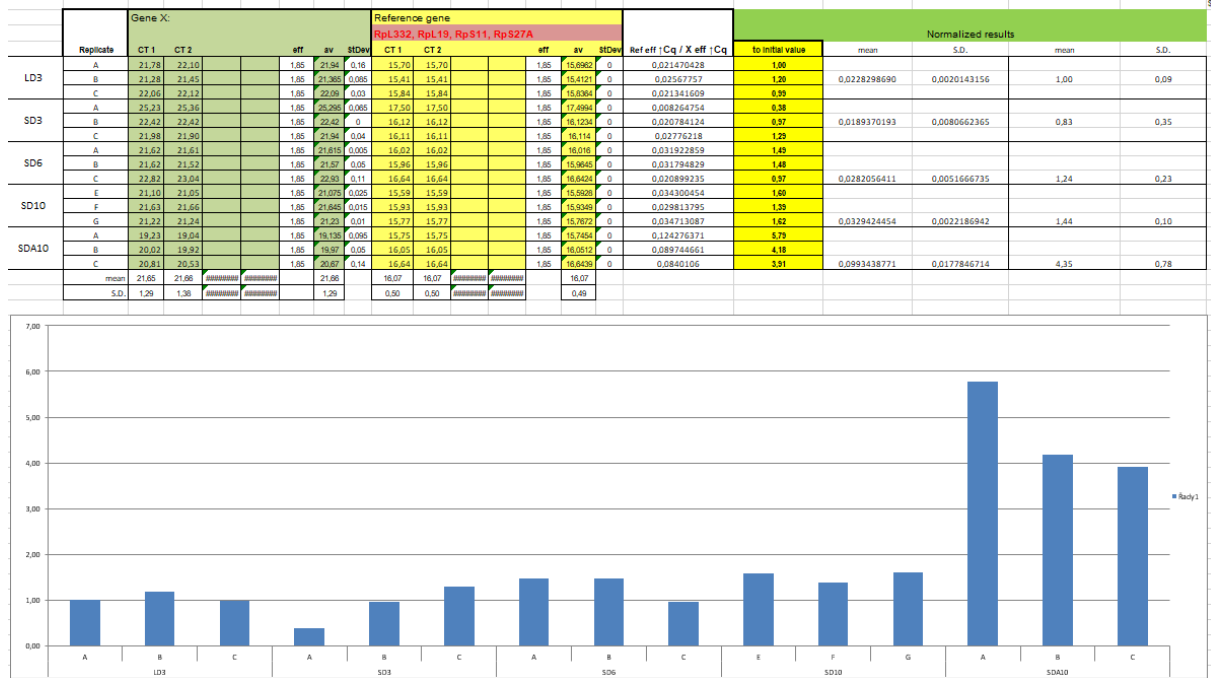
Na obr. 10 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *Hex C*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,0026746138	0,0009947276	0,0013303032	0,0024949272	0,0004643782



Obr. 10: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *Hex C*.

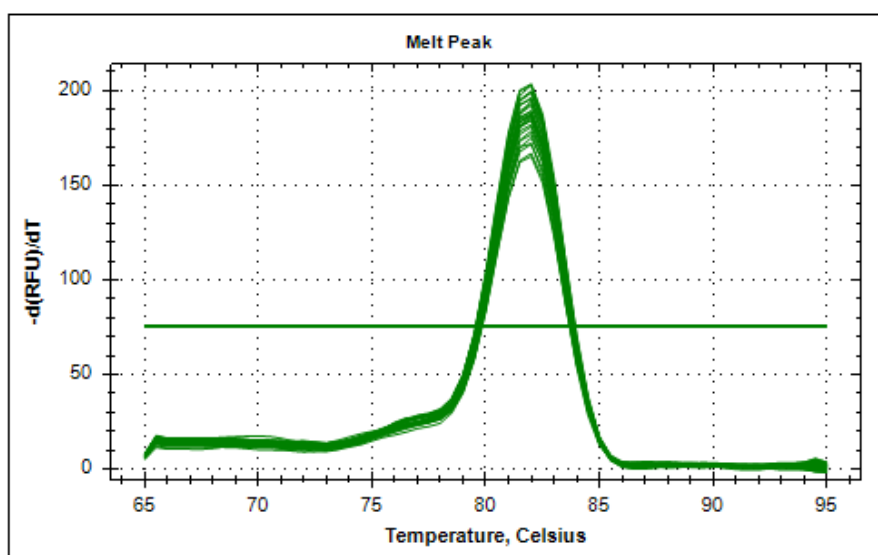
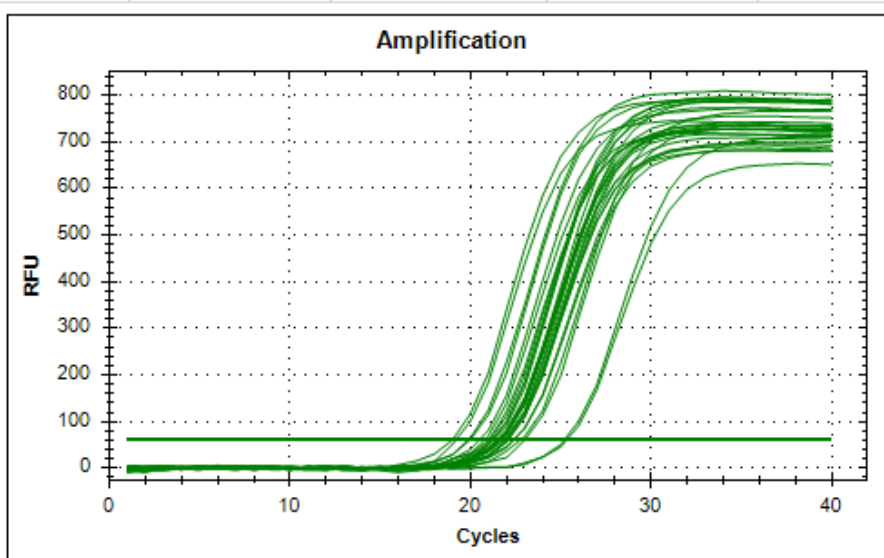
Obr. 11 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *Zwischenferment, Glucose-6-P dehydrogenase* (Zw). Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Expresí genů je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



Obr. 11: tabulka a graf s výsledky pro *Zwischenferment, Glucose-6-P dehydrogenase* (Zw).

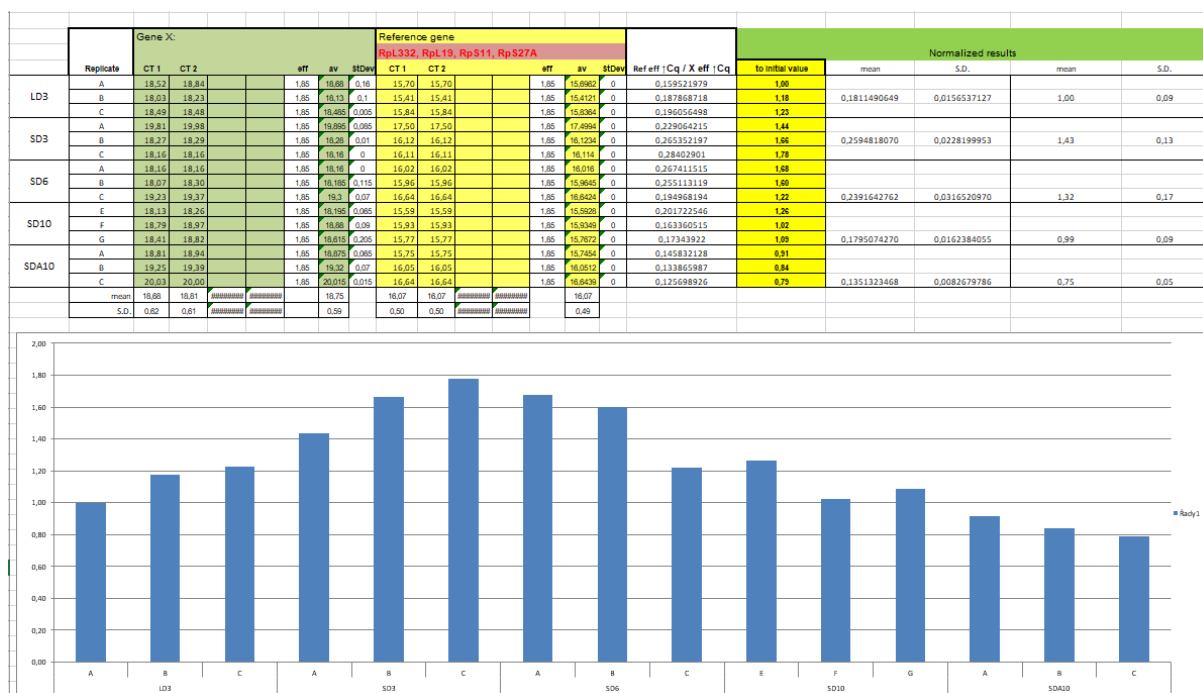
Na obr. 12 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *Zw*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,0228298690	0,0189370193	0,0282056411	0,0329424454	0,0993438771



Obr. 12: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *Zw*.

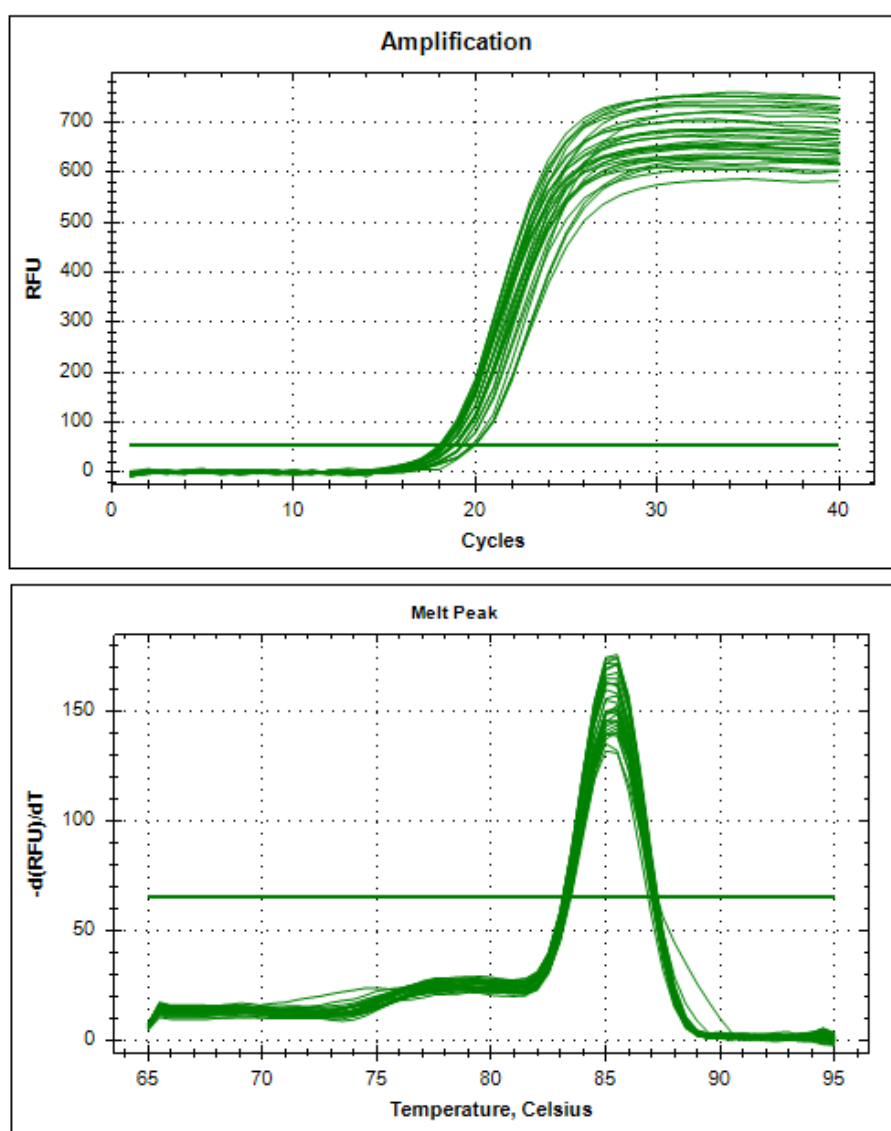
Obr. 13 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *Phosphoglucose isomerase (Pgi)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Expres genů je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



Obr. 13: tabulka a graf s výsledky pro *Phosphoglucose isomerase (Pgi)*.

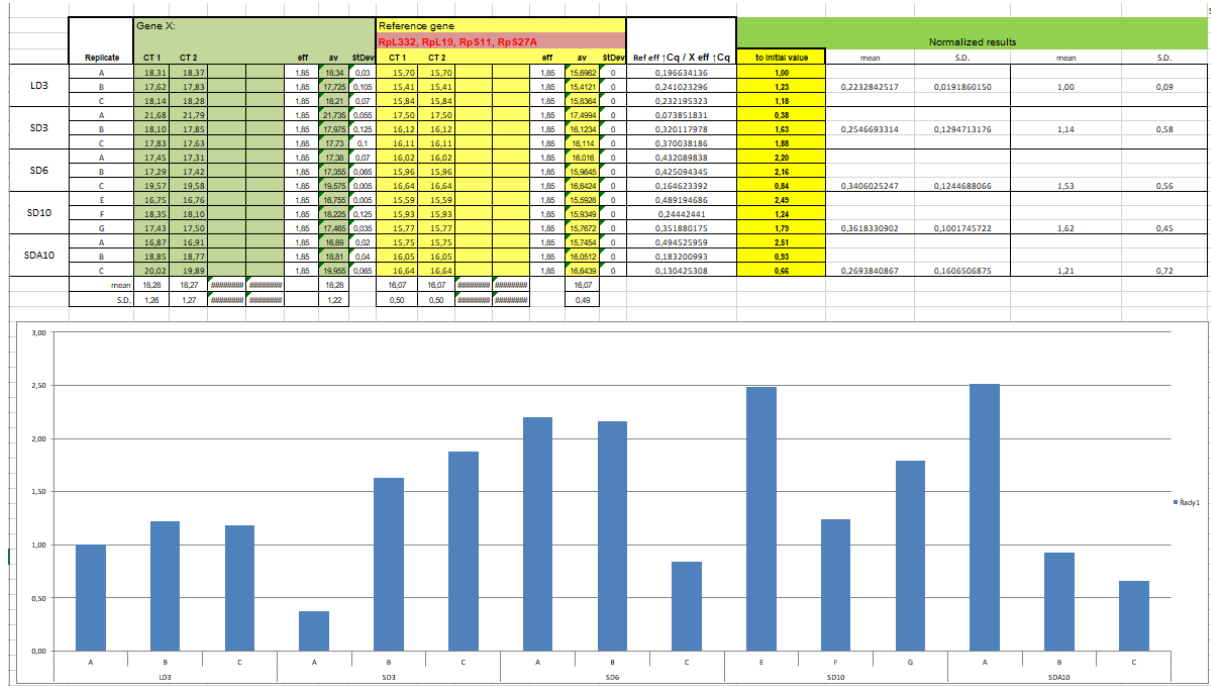
Na obr. 14 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *Pgi*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,1811490649	0,2594818070	0,2391642762	0,1795074270	0,1351323468



Obr. 14: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *Pgi*.

