

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

**Neuroanatomie proteinu Timeless a jeho funkce  
v cirkadiánních a fotoperiodických hodinách  
larvy octomilky, *Chymomyza costata***

Diplomová práce

**Bc. Aneta Sládková**

Školitel: Mgr. Hana Sehadová, Ph.D.

Konzultant: prof. Ing. Vladimír Košťál, CSc.

České Budějovice 2020

Sládková, A., 2020: Neuroanatomie proteinu Timeless a jeho funkce v cirkadiánních a fotoperiodických hodinách larvy octomilky, *Chymomyza costata*. [Neuroanatomy of the protein Timeless and his function in circadian and photoperiodic clock of the fruitfly larvae, *Chymomyza costata*. Mgr. Thesis in Czech] – 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, The Czech Republic.

Annotation:

Control of the vital functions of photoperiodically sensitive organisms depends on the correct synergism of the circadian and photoperiodic clocks. The relationship between these two timekeeping systems was studied in photoperiodically sensitive larvae of the fruitfly, *Chymomyza costata*. The distribution of the Tim protein was observed in their central nervous system, which is believed to play a crucial role in both types of the above-mentioned oscillators. Tim positive cells were detected in both the central brain and the ventral ganglion. The absence of the Tim protein in the central oscillator cells indicates a different way of regulating the circadian clock than in the *D. melanogaster* model. The centre of the photoperiodic clock could be located in the abdominal part of the ventral ganglion, where 5-6 bilateral pairs of the Tim-positive neurons were detected, with one neuron from each pair in direct contact with serotonin-containing neurons. Serotonin, as a biogenic amine that controls the synthesis of melatonin, plays a potential role in the diapause induction. Since the expression of Cry in the circadian clock in *C. costata* shows changes in different photoperiodic regimes, it can be assumed that although the circadian and photoperiodic clock systems are located in different parts of the CNS, they share an input pathway.

Prohlášení:

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

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

V Českých Budějovicích dne 22. května 2020

.....

Aneta Sládková

### Poděkování:

Chtěla bych poděkovat především své školitelce Mgr. Haně Sehadové, Ph.D. za její odborné vedení, rady a trpělivost. Tímto bych také ráda poděkovala svému konzultantovi prof. Ing. Vladimíru Košťálovi, CSc. za možnost provádět experimenty v jeho laboratoři, za cenné rady a konzultace. Zároveň bych také ráda poděkovala všem členům naší laboratoře za pomoc a ochotu a vytvoření příjemného prostředí v laboratoři. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své sestře Kristýně Sládkové za pomoc při statistickém zpracování dat v diplomové práci a během celého studia a samozřejmě celé své rodině za psychickou a finanční podporu.

## Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Cirkadiánní hodiny hmyzu.....	1
1.1.1	Cirkadiánní hodiny octomilky <i>Drosophila melanogaster</i> .....	2
1.1.1.1	Vstupní dráha .....	3
1.1.1.2	Centrální oscilátor .....	3
1.1.1.3	Výstupní dráha .....	5
1.1.1.4	Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin .....	6
1.2	Fotoperiodické hodiny hmyzu .....	8
1.2.1	Struktura a mechanismus fotoperiodických hodin.....	9
1.2.1.1	Vstupní dráha .....	10
1.2.1.2	Centrum fotoperiodických hodin .....	10
1.2.1.3	Výstupní dráha .....	10
1.3	Vztah cirkadiánních a fotoperiodických hodin.....	11
1.4	<i>Chymomyza costata</i> , vhodný model pro studium vztahu cirkadiánního a fotoperiodického systému .....	12
2	Cíle práce.....	14
3	Materiál a metody.....	15
3.1	Laboratorní zvířata.....	15
3.2	Pitva a fixace tkáně .....	15
3.3	Imunohistochemie.....	15
3.3.1	Primární protilátky .....	16
3.3.2	Sekundární protilátky .....	17
3.3.3	Imunohistochemická lokalizace na totálních preparátech.....	17
3.3.4	Analýza získané fotodokumentace.....	18
3.3.5	Kvantifikace pozitivního signálu .....	18
4	Výsledky.....	19
4.1	Testování specifity protilátek proti Tim z <i>C. costata</i> .....	19
4.2	Imunohistochemická lokalizace proteinu Tim v mozku larvy <i>C. costata</i> .....	20
4.3	Imunohistochemická lokalizace serotoninu v mozku larvy <i>C. costata</i> .....	22
4.4	Určení vzájemné polohy Tim a serotonin pozitivních neuronů ve ventrálním gangliu v mozku larev <i>C. costata</i> .....	25