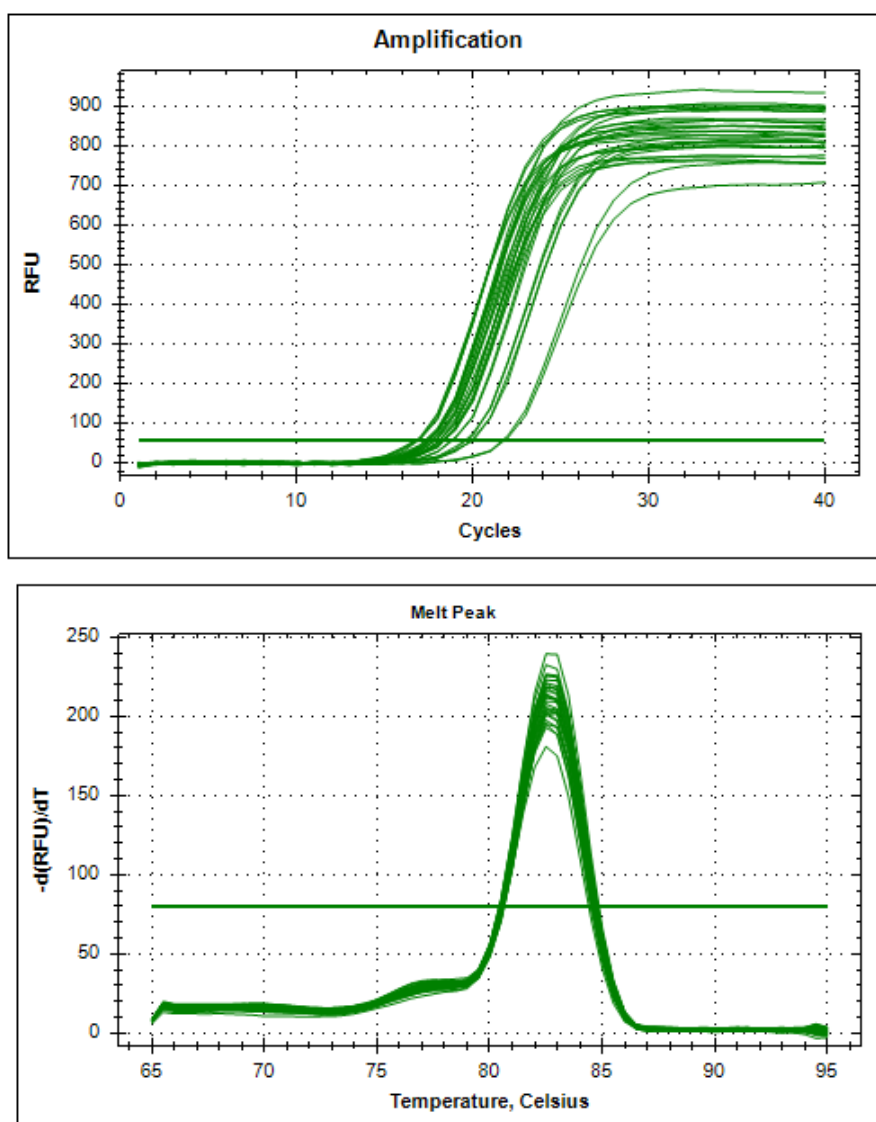
Obr. 15 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *Glycogen phosphorylase (GlyP)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Exprese genů je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



Obr. 15: tabulka a graf s výsledky pro *Glycogen phosphorylase (GlyP)*.

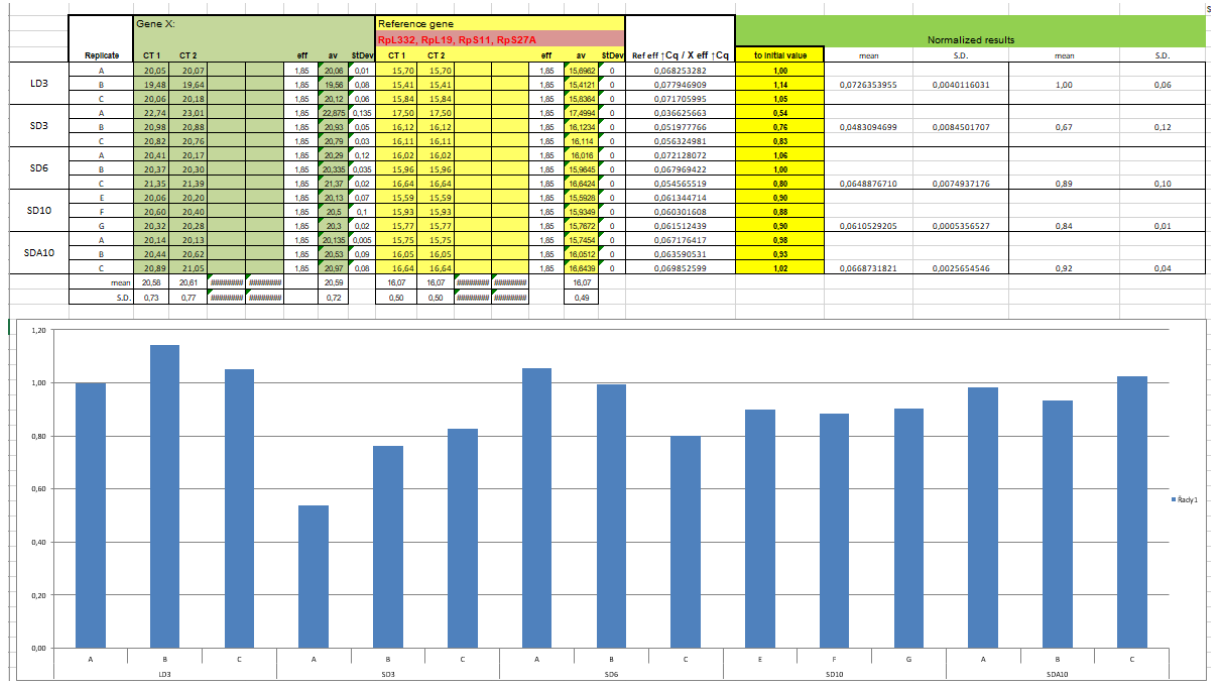
Na obr. 16 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *GlyP*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,2232842517	0,2546693314	0,3406025247	0,3618330902	0,2693840867



Obr. 16: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *GlyP*.

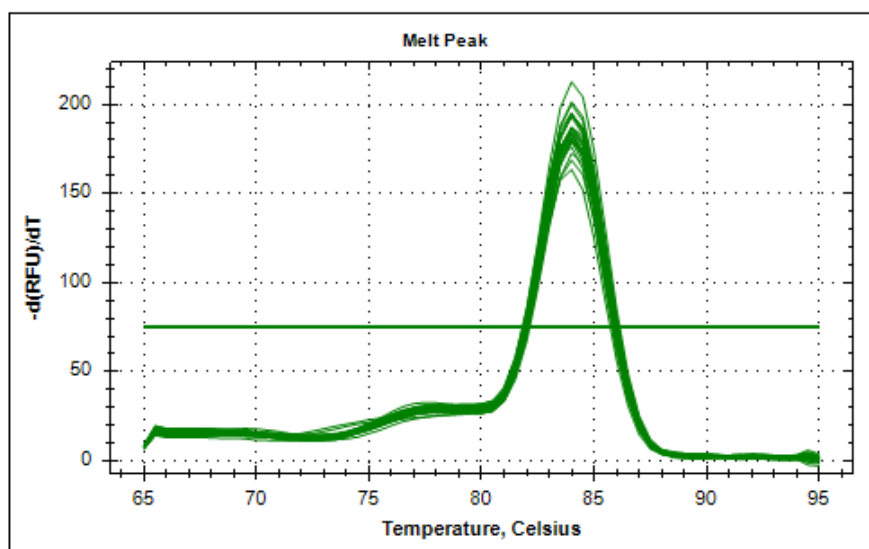
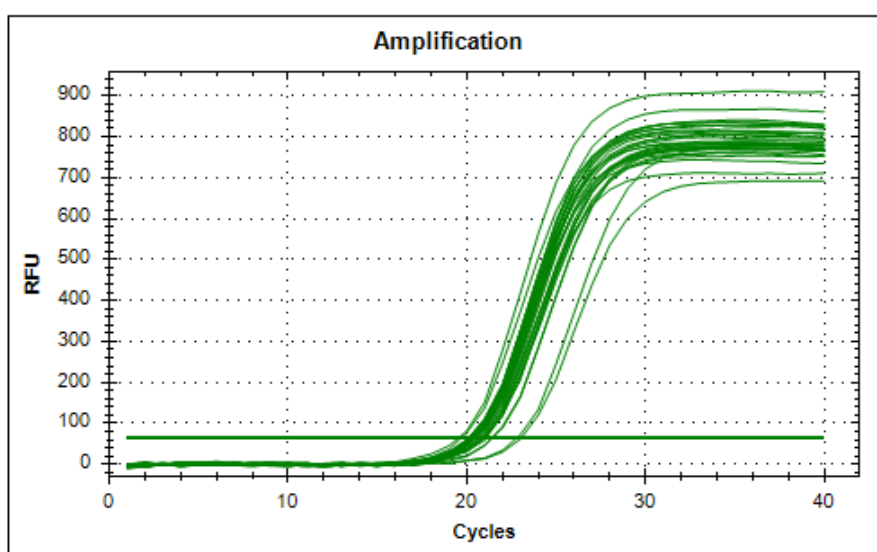
Obr. 17 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Expresí je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



Obr. 17: tabulka a graf s výsledky pro *UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (UGP)*.

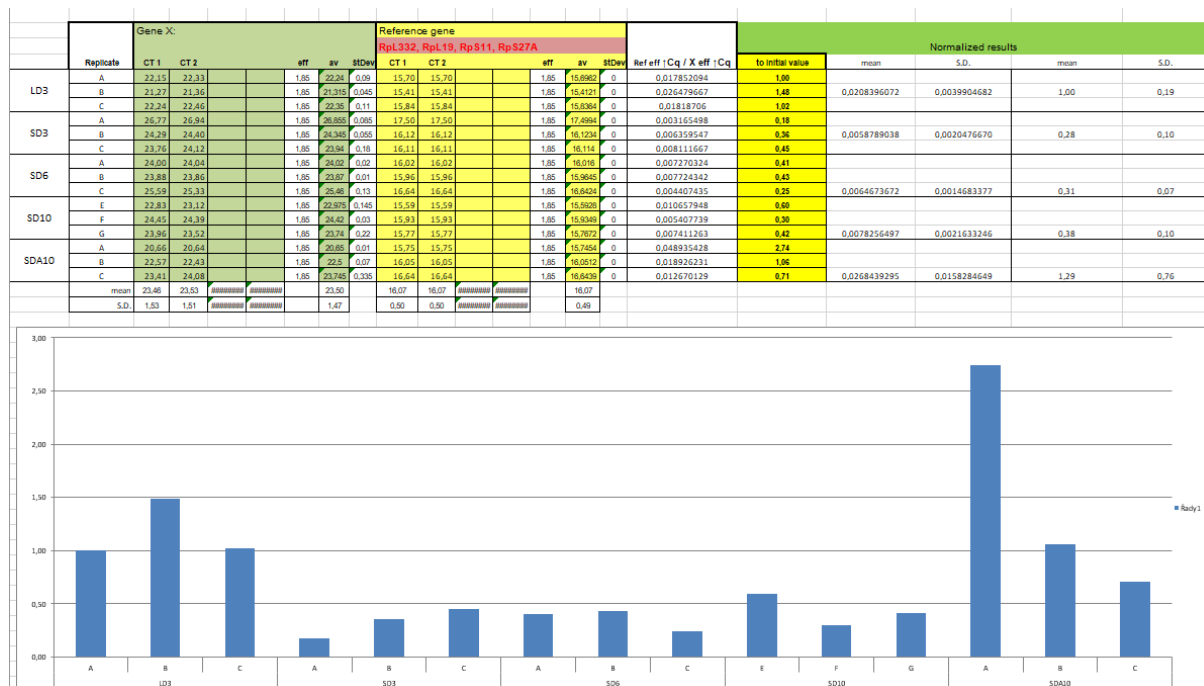
Na obr. 18 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *UGP*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,0726353955	0,0483094699	0,0648876710	0,0610529205	0,0668731821



Obr. 18: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *UGP*.

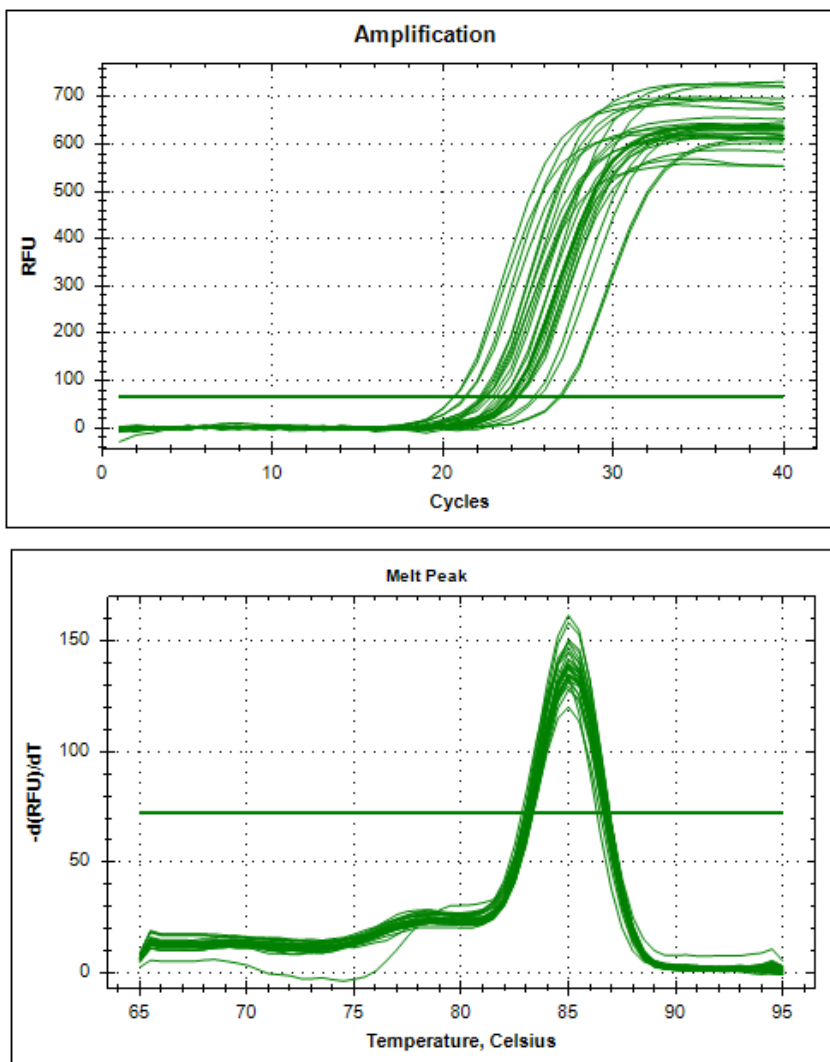
Obr. 19 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *UTP-glucose-1-phosphate Trehalose-6-P synthase 1, N/terminus, synthase activity (Tps F2)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Expres genů je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



Obr. 19: tabulka a graf s výsledky pro *UTP-glucose-1-phosphate Trehalose-6-P synthase 1, N/terminus, synthase activity (Tps F2)*.

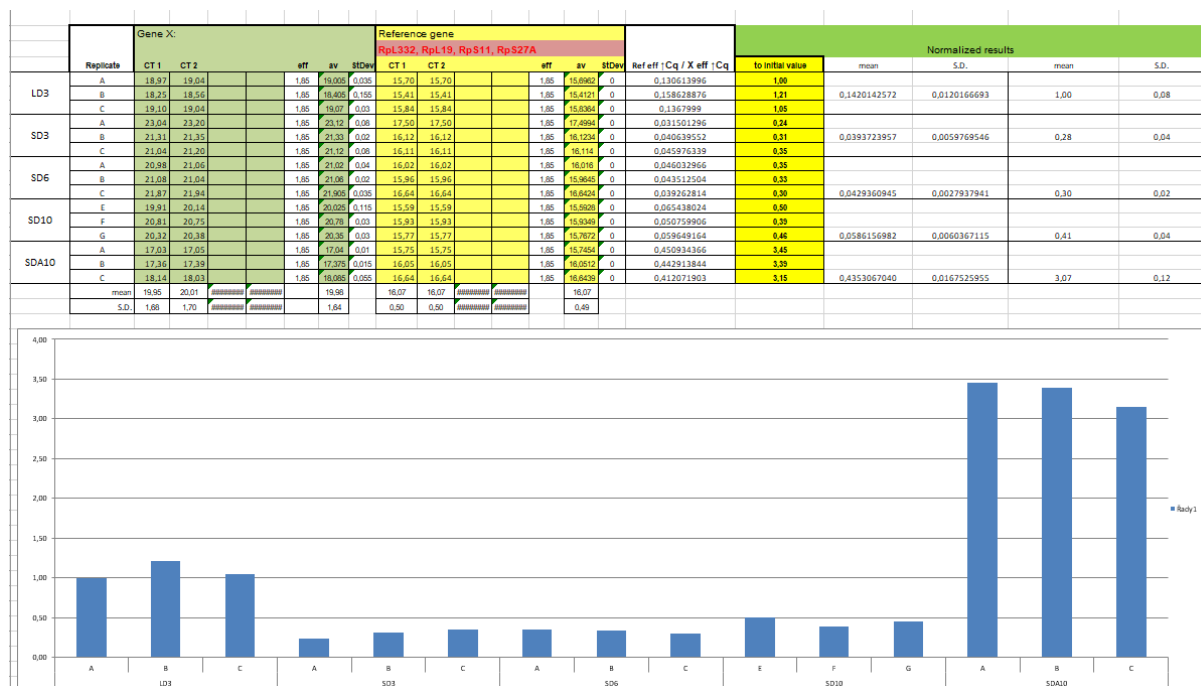
Na obr. 20 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *Tps F2*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,0208396072	0,0058789038	0,0064673672	0,0078256497	0,0268439295



Obr. 20: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *Tps F2*.

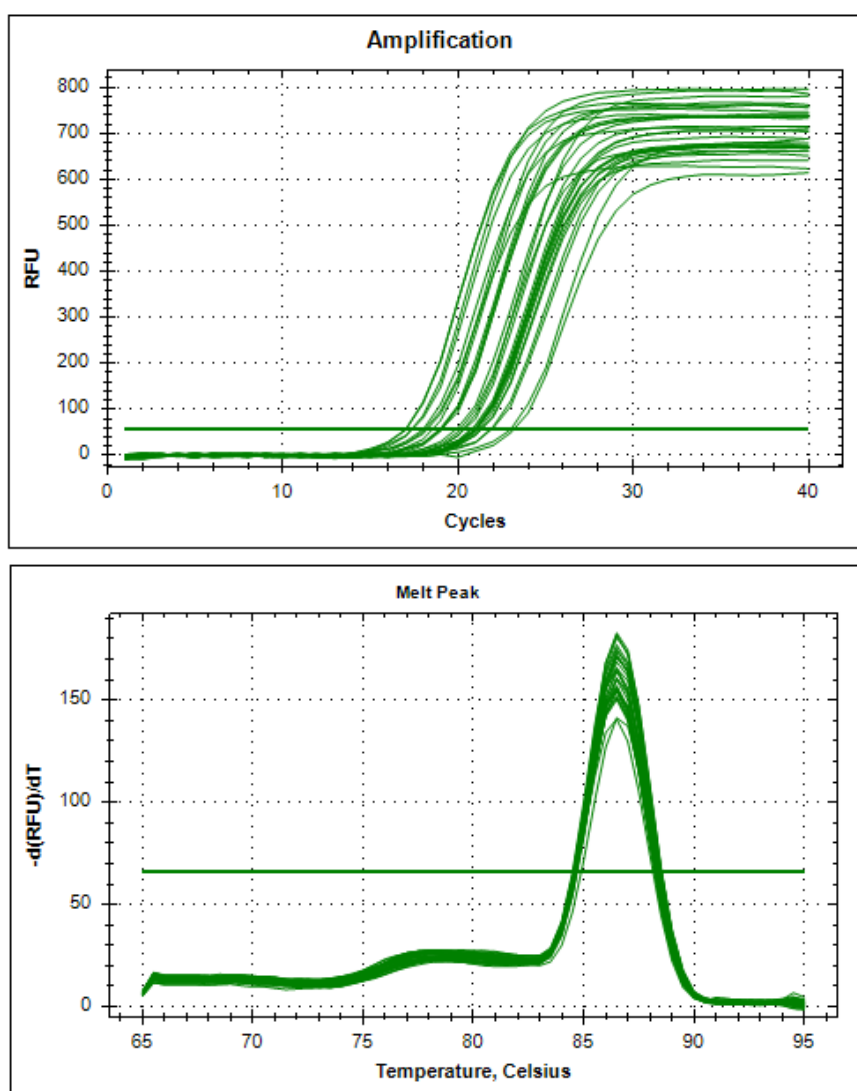
Obr. 21 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *Trehalose-6-P synthase 1, C-terminus, phosphatase activity (Tps F1)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Expresce genů je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



Obr. 21: tabulka a graf s výsledky *Trehalose-6-P synthase 1, C-terminus, phosphatase activity (Tps F1)*.

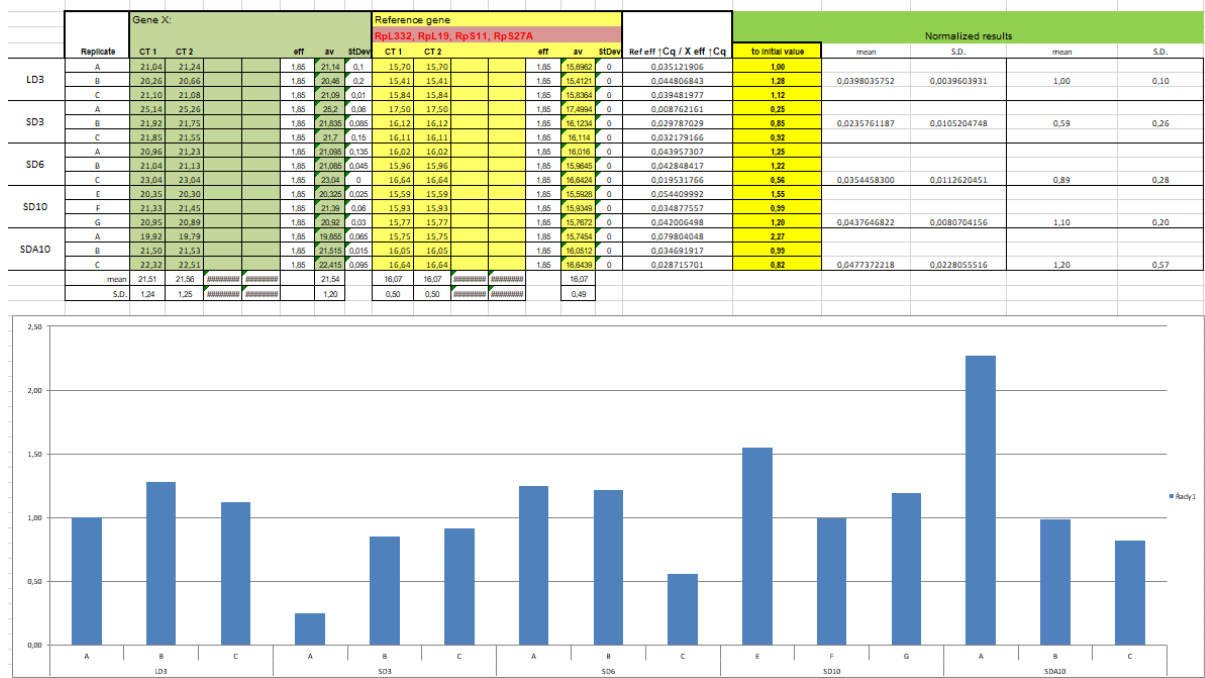
Na obr. 22 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *Tps F1*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,1420142572	0,0393723957	0,0429360945	0,0586156982	0,4353067040



Obr. 22: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *Tps F1*.

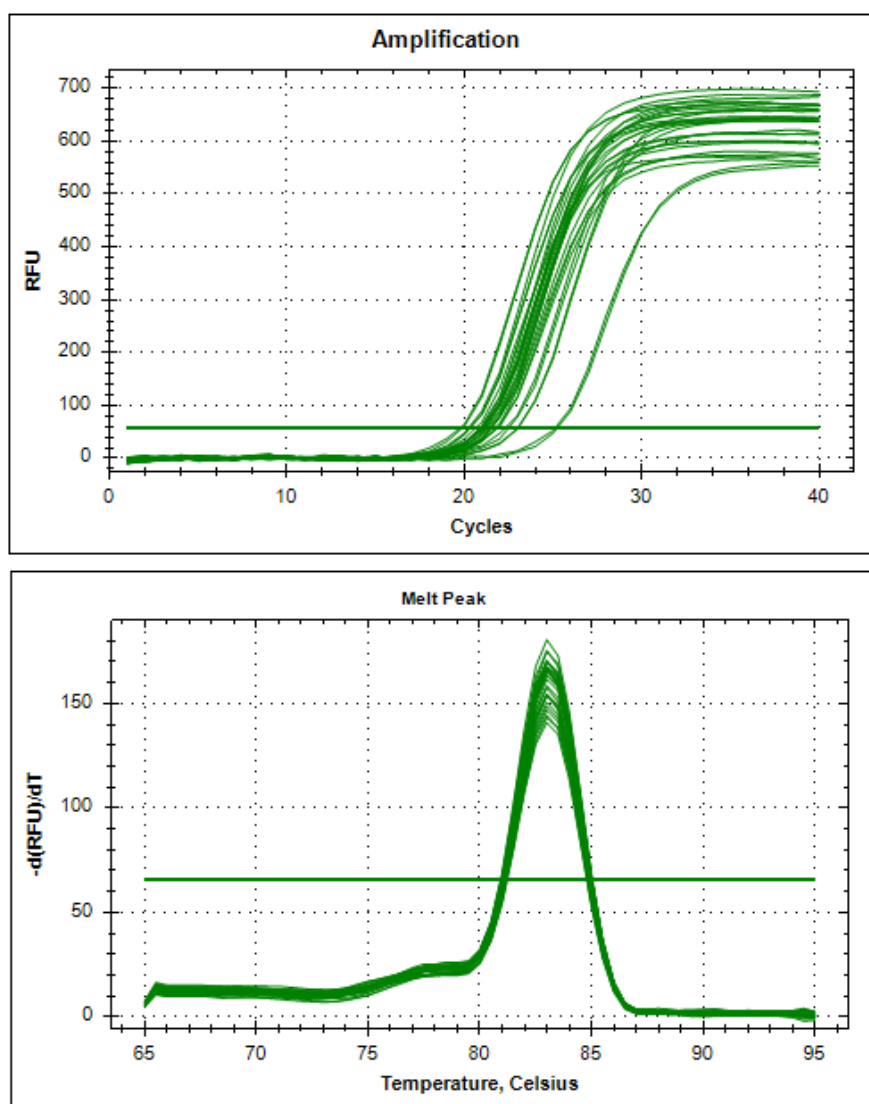
Obr. 23 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *Trehalose transporter 1-1 (Tret F1)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Expres genů je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



Obr. 23: tabulka a graf s výsledky *Trehalose transporter 1-1 (Tret F1)*.