4.5	Stanovení intenzity signálu v serotonin pozitivních buňkách larev <i>C. costata</i> v různém stáří a fotoperiodických režimech .....	26
5	Diskuze.....	27
6	Závěr.....	30
7	Seznam použitých zkratk.....	31
8	Seznam použité literatury .....	32

# 1 Úvod

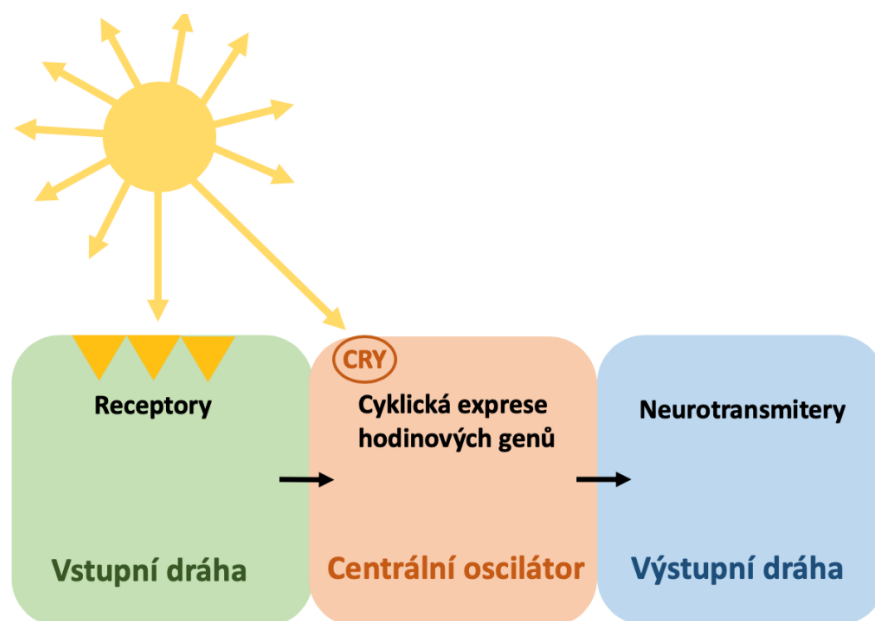
Důkladná synchronizace denních a sezónních biologických procesů s periodickými změnami vnějšího prostředí je důležitá pro dobrou kondici a přežití organismů. Přizpůsobit se denním a sezónním změnám vnějších podmínek, jako je foto – a termoperioda umožňují organismům jejich biologické hodiny. Zatímco cirkadiánní hodiny, které reagují na denní změny v prostředí jsou již detailně prostudovány, mechanismus hodin reagujících na sezónní změny není ještě důkladně prostudován. Přestože některé studie prokázaly zahrnutí komponent cirkadiánních hodin v hodinách fotoperiodických, není stále jasné, jestliže denní a sezónní hodiny pracují nezávisle nebo ve vzájemné interakci.

## 1.1 Cirkadiánní hodiny hmyzu

Biologické hodiny ovlivňující fyziologické funkce a chování organismu, které mají periodu přibližně 24 hodin se označují cirkadiánní hodiny (Sandrelli et al., 2008). Umožňují organismu přizpůsobit svůj vývoj, pohyb a rozmnožování denním změnám světla, teploty a faktorů vnějšího prostředí. Cirkadiánní hodiny mají několik základních vlastností (Saunders, 2002):

- mají endogenní charakter – běží nezávisle na vnějším prostředí, tj. za konstantních podmínek
- jsou teplotně kompenzované – běží se stejnou periodou v různých teplotních podmínkách nepřekračujících fyziologické hodnoty
- jsou synchronizovatelné s vnějším prostředím – perioda je nastavena působením vnějších faktorů (Zeitgeberů), z nichž nejvýznamnější je teplo a světlo

Mechanismus cirkadiánních hodin (Obr. 1) je tvořen vstupní dráhou, kterou jsou vnímány vnější podněty synchronizující oscilace v expresi genů centrálních hodin, které vyvolají specifickou odezvu organismu v tzv. výstupní dráze (Sandrelli et al., 2008; Tomioka et al., 2010; Helfrich-Förster, 2003).



**Obr. 1: Schématické znázornění cirkadiánních hodin.**

Cirkadiánní hodiny byly studovány u různých druhů hmyzu, například u motýla monarchy stěhovavého, *Danaus plexippus* (Zhu et al., 2005), dále zástupce z řádu blanokřídlých včela medonosná, *Apis mellifera* (Moritz et al., 1991; Rubin et al., 2006) nebo brouk potěmník hnědý, *Tribolium castaneum* (Cheng et al., 2018). Nicméně nejvíce informací o mechanismu cirkadiánních hodin přinesl až výzkum na modelovém organismu octomilky, *Drosophila melanogaster* (Saunders, 2002; Rosato et al. 2006;).

### 1.1.1 Cirkadiánní hodiny octomilky *Drosophila melanogaster*

Cirkadiánní hodiny octomilky se začaly studovat již v roce 1967 (Konopka a Benzer, 1971) kdy bylo navrženo, že periodické změny ve fyziologických procesech organismu jsou řízené kooperací specifických genů. Tento předpoklad byl prokázán studiem mutantů *D. melanogaster*, které vykazovaly absenci určitých vzorců chování, jako je ekloze nebo pohyb. Postupně byla objasněna molekulární podstata těchto změn (Stanewsky, 2002; Allada, 2003), zjištěna poloha centrálního oscilátoru v mozku (Kaneko et al., 2000) a identifikovány jednotlivé vstupní (Hall, 2000; Helfrich-Förster, 2002) a výstupní dráhy hodin (Jackson, 2001).

#### 1.1.1.1 Vstupní dráha

Díky vstupní dráze organismus reaguje na změny okolního prostředí. Světlo je vnímáno prostřednictvím fotoreceptorů, které se nachází jednak ve složeném oku, v H-B receptorech (Hofbauer-Buchner receptory) a v neuronech centrálního mozku, které obsahují protein Cryptochrom, receptorem citlivým na modré světlo (Picot et al., 2007; Helfrich-Förster, 2019).

Periodické změny v teplotě jsou vnímány pomocí periferních chordotonálních orgánů, což jsou receptory reagující na mechanické a zvukové vibrace (Tomioka et al., 2010). Různé podněty z vnějšího prostředí jsou specifickými nervovými dráhami vedeny od receptoru do mozku, tj. k nervovým buňkám centrálního oscilátoru (Helfrich-Förster, 2019).