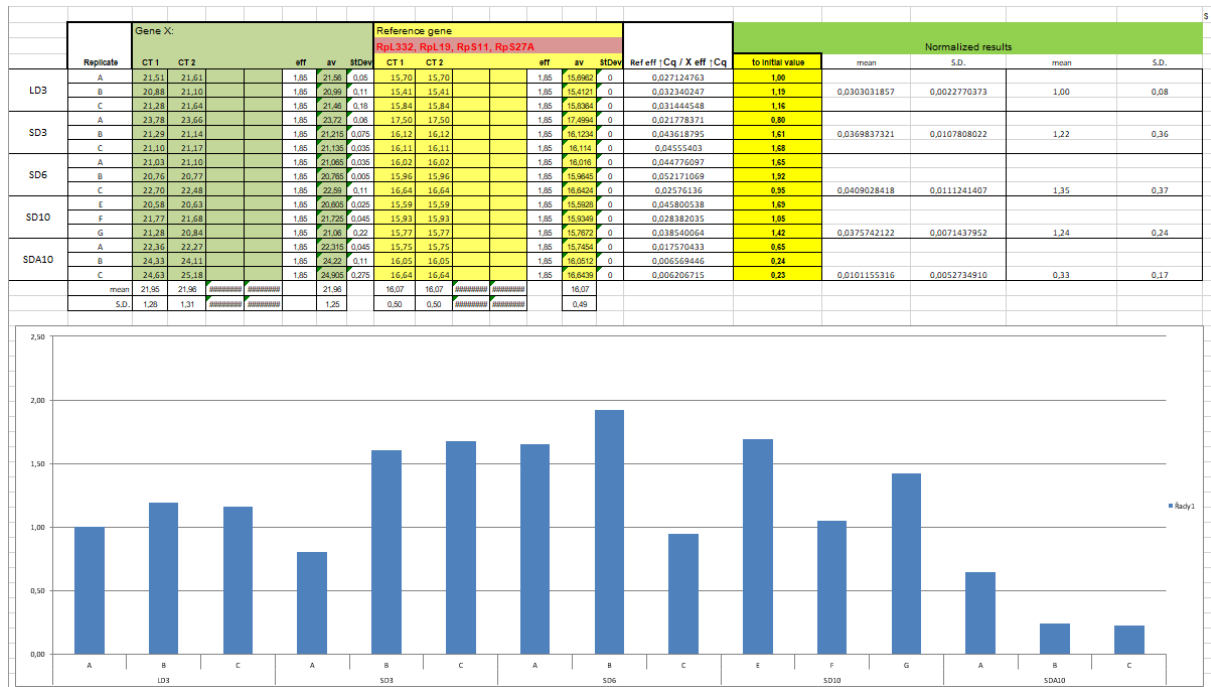
Na obr. 24 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *Tret F1*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,0398035752	0,0235761187	0,0354458300	0,0437646822	0,0477372218



Obr. 24: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *Tret F1*.

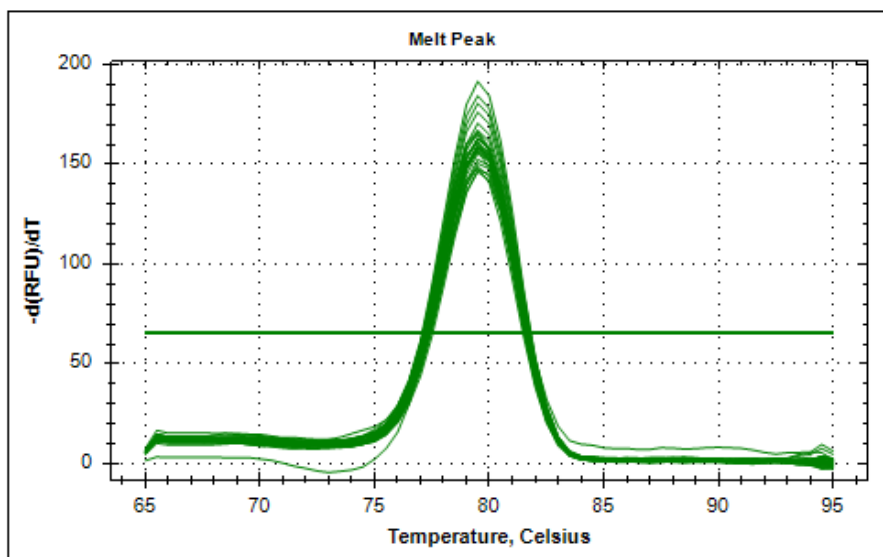
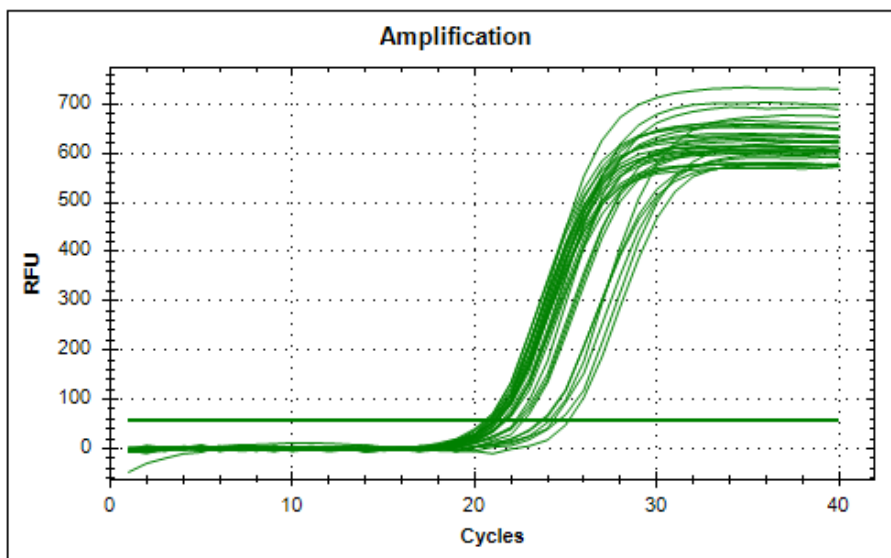
Obr. 25 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *Trehalase (Treh)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Expresí genů je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



Obr. 25: tabulka a graf s výsledky *Trehalase (Treh)*.

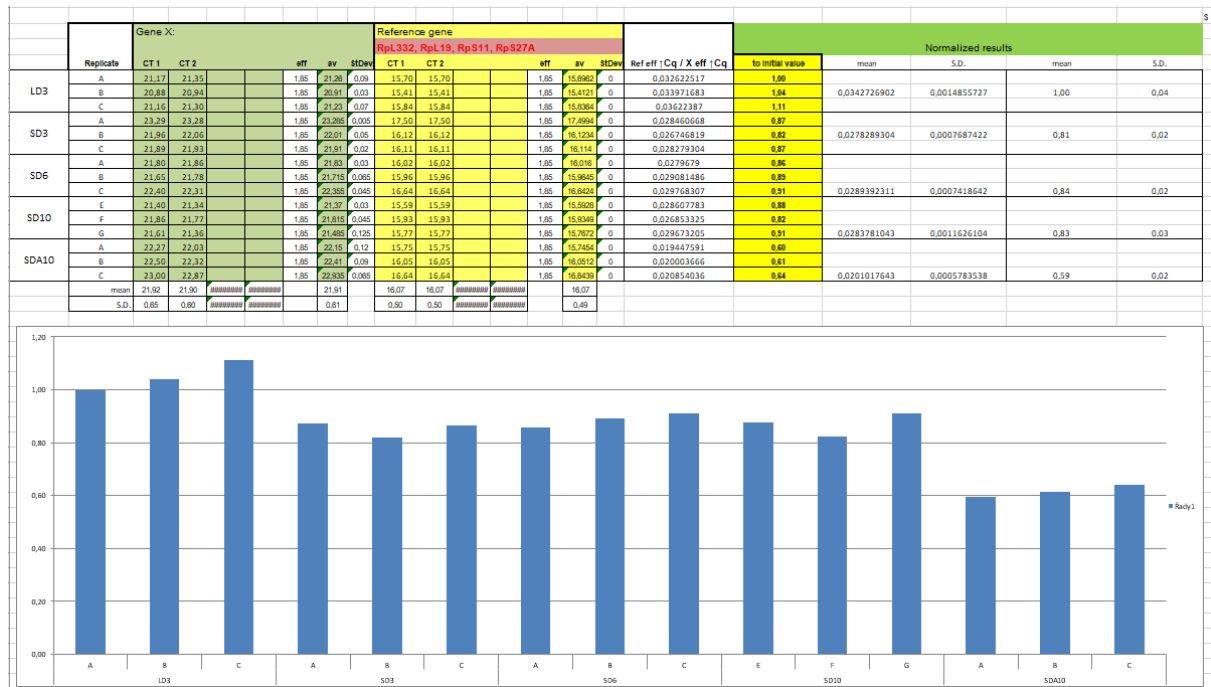
Na obr. 26 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *Treh*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,0303031857	0,0369837321	0,0409028418	0,0375742122	0,0101155316



Obr. 26: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *Treh*.

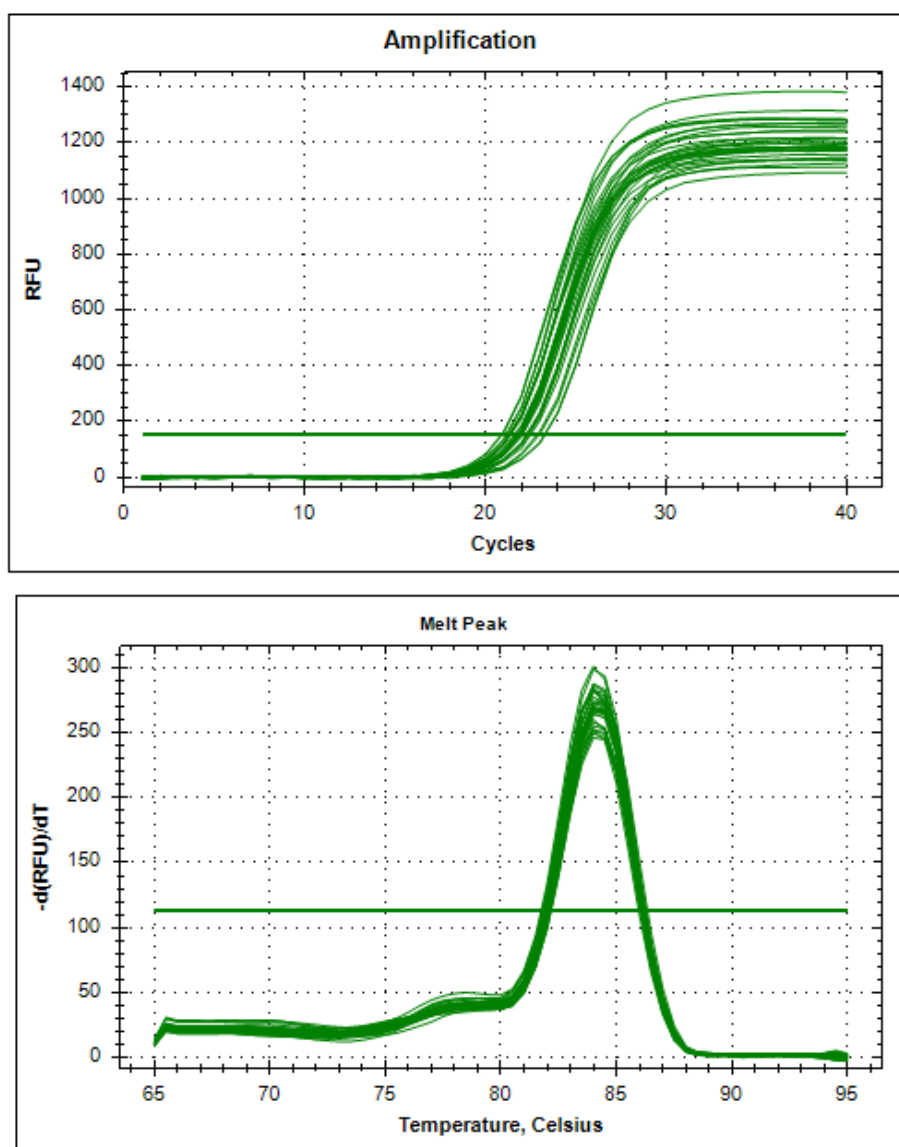
Obr. 27 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *Gluconolactone hydrolase (GLH)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Expres genů je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



Obr. 27: tabulka a graf s výsledky *Gluconolactone hydrolase (GLH)*.