#### 1.1.1.2 Centrální oscilátor

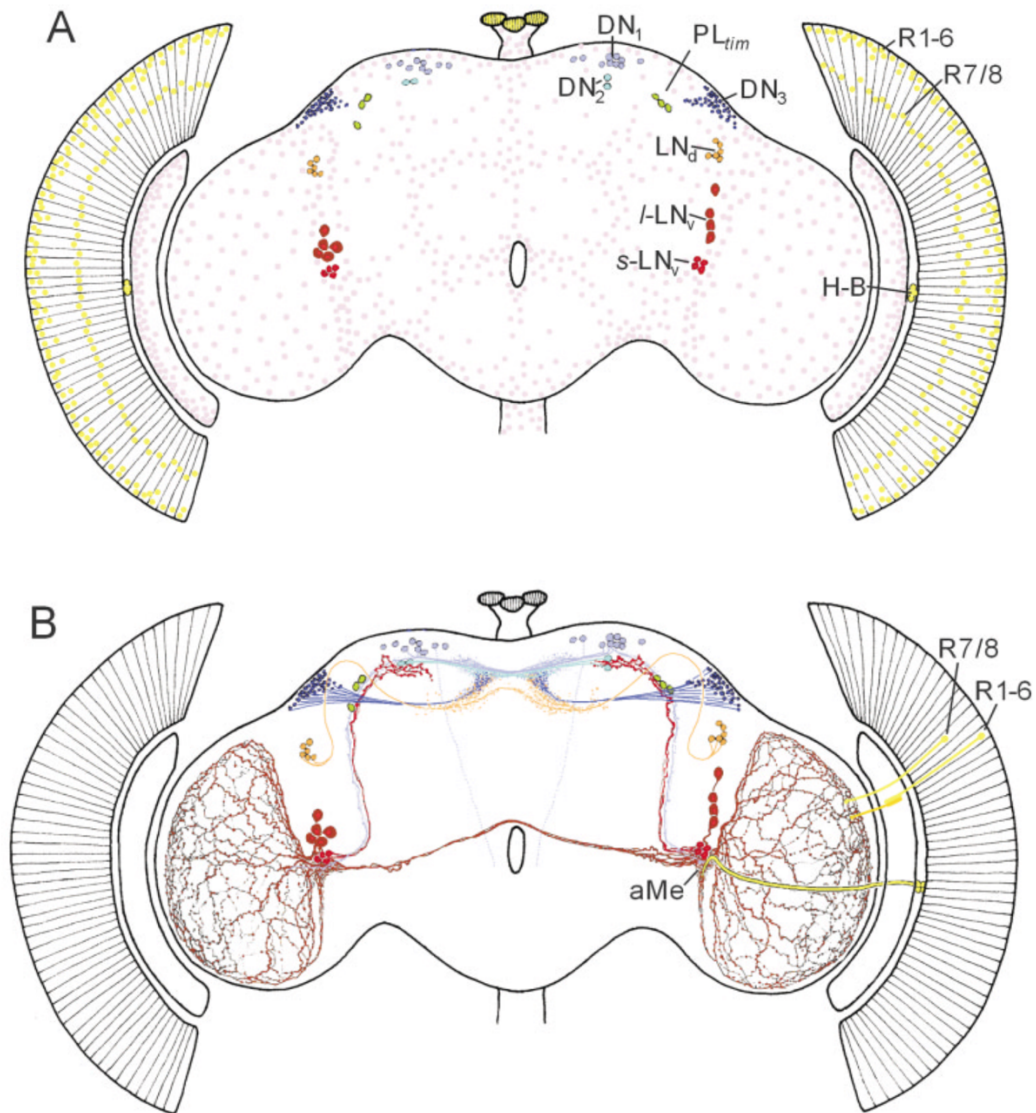
Centrální oscilátor *D. melanogaster* je tvořen přibližně 150 nervovými buňkami v každé mozkové hemisféře. Tyto nervové buňky jsou rozděleny do 7 klastrů a jsou rozděleny podle jejich anatomické pozice v mozku na dorsální a laterální (Obr. 2 A, B), (Helfrich-Förster, 2006; Tomioka et al., 2006; Sheeba, 2008; Boothroyd et al., 2008).

Laterální nervové buňky (LNs), které se nachází v anteriorní části centrálního mozku tvoří několik klastrů: dorzálně umístěný LN<sub>d</sub> klastr tvořený 5-8 nervovými buňkami, ventrálně umístěný LN<sub>v</sub> klastr obsahující dva typy nervových buněk, 4-6 velkých neuronů (l-LN<sub>v</sub>) a 5 malých neuronů (s-LN<sub>v</sub>), (Tomioka et al., 2010). Na základě analýzy laterálních neuronů bylo zjištěno, že s-LN<sub>v</sub> se uplatňují při řízení aktivity na počátku dne a částečně regulují i večerní aktivitu octomilek, zatímco l-LN<sub>v</sub> jsou důležité pro příjem světelného signálu. Jeden neuron z s-LN<sub>v</sub> tzv. 5<sup>th</sup> s-LN<sub>v</sub> společně s LN<sub>d</sub> jsou klíčové pro řízení večerní aktivity octomilek (Grimma et al., 2004; Stoleru, et al., 2004; Rieger et al., 2006).

Dorzální nervové buňky (DNs) obsahují 3 klastry nervových buněk: DN1 klastr obsahující cca 15 nervových buněk, DN2 klastr obsahující 2 nervové buňky a DN3 klastr obsahující cca 40 nervových buněk. DN1 a DN2 představují středně velké neurony, které jsou lokalizovány v posteriorní části centrálního mozku (Helfrich-Förster, 2003). Bylo zjištěno, že DN1 řídí rytmické chování octomilky v podmínkách konstantního světla (Murad et al., 2007; Stoleru et al., 2007) a také, že zaznamenávají změny teploty okolního prostředí (Yadlapalli et al., 2018). Funkce DN2 zatím dosud nebyla objasněna (Kaneko et al., 1997; Stoleru D, 2005). DN3 jsou malé neurony, které jsou zodpovědné za večerní aktivitu octomilky v podmínkách střídání světla a tmy (Veleri et al., 2003).

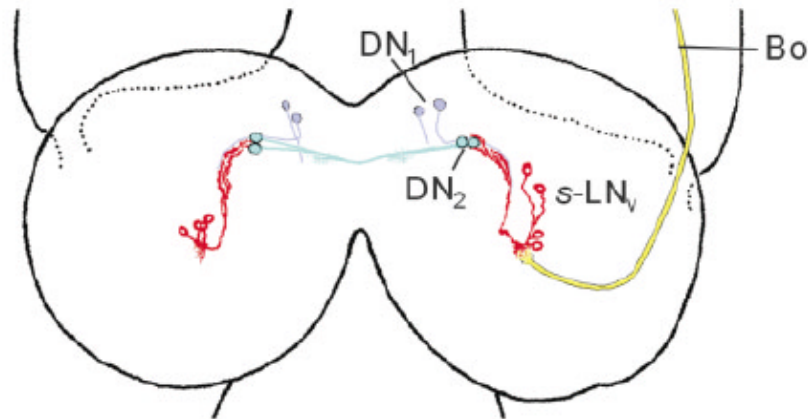


V mozku se nachází ještě jedna skupina nervových buněk, které nejsou zařazeny striktně mezi dorzální nebo laterální – jsou to 3 posteriorní laterální nervové buňky LPN. Tento druh nervových buněk je pravděpodobně zapojen do synchronizace cirkadiálních hodin s teplotou (Yoshii et al., 2005; Shafer et al., 2006; Miyasako et al., 2007).



**Obr. 2:** Anatomické uspořádání neuronů centrálního oscilátoru u dospělé *D. melanogaster*. **A:** Schématické znázornění počtu a polohy buněk v jednotlivých nervových klastrech, laterální neurony (LNd, l-LNv, s-LNv) jsou zobrazeny červenou/oranžovou barvou, dorzální neurony (DN1, DN2, DN3) modrou barvou. **B:** Znázornění nervových drah vycházejících z jednotlivých skupin neuronů. Převzato z Helfrich-Förster, 2003.

Cirkadiální hodiny jsou funkční i v larválním stádiu (Obr. 3), s tím rozdílem, že jsou tvořeny menším počtem nervových buněk, nachází se zde 5<sup>th</sup> s-LN<sub>v</sub> a dále 2 neurony ze skupiny DN1 a DN2 (Helfrich-Förster, 2003).



**Obr. 3:** Anatomické uspořádání neuronů centrálního oscilátoru u larev *C. costata*. Převzato z Helfrich-Förster, 2003.

#### 1.1.1.3 Výstupní dráha

Nervové buňky centrálního oscilátoru vzájemně komunikují a rytmicky ovlivňují uvolňování mediátorů výstupní dráhy, které se podílí na řízení fyziologických procesů a chování organismu. Jedná se o neuropeptidy, hormony a biogenní aminy (Bloch et al., 2013).

Mezi nejznámější mediátory informace z cirkadiálních hodin patří pigment disperzní faktor (PDF), (Helfrich-Förster, 2009). Tento peptid je permanentně exprimován v s-LN<sub>v</sub> a l-LN<sub>v</sub> a rytmicky je řízeno jeho uvolňování do nervových drah a podílí se na regulaci spánku a pohybové aktivity (Parisky et al., 2008; Sheeba et al., 2008; Chung et al., 2009). Kromě toho PDF může působit na neurony centrálního oscilátoru, kdy všechny klastry kromě l-LN<sub>v</sub> a LPN obsahují PDF receptor spážený s G-proteinem (Lin et al., 2004).