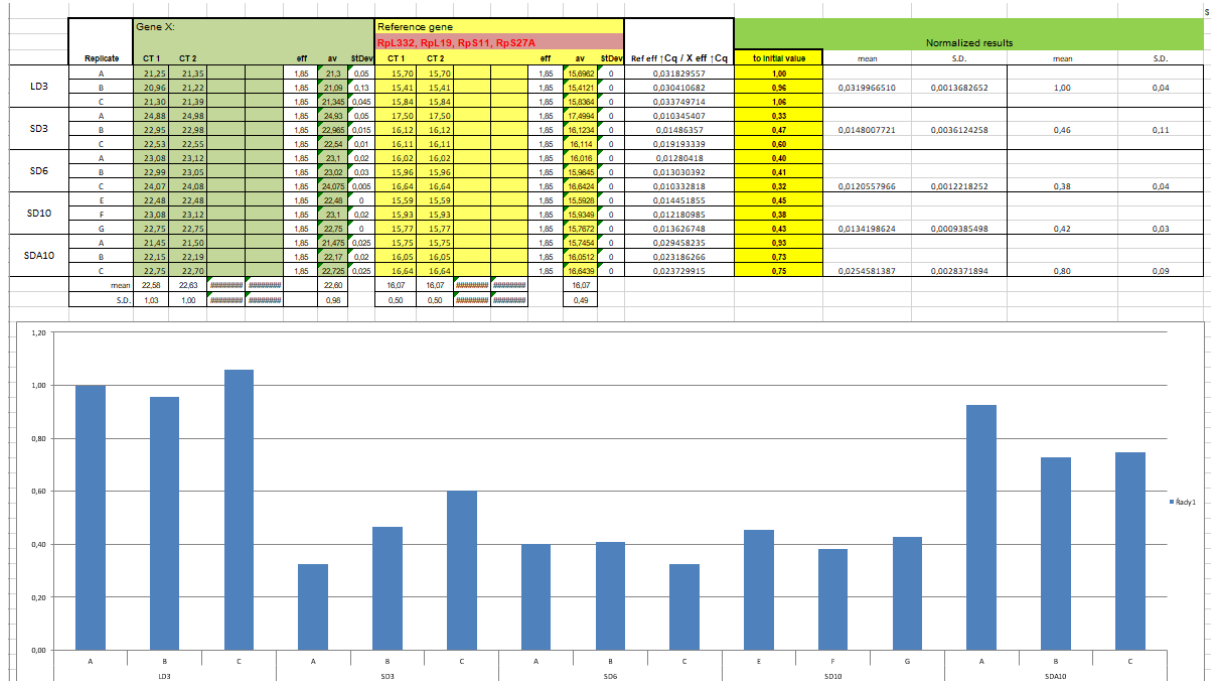
Na obr. 28 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *GLH*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,0342726902	0,0278289304	0,0289392311	0,0283781043	0,0201017643



Obr. 28: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *GLH*.

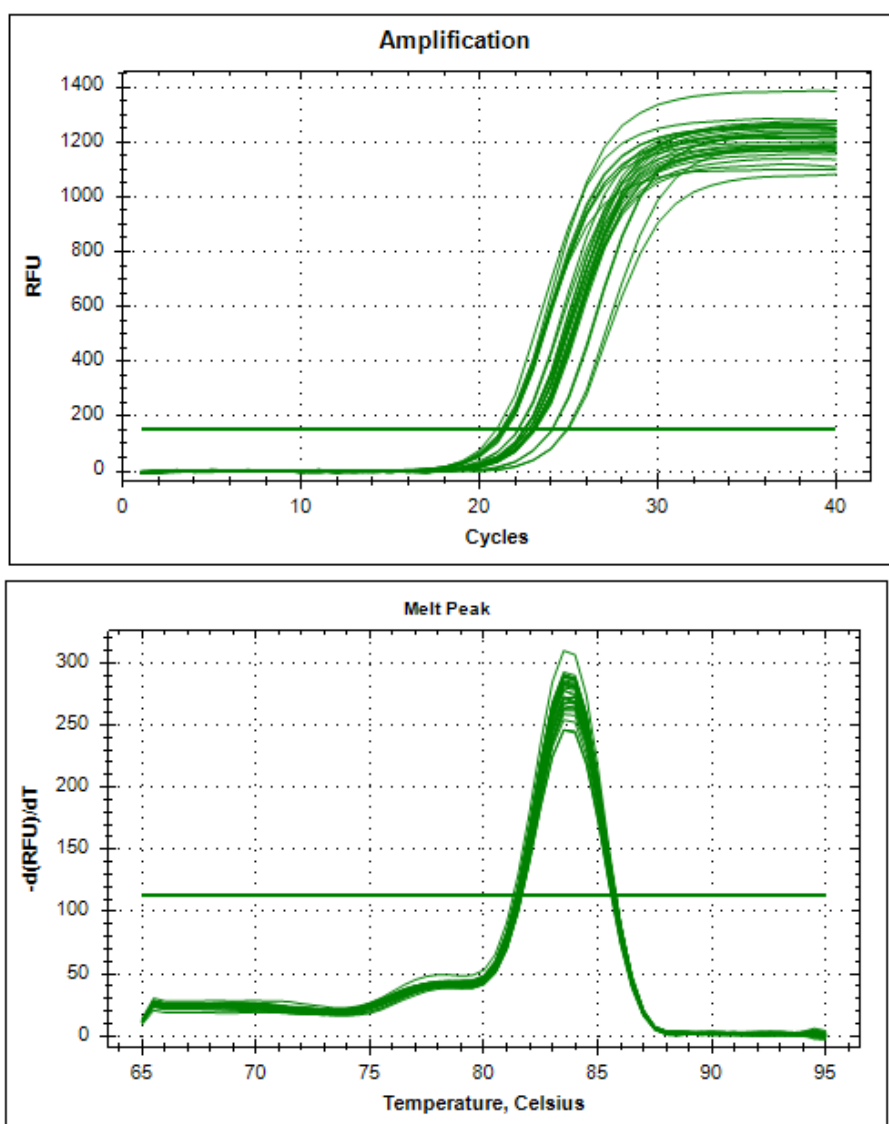
Obr. 29 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *Gluconate dehydrogenase (Pgd)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Expresí genů je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



Obr. 29: tabulka a graf s výsledky *Gluconate dehydrogenase (Pgd)*.

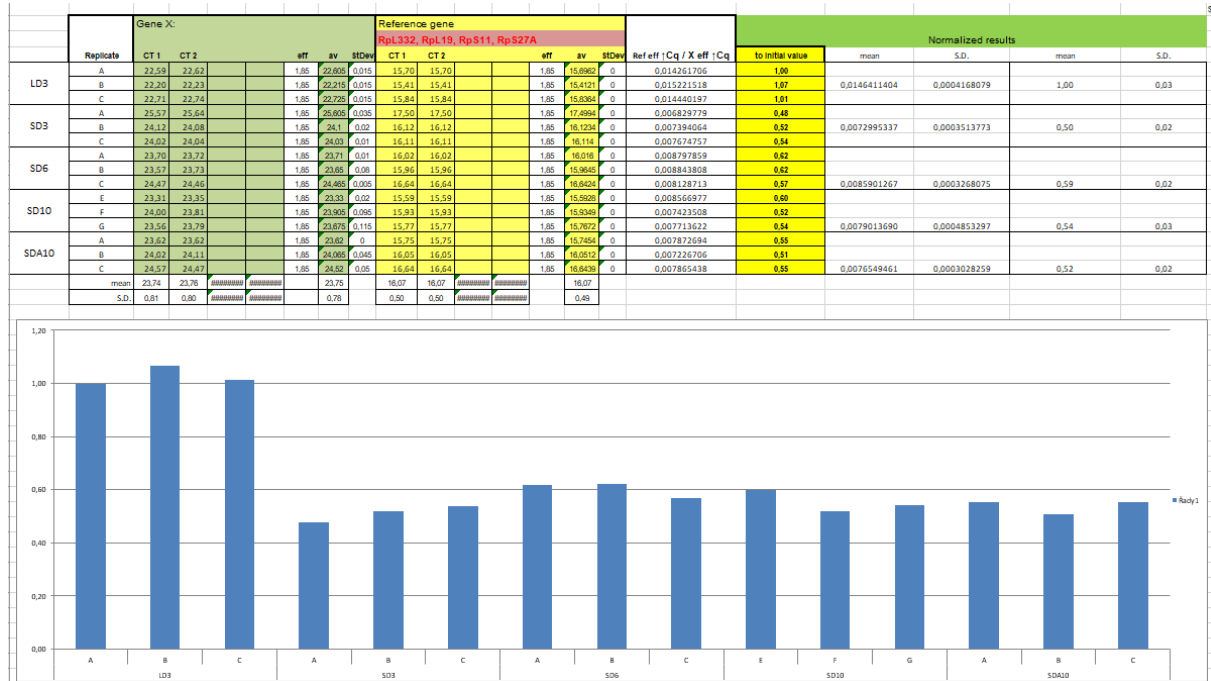
Na obr. 30 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *Pgd*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,0319966510	0,0148007721	0,0120557966	0,0134198624	0,0254581387



Obr. 30: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *Pgd*.

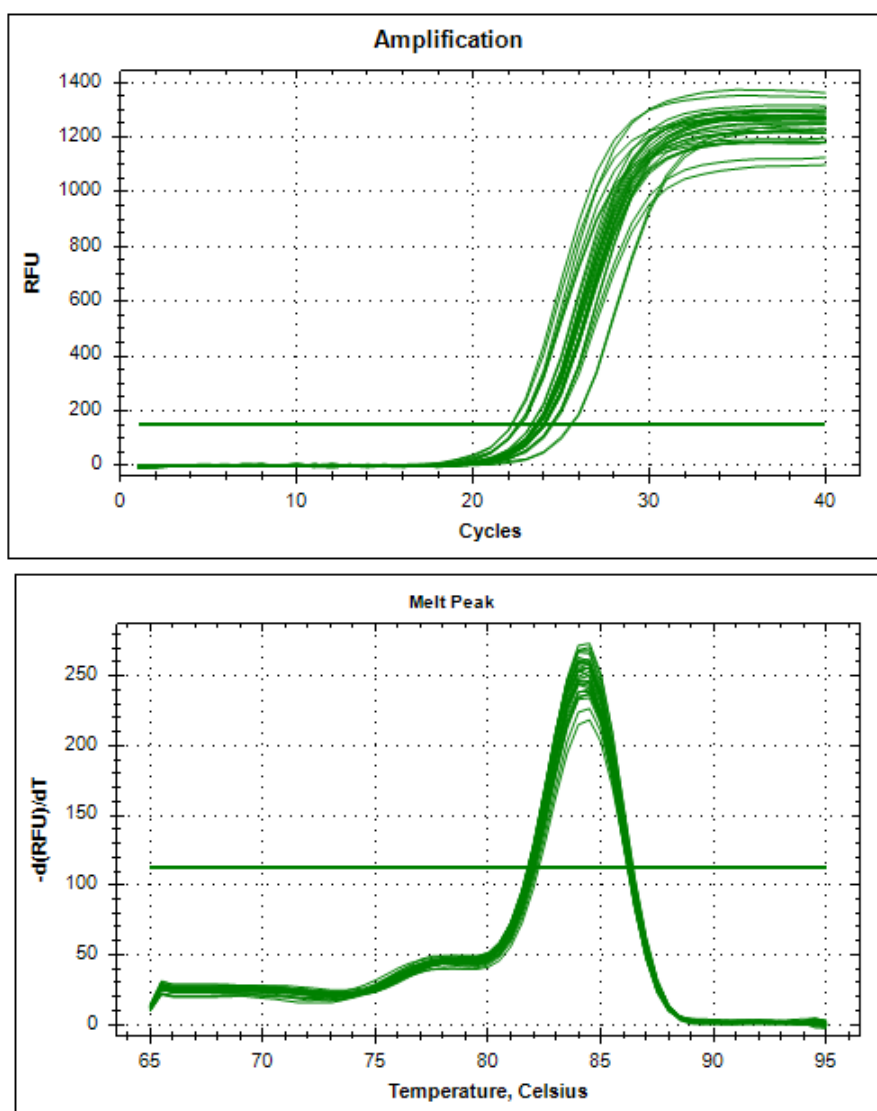
Obr. 31 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *Phosphopentose isomerase (Rpi F1)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Expresce genů je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



Obr. 31: tabulka a graf s výsledky Phosphopentose isomerase (*Rpi F1*).

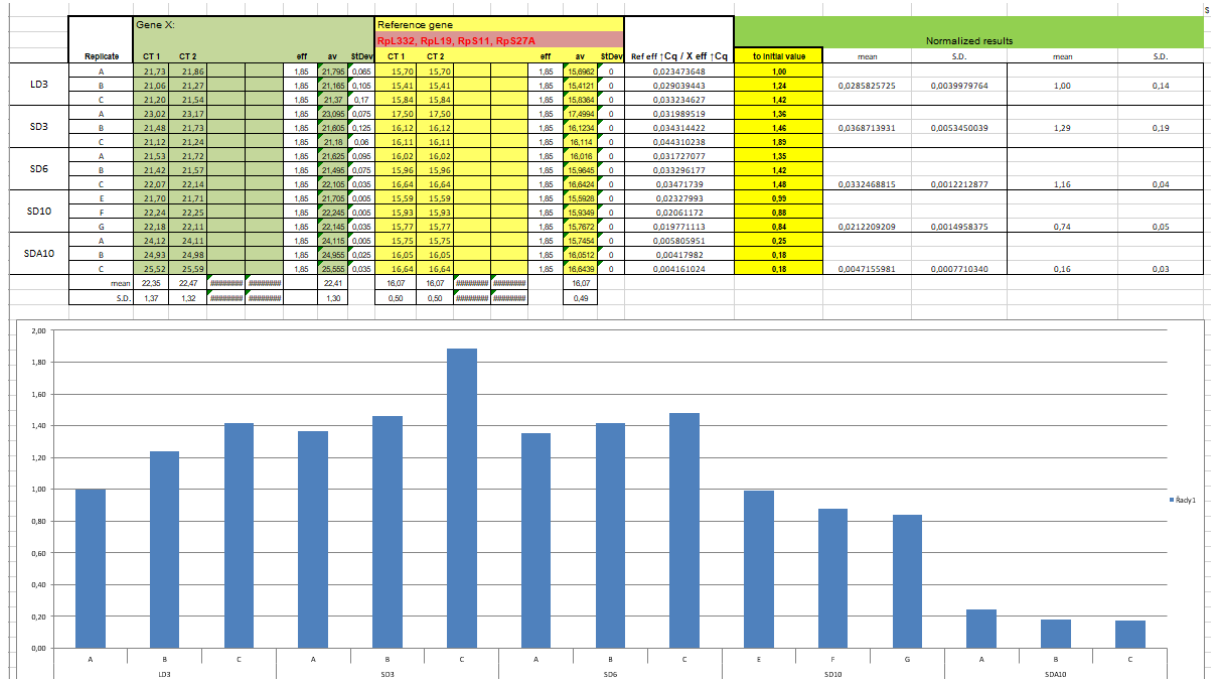
Na obr. 32 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *Rpi F1*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,0146411404	0,0072995337	0,0085901267	0,0079013690	0,0076549461



Obr. 32: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *Rpi F1*.