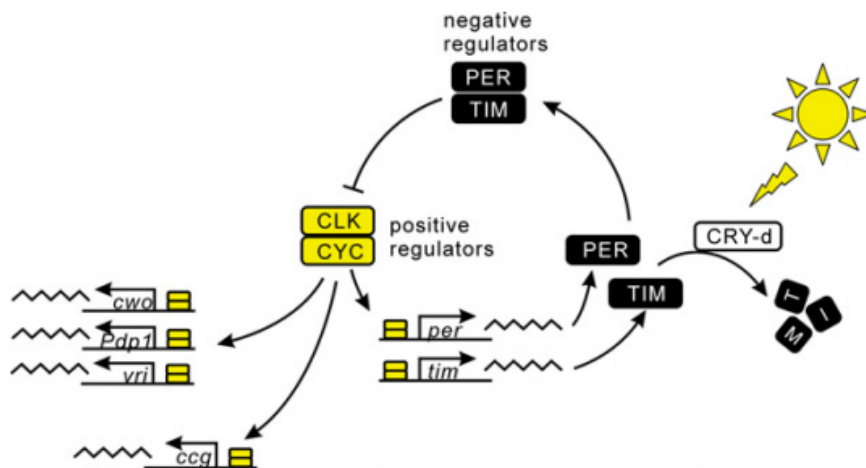
Iontový transportní peptid (ITP) je dalším důležitým peptidem výstupní dráhy cirkadiálních hodin. Je exprimován v jednom dorzolaterálních neuronu a v 5<sup>th</sup> sLN<sub>v</sub> (Johard et al., 2009). Tento neuropeptid je zodpovědný za regulaci večerní aktivity a zároveň má částečný vliv na zkrácení vnitřní periody cirkadiálních hodin. Tudiž ITP může doplňovat aktivitu PDF, který je naopak zodpovědný za regulaci ranní aktivity a prodlužování vnitřní periody cirkadiálních hodin (Hermann-Luibl et al., 2014).

Dalším mediátorem účastnícím se v nastolení fyziologické odpovědi organismu je neuropeptid F (NPF). Exprese tohoto neuropeptidu probíhá ve třech LNd (Johard et al., 2009) a v 5th s-LNv (Hermann et al., 2012) a zároveň je závislá na pohlaví, kdy k jeho produkci dochází pouze u samců (Lee et al., 2006). Tento neurochemický dimorfismus přispívá ke vzniku rozdílné potřeby odpočinku a aktivity v závislosti na pohlaví (Garczynski et al., 2002).

#### 1.1.1.4 Molekulární mechanismus cirkadiálních hodin

Molekulární mechanismus cirkadiálních hodin je založen na přesně načasované expresi celé řady genů. Ta je regulována pomocí třech transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček a dalších regulačních mechanismů zahrnující např. změny v uspořádání chromatinu nebo posttranskripční úpravu mRNA (Sharma, 2003; Helfrich-Förster, 2004). U *D. melanogaster* se nachází 3 zpětnovazebné smyčky, ve kterých byly postupně identifikovány jednotlivé geny – *period (per)* (Bargiello et al., 1984; Reddy et al., 1984; Zehring et al., 1984), *timeless (tim)* (Seghal et al., 1994; Myers et al., 1995), *clock (Clk)* (Vitaterna et al., 1994) a *cycle (Cyc)* (Allada et al., 1998).

Jádro první zpětnovazebné smyčky je tvořeno geny *per*, *tim* a proteiny Clk a Cyc (Obr. 4). Proteiny Clk a Cyc vytváří heterodimery, které se vážou na sekvence promotorů (E-boxy) genů *per* a *tim* a tak pozitivně regulují jejich transkripci na počátku světelné fáze periody (Hall, 2003). Proteiny Per a Tim se postupně hromadí v cytoplazmě v temnostní fázi periody, kdy Tim není rozkládán světlem (Hunter-Erson et al., 1996; Myers et al., 1996). Vzniká Per/Tim heterodimer, který vstupuje do jádra (Curtin et al., 1995; Gekakis et al., 1995; Zeng et al., 1996), kde za přítomnosti různých kináz a fosfatáz reprimují funkci heterodimeru Clk/Cyc a blokují svou vlastní transkripci (Kloss et al., 1998; Price et al., 1998). Při opětovném vstupu světla do cyklu dojde k rozkladu Tim proteinu a rozpadu Per/Tim heterodimeru (Ashmore et al., 2003). Clk/Cyc se tak uvolní z reprimovaného stavu (Kim et al., 2006; Yu et al., 2006), které mohou opět aktivovat funkci Per/Tim, které jsou tak opět připravené začít novou transkripci a nové kolo zpětnovazebné smyčky (Hardin, 2005). Zatímco hladina Per a Tim se v průběhu 24hodinové oscilace rytmicky mění, hladina Clk zůstává konstantní (Houl et al., 2006; Kim et al., 2006; Yu et al., 2006). Mezi zmíněné kinázy a fosfatázy uplatňující se v této zpětnovazebné smyčce patří Doubletime (Dbt), Shaggy (Sgg) a kasein kináza II (CKII) jako představitelé kináz a protein fosfatáza 1 (PP1) a protein fosfatáza 2A (PP2A), které fosforylují/defosforylují Per, Tim i Clk (Kloss et al., 1998; Price et al., 1998).