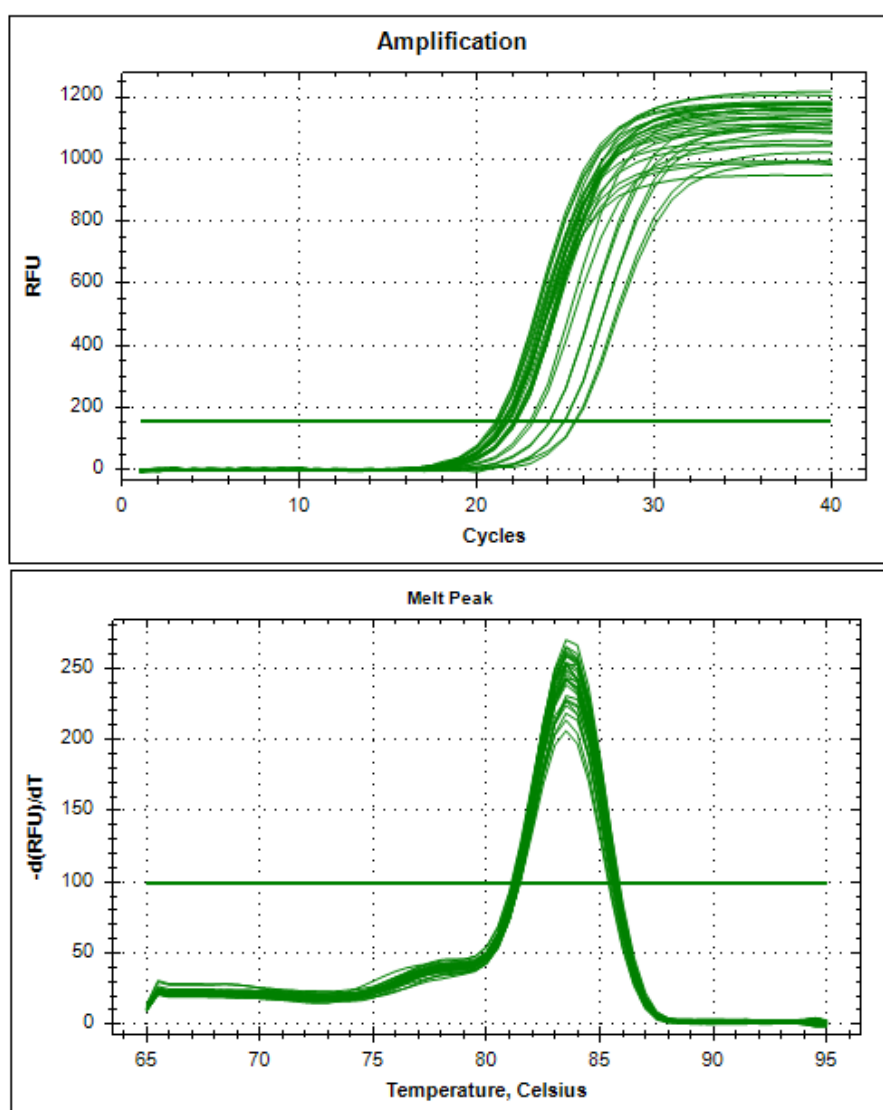
Obr. 33 znázorňuje tabulku s výsledky RT-qPCR. Tyto výsledky byly měřeny u larev LD3, SD3, SD6, SD10, SDA10 u transkriptu *Lactate dehydrogenase (LDH)*. Z tabulky lze vyčíst hodnoty ddct. Tyto hodnoty se převedly na barevnou škálu (obr. 35). Hodnoty CT byly získány v doubletech (CT1 a CT2) ve třech opakováních (A-C). Expresí genů je zobrazena na dolním sloupcovém grafu.



Obr. 33: tabulka a graf s výsledky *Lactate dehydrogenase (LDH)*.

Na obr. 34 lze v horní části vyčíst průměr výsledných hodnot ddct. Tyto průměrné hodnoty jsou v tabulce transkriptů obsahující barevnou škálu (obr. 35). Dále jsou zde znázorněny dva grafy. Z horního grafu lze vyčíst záznam snímání fluorescence v jednotlivých cyklech (dohromady 40 cyklů) za pomoci přístroje Light-Cycler. Z měřených vzorků (celé larvy *C. Costata*) byly získány hodnoty. Ze spodního grafu lze vyčíst melting analýzu pro *LDH*. Je zde vidět jeden peak s teplotou tání 80,5 °C.

Copy for heat map:				
LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
0,0285825725	0,0368713931	0,0332468815	0,0212209209	0,0047155981



Obr. 34: průměrné hodnoty ddct, grafy zobrazující snímání fluorescence v jednotlivých cyklech a melting analýzu pro *LDH*.

Na obrázku 35 lze vidět tabulku transkriptů s relativními četnostmi těchto transkriptů. Tyto četnosti byly vyhodnoceny nástrojem barevná škála v programu excel. Z tabulky lze vyčíst průměrné hodnoty u ddct u všech transkriptů. Díky těmto hodnotám vznikla barevná škála, která zobrazuje expresi transkriptů u odlišně aklimovaných larev modelového organismu *C. Costata*.

		LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
1	Glucose transporter 1	0,0239	0,0083	0,0123	0,0126	0,0117
2	Hexokinase A, F1 x R1	0,0526	0,0448	0,0453	0,0516	0,0299
3	Hexokinase C	0,0027	0,0010	0,0013	0,0025	0,0005
4	Glucose-6-P dehydrogenase	0,02283	0,018937	0,028206	0,032942	0,099344
5	Phosphoglucose isomerase	0,1811	0,2595	0,2392	0,1795	0,1351
6	Glycogen phosphorylase	0,2233	0,2547	0,3406	0,3618	0,2694
7	UTP-glucose-1-phosphate uridy	0,072635	0,048309	0,064888	0,061053	0,066873
8	Trehalose-6-P synthase 1, synt	0,02084	0,005879	0,006467	0,007826	0,026844
9	Trehalose-6-P synthase 1, phos	0,142014	0,039372	0,042936	0,058616	0,435307
10	Trehalose transporter 1-1	0,039804	0,023576	0,035446	0,043765	0,047737
11	Trehalase	0,030303	0,036984	0,040903	0,037574	0,010116
12	Gluconolactone hydrolase	0,034273	0,027829	0,028939	0,028378	0,020102
13	Gluconate dehydrogenase	0,031997	0,014801	0,012056	0,01342	0,025458
14	Phosphopentose isomerase	0,014641	0,0073	0,00859	0,007901	0,007655
15	Lactate dehydrogenase	0,028583	0,036871	0,033247	0,021221	0,004716

Obr. 35: Tabulka transkriptů včetně jejich relativních četností.

Na obrázku 36 je vlevo znázorněna tabulka metabolitů u odlišně aklimovaných larev u LD3, SD3, SD6, SD10 a SDA10. Vpravo lze vidět tabulku, která srovnává signál metabolitů ve tvaru log₂-fold, u larev, které jsou diapauzní SD10/SD3 a chladově aklimované SDA10/SD3.

	LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10	log ₂ -fold changes:	
						SD10 / SD3	SDA10 / SD3
Glucose	1781037	1791878	1781776	1827434	3965852	0,03	1,15
Glucose 6-P	1,94E+08	1,81E+08	1,48E+08	1,7E+08	1,3E+08	-0,09	-0,48
Glucose 1-P	1,63E+08	1,26E+08	1,04E+08	1,44E+08	1,41E+08	0,20	0,17
UDP glucose	10678629	9388782	24481073	45907766	37516861	2,29	2,00
Trehalose 6-P	2890848	1305259	1243055	1168871	2107592	-0,16	0,69
Trehalose	1,43E+09	1,43E+09	1,56E+09	1,55E+09	3,44E+09	0,11	1,26
Pyruvate	16659669	18205586	14322999	20214371	8674646	0,15	-1,07
Lactate	97779975	94910207	43237193	44009448	25771554	-1,11	-1,88
alpha-Ketoglutarate	5,04E+08	5,61E+08	5,11E+08	4,71E+08	2,95E+08	-0,25	-0,93
Gluconolactone-6-P	589800	773205,8	734397,3	754204,5	894035,5	-0,04	0,21
Gluconate-6-P	1547420	1194743	1976903	6970487	10104516	2,54	3,08
Ribulose-5-P	2081899	1462603	681447,8	1337908	824415,5	-0,13	-0,83
Ribose-5-P	2999107	2630051	2246560	2877908	3572142	0,13	0,44
Ribose	20690088	25734257	66785985	20367808	21633516	-0,34	-0,25

Obr. 36: Vlevo tabulka metabolitů, vpravo signál ve tvaru log₂-fold.

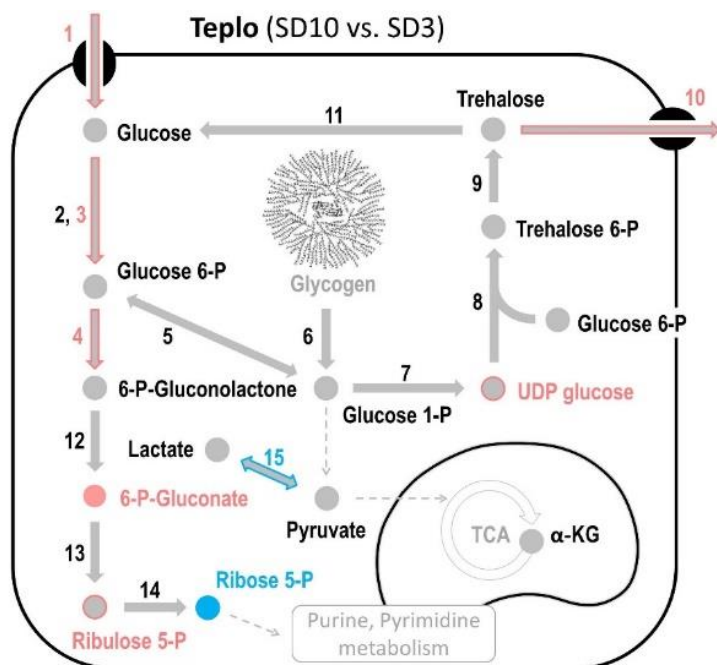
Obr. 37 znázorňuje v horní části relativní četnost transkriptů u odlišně aklimovaných larev u LD3, SD3, SD6, SD10 a SDA10. V dolní části obrázku je tabulka, která srovnává signál transkriptu ve tvaru log₂-fold, u diapauzních larev SD10/SD3 a u larev, které jsou chladově aklimované, SDA10/SD3.

		LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
1	Glucose transporter 1	0,0239	0,0083	0,0123	0,0126	0,0117
2	Hexokinase A, F1 x R1	0,0526	0,0448	0,0453	0,0516	0,0299
3	Hexokinase C	0,0027	0,0010	0,0013	0,0025	0,0005
4	Glucose-6-P dehydrogenase	0,02283	0,018937	0,028206	0,032942	0,099344
5	Phosphoglucose isomerase	0,1811	0,2595	0,2392	0,1795	0,1351
6	Glycogen phosphorylase	0,2233	0,2547	0,3406	0,3618	0,2694
7	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0,072635	0,048309	0,064888	0,061053	0,066873
8	Trehalose-6-P synthase 1, synthase activity	0,02084	0,005879	0,006467	0,007826	0,026844
9	Trehalose-6-P synthase 1, phosphatase activity	0,142014	0,039372	0,042936	0,058616	0,435307
10	Trehalose transporter 1-1	0,039804	0,023576	0,035446	0,043765	0,047737
11	Trehalase	0,030303	0,036984	0,040903	0,037574	0,010116
12	Gluconolactone hydrolase	0,034273	0,027829	0,028939	0,028378	0,020102
13	Gluconate dehydrogenase	0,031997	0,014801	0,012056	0,01342	0,025458
14	Phosphopentose isomerase	0,014641	0,0073	0,00859	0,007901	0,007655
15	Lactate dehydrogenase	0,028583	0,036871	0,033247	0,021221	0,004716

	SD10 / SD3	SDA10 / SD3	
Glucose transporter 1	0,60	0,51	1
Hexokinase A, F1 x R1	0,20	-0,58	2
Hexokinase C	1,33	-1,10	3
Glucose-6-P dehydrogenase	0,80	2,39	4
Phosphoglucose isomerase	-0,53	-0,94	5
Glycogen phosphorylase	0,51	0,08	6
UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0,34	0,47	7
Trehalose-6-P synthase 1, synthase activity	0,41	2,19	8
Trehalose-6-P synthase 1, phosphatase activity	0,57	3,47	9
Trehalose transporter 1-1	0,89	1,02	10
Trehalase	0,02	-1,87	11
Gluconolactone hydrolase	0,03	-0,47	12
Gluconate dehydrogenase	-0,14	0,78	13
Phosphopentose isomerase	0,11	0,07	14
Lactate dehydrogenase	-0,80	-2,97	15

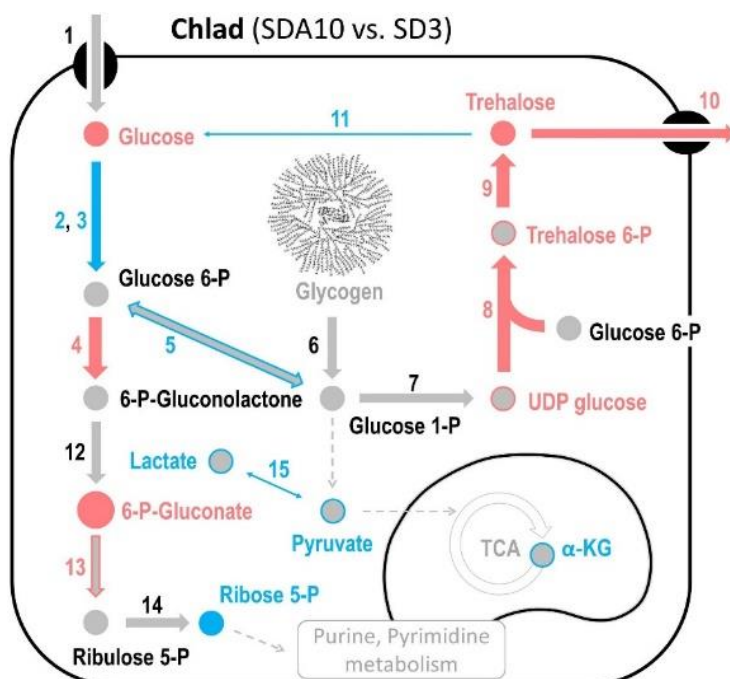
Obr. 37: relativní četnost transkriptů (horní část), dále signál transkriptu ve tvaru log₂-fold (dolní část).

Obr. 38 zobrazuje schéma metabolismu trehalózy za tepla včetně vybarvených metabolických drah vedoucích ke vzniku trehalózy. Schéma bylo vytvořeno na základě dat, která byla získána porovnáním relativní četnosti transkriptů u aklimovaných larev SD10 a SD3 z obr. 37.



Obr. 38: schéma metabolismu trehalózy za tepla.

Obr. 39 zobrazuje schéma metabolismu trehalózy za chladu včetně vybarvených metabolických drah vedoucích ke vzniku trehalózy. Schéma bylo vytvořeno na základě dat, která byla získána porovnáním relativní četnosti transkriptů u aklimovaných larev SD10 a SD3 z obr. 37.



Obr. 39: schéma metabolismu trehalózy za chladu.

Na obr. 40 je znázorněna legenda k obrázkům 38 a 39.



Obr. 40: legenda k obrázkům 38 a 39.

6. Diskuze

Data získaná v této diplomové práci jsou součástí širšího projektu, jehož cílem je objasnit fyziologické role několika metabolitů (prolin, trehalóza, glutamin, asparagin, betain), které se hromadí u chladově aklimovaných diapauzních larev *C. costata*. Protože akumulace těchto látek velmi dobře koreluje se zvyšující se chladovou odolností larev, existuje hypotéza, že tyto látky zásadně ovlivňují chladovou odolnost a fungují jako kryoprotektanty (Košťál et al., 2011; Rozsypal et al., 2018). Součástí projektu je analýza metabolických drah, které vedou k syntéze a akumulaci jednotlivých látek. Metabolické dráhy spojené s trehalózou jsou relativně jednoduché (Obr. 1). Tato práce je založená na analýze relativní četnosti mRNA transkriptů pro geny, které kódují jednotlivé metabolické enzymy, popřípadě transportní proteiny trehalózy.

Velkou výhodou analýzy transkriptů je její metodická robustnost a přitom relativní snadnost. Je možné v krátkém čase stanovit relativní četnosti mnoha různých transkriptů. Analýza genových produktů, tedy proteinů by byla mnohem náročnější. Analýza skutečných aktivit jednotlivých proteinů by trvala řádově delší dobu a pro některé proteiny ani nejsou vypracovány příslušné metody. Z tohoto pohledu je zřejmé, že transkriptomická analýza je obvykle první volbou při obecné charakterizaci nějakého biologického či patologického jevu. Velkou nevýhodou analýzy transkriptů je to, že mezi četností transkriptu a aktivitou jeho produktu (proteinu) leží množství dalších regulačních kroků a vztah mezi transkriptomem a produktem tak není vždy přímo úměrný. V případě, že jsou transkriptomická data doplněna o metabolickou analýzu a je zahrnut celý metabolický systém, může i transkriptomika výrazně pomoci k odhalení metabolických toků (fluxes) (Suarez and Moyes, 2012). Další podmínkou pro odhalení skutečných metabolických toků je to, že vzorky jsou odebírány v časových intervalech. Je třeba zachytit změnu koncentrací metabolitů a zároveň transkriptů v čase. Tuto podmínku jsme v této práci alespoň částečně dodrželi odebráním celkem čtyř různých aklimačních stavů (SD3, SD6, SD10, SDA10), které se navzájem lišily mimo jiné právě i v čase. Další věc, která ovlivňuje metabolické toky, je tkáňově specifický přístup. Jednotlivé tkáně se často výrazně liší svou metabolickou aktivitou. U hmyzu je hlavní skladovací a syntetickou tkání tukové těleso, které spojuje funkce jater a bílé tukové tkáně obratlovců (Wigglesworth, 2012). V naší práci jsme ovšem použili extrakty z celých larválních těl. Při tomto přístupu ale existuje riziko, že změny na úrovni tkání se navzájem anulují. Nepředpokládáme, že toto riziko by bylo příliš vysoké v případě sledovaných metabolitů (včetně trehalózy). Jedná se o látky, které se hromadí v obrovském množství (sumárně až 0,5 molu na kg) a ve všech tkáních (Košťál et al., 2011). V případě transkriptů mohou být naše

výsledky zatíženy chybou plynoucí z analýzy celých larev. Přes všechny uvedené limity se podařilo získat výsledky, které jasně ukazují velký rozdíl v metabolismu trehalózy u diapauzních larev vystavených teplu (18°C) a chladu (4°C). Tyto rozdíly jsou vidět na první pohled porovnáním výsledných metabolických map na obr 38 a 39. V teple aklimované larvy vykazují prakticky pouze tři změny na úrovni anabolismu trehalózy: slabou upregulaci transportéru glukózy (1), hexokinázy C (3) a glukózo 6-P dehydrogenázy (4), (Obr. 38). Aktivita hexokinázy je potřebná pro fosforylaci glukózy, která se tak stává aktivní molekulou vstupující do glykolýzy. Glukózo 6-P dehydrogenáza je prvním a klíčovým enzymem fosfátového cyklu, který produkuje redukující sílu (NADP) a například také stavební kameny nukleových kyselin (ribózu). U chladově aklimovaných larev jsou obě hexokinázy A a C silně downregulovány (2, 3). Navíc je downregulován i transkript pro glukózo 6-P izomerázu (5). Naopak glukózo 6-P dehydrogenáza (4) je silně upregulována. Tyto změny u chladově aklimovaných larev lze souhrně hypoteticky interpretovat jako útlum metabolismu glukózy, která vstupuje do buňky z vnějšku. Tedy útlum produkce energie z glukózy ve formě ATP. Tato energie není pro chladově aklimované larvy potřebná – jsou v hluboké diapauze a navíc za nízké tělní teploty. Část glukózy se tak zřejmě hromadí ve formě 6-P glukonátu (Obr. 39).

U chladově aklimovaných larev dále vidíme zřetelnou upregulaci dvou enzymů které finálně syntetizují trehalózu ze dvou molekul glukózy (jedna přichází ve formě glukózo 1-P a druhá je aktivována uridinem, UDP). Tyto enzymy jsou: trehalózo 6-P syntetáza (8) a trehalózo 6-P fosfatáza (9) (Obr 39). Jejich upregulace je logická v souvislosti s nadprodukcí a hromaděním trehalózy u chladově aklimovaných larev. Stejně tak je logická silná upregulace trehalózového transportéru (10), který trehalózu syntetizovanou převážně v tukovém tělese může odvádět do hemolymfy (jak je to naznačeno na obrázku), ale zároveň může v jiných tkáních umožňovat vstup trehalózy. Navíc, chladově aklimované larvy vykazují silnou downregulaci trehalázy, tedy enzymu, který štěpí trehalózu zpět na dvě glukózové jednotky. Inhibice tohoto enzymu opět logicky zapadá do situace, kdy se trehalóza hromadí.

Stále ovšem není jasný původ glukózových jednotek, které jsou použity pro syntézu trehalózy. Očekávali jsme, že transkriptomická analýza naznačí silnou upregulaci transkriptu pro glykogen fosforylázu (6) u chladově aklimovaných larev. Glykogen je v literatuře často uváděn jako zdroj pro syntézu různých kryoprotektantů jako je sorbitol, glycerol, inositol nebo právě trehalóza (Storey and Storey, 1991). Odštěpení glukózy od glykogenu nevyžaduje energii, protože fosfátová skupina nepochází z ATP ale z anorganického fosfátu. To je výhodné v situaci, kdy je potřebné zároveň šetřit energii a zároveň vyrábět kryoprotektivní molekuly. To

je právě případ diapauzní chladově aklimované larvy *C. costata*. Naše výsledky pouze nepřímo naznačují, že glykogen je substrátem pro syntézu trehalózy: 1) metabolismus alternativního substrátu, tedy glukózy pocházející z hemolymfy, je utlumen (viz výše); 2) četnost transkriptu glykogen fosforylázy není sice zvýšená ale je relativně nejvyšší ze všech sledovaných transkriptů (heat mapa na Obr 37); aktivita glykogen fosforylázy jako enzymu je závislá na vzájemném poměru aktivní (a) a inaktivní (b) formy. Konverze těchto forem je řízená známou amplifikační kaskádou: signál → cAMP → PKA → glykogen fosforyláza kináza → glykogen fosforyláza (b) → (a) (Champe and Harvey, 1994). Aktivita glykogen fosforylázy tak nejspíš není regulována na transkripční úrovni (je stále vysoká), ale na úrovni fosforylace.

V případě trehalózy se jedná o poměrně jednoduchý metabolismus a jeho interpretace z transkriptomicko-metabolomických dat u *C. costata* je poměrně přímočará. Mnoho elementů metabolismu trehalózy je ovšem propojeno s metabolismy dalších látek jako je prolin a další aminokyseliny a betain. Výsledná interpretace tak musí vycházet ze souhrnu všech známých dat, která byla paralelně získána pro další metabolismy. Tato interpretace by už ovšem výrazně přesahovala rámec diplomové práce. Ve stručnosti jen uvádím, že celkový výsledek naznačuje, že všechny kryoprotektivní látky mají původ v makromolekulárních strukturách: trehalóza v glykogenu, aminokyseliny a zejména prolin v kolagenech extracelulární matrix, a betain ve fosfolipidických obalech tukových kapének.

7. Závěr

- ❖ Zvládla jsem komplexní metodiku stanovení relativní četnosti genových transkriptů v biologické matrici.
- ❖ Zvýšení koncentrace trehalózy u chladově aklimovaných larev *C. costata* bylo doprovázeno:
 - zvýšením relativní četnosti mRNA transkriptů:
 - trehalózo 6-P syntetázy
 - trehalózo 6-P fosfatázy
 - trehalózového transportéru
 - snížením relativní četnosti mRNA transkriptů:
 - trehalázy.
- ❖ Transkriptomická analýza nepřinesla jasný výsledek ohledně zdroje glukózových jednotek pro syntézu trehalózy.

8. Literatura

Adis, J., & Junk, W. J. (2002). Terrestrial invertebrates inhabiting lowland river floodplains of Central Amazonia and Central Europe: a review. *Freshwater Biology*, 47(4), 711-731.

Andrewartha, H. G. (1952). Diapause in relation to the ecology of insects. *Biological Reviews*, 27(1), 50-107.

Angell, A. (1982). Supercooled water in *Water: A Comprehensive Treatise*, edited by F. Franks, vol. 7. New Yourk: Plenum Press, pp. 1-81.

Block W. (2002) *Eur. J. Entomol.* 99, 259-266.

Bolen, D. W., & Baskakov, I. V. (2001). The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *Journal of molecular biology*, 310(5), 955-963.

Brand, M. D. (1997). Regulation analysis of energy metabolism. *Journal of Experimental Biology*, 200(2), 193-202.

Clark, M. S., Thorne, M. A., Purać, J., Burns, G., Hillyard, G., Popović, Ž. D., Gordana, G. L., & Worland, M. R. (2009). Surviving the cold: molecular analyses of insect cryoprotective dehydration in the Arctic springtail *Megaphorura arctica* (Tullberg). *BMC genomics*, 10(1), 328.

Clegg, J. S. (2001). Cryptobiosis—a peculiar state of biological organization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 128(4), 613-624.

Connett, R. J. (1988). Analysis of metabolic control: new insights using scaled creatine kinase model. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 254(6), R949-R959.

Cossins A.R. (ed.) (1994) *Temperature Adaptations of Biological Membranes*. Portland Press, London and Chapel Hill.

Crowe, J. H. (2007). Trehalose as a “chemical chaperone”. In *Molecular aspects of the stress response: chaperones, membranes and networks* (pp. 143-158). Springer, New York, NY.

- Danks, H. V. (1987). Insect dormancy: an ecological perspective. biological survey of Canada (Terrestrial Arthropods). *Natural Museum of Natural Sciences, Ottawa, Canada*.
- Denlinger, D. L. (1986). Dormancy in tropical insects. *Annual review of entomology*, 31(1), 239-264.
- Denlinger, D. L. (1991). Relationship between cold hardiness and diapause. In *Insects at low temperature* (pp. 174-198). Springer, Boston, MA.
- Denlinger, D. L. (2002). Regulation of diapause. *Annual review of entomology*, 47(1), 93-122.
- Denlinger, D. L., & Lee Jr, R. E. (Eds.). (2010). *Low temperature biology of insects*. Cambridge University Press.
- Des Marteaux, L. E., Hůla, P., & Košťál, V. (2019). Transcriptional analysis of insect extreme freeze tolerance. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1913), 20192019.
- Des Marteaux, L. E., Hůla, P., & Košťál, V. (2019). Transcriptional analysis of insect extreme freeze tolerance. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1913), 20192019.
- Duman, J. G. (2001). Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 327-357.
- Enomoto, O. (1981). Larval Diapause in *Chymomyza Costata* (Diptera : Drosophilidae) II. Frost Avoidance. *Low Temp. Sci., Ser. B36*: 31-39.
- Fuller, B. J., Lane, N., & Benson, E. E. (Eds.). (2004). *Life in the frozen state*. Boca Raton: CRC press.
- Gehrken, U. (1984). Winter survival of an adult bark beetle *Ips acuminatus* Gyll. *Journal of insect physiology*, 30(5), 421-429.
- Gerisch, B., Weitzel, C., Kober-Eisermann, C., Rottiers, V., & Antebi, A. (2001). A hormonal signaling pathway influencing *C. elegans* metabolism, reproductive development, and life span. *Developmental cell*, 1(6), 841-851.
- Godfray, H. C. J., & Hassell, M. P. (1987). Natural enemies may be a cause of discrete generations in tropical insects. *Nature*, 327(6118), 144.

- Guppy, M., Fuery, C. J., & Flanigan, J. E. (1994). Biochemical principles of metabolic depression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 109(2-3), 175-189.
- Hadley, N. F. (1994). *Water Relations of Terrestrial Arthropods*. Academic Press, San Diego, 356 p.
- Hågvar, S. (2010). A review of Fennoscandian arthropods living on and in snow. *European Journal of Entomology*, 107(3), 281.
- Hazel, J. R. (1997). Thermal adaptation in biological membranes: beyond homeoviscous adaptation. In *Advances in molecular and cell biology* (Vol. 19, pp. 57-101). Elsevier.
- Heinrich, B. (1993). Heat Managers.(Book Reviews: The Hot-Blooded Insects. Strategies and Mechanisms of Thermoregulation.). *Science*, 260, 1155-1156.
- Hekimi, S., Lakowski, B., Barnes, T. M., & Ewbank, J. J. (1998). Molecular genetics of life span in *C. elegans*: how much does it teach us?. *Trends in Genetics*, 14(1), 14-20.
- Hodek, I. (1996). Diapause development, diapause termination and the end of diapause. *European Journal of Entomology* 93, 475–487.
- Hodek, I. (2013). Controversial aspects of diapause development. *EJE*, 99(2), 163-173.
- Hodkova, M., & Hodek, I. (1997). Temperature regulation of supercooling and gut nucleation in relation to diapause of *Pyrrhocoris apterus* (L.)(Heteroptera). *Cryobiology*, 34(1), 70-79.
- Hochachka, P. W. (1985). Assessing metabolic strategies for surviving o-2 lack-role of metabolic arrest coupled with channel arrest. *Molecular Physiology*, 8(3), 331-350.
- Hochachka, P. W. (1986). Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*, 231(4735), 234-241.
- Holmstrup, M., & Westh, P. (1994). Dehydration of earthworm cocoons exposed to cold: a novel cold hardiness mechanism. *Journal of Comparative Physiology B*, 164(4), 312-315.
- Houthoofd, K., Braeckman, B., De Vreese, A., Van Eygen, S., Lenaerts, I., Brys, K., Matthijssens, F., & Vanfleteren, J. (2004). Caloric restriction, Ins/IGF-1 signalling and longevity in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Belgian journal of zoology*, 134(2), 79-84.

Champe, C.P. and Harvey, A.R. (1994). *Biochemistry*. 2nd edition, J.B.Lippincott Company, Philadelphia, USA.

Chown, S. L., & Davis, A. L. (2003). Discontinuous gas exchange and the significance of respiratory water loss in scarabaeine beetles. *Journal of Experimental Biology*, 206(20), 3547-3556.

Johnsen, S., Gutierrez, A. P., & Jorgensen, J. (1997). Overwintering in the cabbage root fly *Delia radicum*: A dynamic model of temperature-dependent dormancy and post-dormancy development. *Journal of applied ecology*, 21-28.

Jönsson, K. I. (2001). The Nature of Selection on Anhydrobiotic Capacity in Tardigrades. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 240(3-4), 409-417.

Keilin, D. (1959). The Leeuwenhoek Lecture-The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 150(939), 149-191.

Košťál V., Tollarová M., Šula J. (2004a) *J. Insect Physiol.* 50, 303-313.

Košťál, V. (2006). Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of insect physiology*, 52(2), 113-127.

Košťál, V. (2010). Cell structural modifications in insects at low temperature. *Low temperature biology of insects*, 116-140.

Košťál, V., Korbelová, J., Poupardin, R., Moos, M., & Šimek, P. (2016). Arginine and proline applied as food additives stimulate high freeze tolerance in larvae of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 219(15), 2358-2367.

Košťál, V., Mollaei, M., & Schöttner, K. (2016). Diapause induction as an interplay between seasonal token stimuli, and modifying and directly limiting factors: hibernation in *Chymomyza costata*. *Physiological Entomology*, 41(4), 344-357.

Košťál, V., Noguchi, H., Shimada, K., & Hayakawa, Y. (2000). Circadian component influences the photoperiodic induction of diapause in a drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal of insect physiology*, 46(6), 887-896.

- Koštál, V., Šimek, P., Zahradníčková, H., Cimlová, J., & Štětina, T. (2012). Conversion of the chill susceptible fruit fly larva (*Drosophila melanogaster*) to a freeze tolerant organism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(9), 3270-3274.
- Koštál, V., Šimůnková, P., Kobelková, A., & Shimada, K. (2009). Cell cycle arrest as a hallmark of insect diapause: changes in gene transcription during diapause induction in the drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Insect biochemistry and molecular biology*, *39*(12), 875-883.
- Koštál, V., Štětina, T., Poupardin, R., Korbelová, J., & Bruce, A. W. (2017). Conceptual framework of the eco-physiological phases of insect diapause development justified by transcriptomic profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(32), 8532-8537.
- Koštál, V., Vambera, J., & Bastl, J. (2004). On the nature of pre-freeze mortality in insects: water balance, ion homeostasis and energy charge in the adults of *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Experimental Biology*, *207*(9), 1509-1521.
- Koštál, V., Zahradníčková, H., & Šimek, P. (2011). Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(32), 13041-13046.
- Koštál, V., Zahradníčková, H., & Šimek, P. (2011). Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(32), 13041-13046.
- Koštál, V., Zahradníčková, H., & Šimek, P. (2011). Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(32), 13041-13046.
- Kristiansen, E., & Zachariassen, K. E. (2001). Effect of freezing on the transmembrane distribution of ions in freeze-tolerant larvae of the wood fly *Xylophagus cinctus* (Diptera, Xylophagidae). *Journal of Insect Physiology*, *47*(6), 585-592.
- Lees, A. D. (1955). *The physiology of diapause in arthropods*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, 150pp.

- Lefevre, K. S., & De Kort, C. A. D. (1989). Adult diapause in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: effects of external factors on maintenance, termination and post-diapause development. *Physiological Entomology*, 14(3), 299-308.
- Masaki, S. (1980). Summer diapause. *Annual Review of Entomology*, 25(1), 1-25.
- Matyash, V., Entchev, E. V., Mende, F., Wilsch-Bräuninger, M., Thiele, C., Schmidt, A. W., Knölker, H. J., Ward, S., & Kurzchalia, T. V. (2004). Sterol-derived hormone (s) controls entry into diapause in *Caenorhabditis elegans* by consecutive activation of DAF-12 and DAF-16. *PLoS biology*, 2(10), e280.
- Meryman, H. T. (1971). Osmotic stress as a mechanism of freezing injury. *Cryobiology*, 8(5), 489-500.
- Muldrew, K., Acker, J. P., Elliott, J. A., & McGann, L. E. (2004). The water to ice transition: implications for living cells. In *Life in the frozen state* (pp. 93-134). CRC Press.
- Nakamura, K., & Numata, H. (2000). Photoperiodic control of the intensity of diapause and diapause development in the bean bug, *Riptortus clavatus* (Heteroptera: Alydidae). *European Journal of Entomology*, 97(1), 19-24.
- Numata, H., Shiga, S., & Morita, A. (1997). Photoperiodic receptors in arthropods. *Zoological science*, 14(2), 187-198.
- Okuda, T. (1990). Significance of water contact as a factor terminating larval diapause in a stem borer, *Busseola fusca*. *Entomologia experimentalis et applicata*, 57(2), 151-155.
- Phang, J. M., Liu, W., Hancock, C. N., & Fischer, J. W. (2015). Proline metabolism and cancer: emerging links to glutamine and collagen. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care*, 18(1), 71.
- Poupardin, R., Schöttner, K., Korbelová, J., Provazník, J., Doležel, D., Pavlinic, D., Beneš, V., & Košťál, V. (2015). Early transcriptional events linked to induction of diapause revealed by RNAseq in larvae of drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *BMC genomics*, 16(1), 720.
- Privalov, P. L. (1990). Cold denaturation of protein. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 25(4), 281-306.

- Reyes-DelaTorre, A., Peña-Rangel, M. T., & Riesgo-Escovar, J. R. (2012). Carbohydrate metabolism in *Drosophila*: reliance on the disaccharide trehalose. In *Carbohydrates-comprehensive studies on glycobiology and glycotecchnology*. IntechOpen.
- Riihimaa, A. J., & Kimura, M. T. (1989). Genetics of the photoperiodic larval diapause in *Chymomyza costata* (Diptera; Drosophilidae). *Hereditas*, *110*(3), 193-200.
- Rinehart, J. P., Yocum, G. D., & Denlinger, D. L. (2000). Developmental upregulation of inducible hsp70 transcripts, but not the cognate form, during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Insect biochemistry and molecular biology*, *30*(6), 515-521.
- Rozsypal, J. (2015). The role of water, ice nucleators, and inoculation in insect cold survival. *Open access insect physiol*, *5*, 21-30.
- Rozsypal, J., & Košťál, V. (2018). Supercooling and freezing as eco-physiological alternatives rather than mutually exclusive strategies: A case study in *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of insect physiology*, *111*, 53-62.
- Rozsypal, J., Moos, M., Šimek, P., & Košťál, V. (2018). Thermal analysis of ice and glass transitions in insects that do and do not survive freezing. *Journal of Experimental Biology*, *221*(7), jeb170464.
- Rudolph, A. S., & Crowe, J. H. (1986). A calorimetric and infrared spectroscopic study of the stabilizing solute proline. *Biophysical journal*, *50*(3), 423-430.
- Salt, R. W. (1961). Principles of insect cold-hardiness. *Annual review of entomology*, *6*(1), 55-74.
- Saunders, D. S. (1981). Insect photoperiodism - the clock and the counter: a review. *Physiological Entomology*, *6*(1), 99-116.
- Sformo, T., Walters, K., Jeannet, K., Wowk, B., Fahy, G. M., Barnes, B. M., & Duman, J. G. (2010). Deep supercooling, vitrification and limited survival to -100 C in the Alaskan beetle *Cucujus clavipes puniceus* (Coleoptera: Cucujidae) larvae. *Journal of Experimental Biology*, *213*(3), 502-509.
- Shimada, K., & Riihimaa, A. (1988). Cold Acclimation, Inoculative Freezing and Slow Cooling: Essential Factors Contributing to the Freezing-Tolerance in Diapausing Larvae of

Chymomyza Costata (Diptera: Drosophilidae). Cryo-Letters, 7, Wooton Way, Cambridge CB3 9LX, U. K.

Sørensen, J. G., & Holmstrup, M. (2011). Cryoprotective dehydration is widespread in Arctic springtails. *Journal of insect physiology*, 57(8), 1147-1153.

Stehlík, J., Závodská, R., Shimada, K., Šauman, I., & Košťál, V. (2008). Photoperiodic induction of diapause requires regulated transcription of timeless in the larval brain of *Chymomyza costata*. *Journal of Biological Rhythms*, 23(2), 129-139.

Storey K.B., Storey J.M. (1991) In: Lee R.E.Jr., Denlinger D.L. (eds): *Insects at Low Temperature*. Chapman and Hall, New York and London, pp. 64-93.

Storey, K. B., & Storey, J. M. (1990). Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *The Quarterly Review of Biology*, 65(2), 145-174.

Suarez, R. K., & Moyes, C. D. (2012). Metabolism in the age of 'omes'. *Journal of Experimental Biology*, 215(14), 2351-2357.

Šlachta, M., Vambera, J., Zahradníčková, H., & Košťál, V. (2002). Entering diapause is a prerequisite for successful cold-acclimation in adult *Graphosoma lineatum* (Heteroptera: Pentatomidae). *Journal of Insect Physiology*, 48(11), 1031-1039.

Tanaka, S. (2000). The role of moisture in the control of diapause, mating and aggregation in a tropical insect. *Entomological Science*, 3(1), 147-155.

Tauber, M. J., & Tauber, C. A. (1976). Insect seasonality: diapause maintenance, termination, and postdiapause development. *Annual review of entomology*, 21(1), 81-107.

Tauber, M. J., Tauber, C. A., & Masaki, S. (1986). *Seasonal adaptations of insects*. Oxford University Press on Demand.

Topp, W. (1990). Selection for an optimal monovoltine life cycle in an unpredictable environment. Studies on the beetle *Catops nigricans* Spence (Col., Catopidae). *Oecologia*, 84(1), 134-141.

Toxopeus, J., & Sinclair, B. J. (2018). Mechanisms underlying insect freeze tolerance. *Biological Reviews*, 93(4), 1891-1914.

Varjas, L., & Saringer, G. (1998). Oxygen consumption as an indicator of diapause intensity in pupae of *Iacnobia oleracea* and *Mamestra brassicae* reared at different inductive photoperiods. *Acta phytopathologica et entomologica hungarica*, 33(1-2), 147-151.

Vinogradova, E. B. (1974). The pattern of reactivation of diapausing larvae in the blowfly, *Calliphora vicina*. *Journal of Insect Physiology*, 20(12), 2487-2496.

Watanabe, M., Kikawada, T., Minagawa, N., Yukuhiro, F., & Okuda, T. (2002). Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. *Journal of Experimental Biology*, 205(18), 2799-2802.

Wigglesworth, V. B. (2012). *The principles of insect physiology*. Springer Science & Business Media.

Wipking, W. (1995). Influences of daylength and temperature on the period of diapause and its ending process in dormant larvae of burnet moths (Lepidoptera, Zygaenidae). *Oecologia*, 102(2), 202-210.

Wolda, H. (1988). Insect seasonality: why?. *Annual review of ecology and systematics*, 19(1), 1-18.

Wright, J. C. (2001). Cryptobiosis 300 years on from van Leeuwenhoek: what have we learned about tardigrades?. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 240(3-4), 563-582.

Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., & Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217(4566), 1214-1222.

Zachariassen, K. E. (1985). Physiology of cold tolerance in insects. *Physiological reviews*, 65(4), 799-832.

Zhang, L., Xue, X., Yan, J., Yan, L. Y., Jin, X. H., Zhu, X. H., & Qiao, J. (2016). L-proline: a highly effective cryoprotectant for mouse oocyte vitrification. *Scientific reports*, 6, 26326.