**Obr. 4:** První zpětnovazební smyčka tvořená geny *per*, *tim*, *clk* a *cyc* v centrálním oscilátoru *D. melanogaster*. Převzato z Tomioka et al., 2012.

V druhé zpětnovazební smyčce (Obr. 5) je heterodimer Clk/Cyc zodpovědný za transkripci genů *vri* (*vri*) a PAR domain protein 1ε (Pdp1ε) (Cyran et. al., 2003; Glossop et al., 2003). Zatímco *vri* mRNA se hromadí v průběhu časného večera, hromadění Pdp1ε mRNA je o několik hodin zpožděno (Hardin, 2004). Jak množství *vri* mRNA roste, dochází k hromadění i jeho proteinu, který vstupuje do jádra, kde inhibuje transkripci genu Clk navázáním na V/P-box (vazebné místo Vri/Pdp1) lokalizovaném v jeho promotoru. Tím pádem dochází ke snížení Clk mRNA (Cyran et. al., 2003; Glossop et al., 2003). Později během noci dochází k transkripci Pdp1ε mRNA a k hromadění jeho proteinu až do časných ranních hodin (Blau et al., 1999; Cyran et. al., 2003; Glossop et al., 2003). Pdp1ε vstoupí do jádra, kde se přednostně váže na V/P boxy a tím se aktivuje transkripce Clk. Množství Clk mRNA se tudíž opět zvyšuje a úměrně se zvyšuje i množství jeho proteinu. Clk v podobě heterodimeru se Cyc opět aktivuje transkripci *vri* a jakmile množství jeho proteinu převyší množství Pdp1ε, tak se opět váže na V/P-boxy, inhibuje transkripci genu Clk a nové kolo zpětnovazební smyčky začíná (Cyran et. al., 2003; Glossop et al., 2003).

Třetí zpětnovazební smyčka (Obr. 5) zahrnuje gen *clockwork orange* (*cwo*). Jeho rytmická exprese je také pod kontrolou transkripčních faktorů Clk/Cyc a po transportu do jádra zde působí jako represor, který interaguje s proteinem Per a inhibuje tak transkripci dalších hodinových navázáním na E-boxy. Tím přispívá k celkové oscilaci jednotlivých komponent zapojených do cirkadiánních hodin (Kadener et al., 2007; Lim et al., 2007; Matsumoto et al., 2007; Richier et al., 2008).

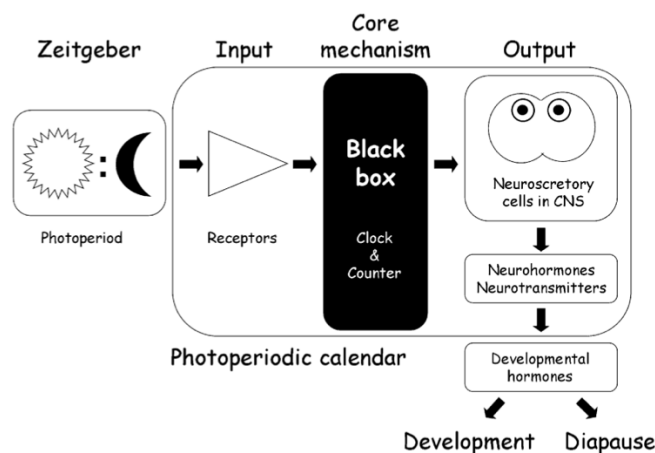


Diapauza představuje komplexní systém fyziologických změn a chování organismu, které podléhají přesné regulaci od nástupu až po jejich ukončení. Tyto změny zahrnují skladování energetických zásob, přemístění organismu do vhodného prostředí, pozastavení vývoje, metabolismu a další změny, které umožňují organismu vyrovnat se se stresovými podmínkami v životním prostředí (Košťál, 2011). Rozlišují se dva typy diapauzy: (1) hibernaci, která je vyvolána po působení krátkého dne (zimní období), (2) estivaci, jež je vyvolána působením dlouhého dne (letní období) (Masaki, 1980).

Pro nástup diapauzy u většiny druhů hmyzu je nezbytná schopnost vnímat délku noci, která je rozhodující pro nástup diapauzy (Saunders, 2002). Tzv. kritická délka noci se v rámci jednoho druhu mění se zeměpisnou šířkou a nadmořskou výškou (Bradshaw et al., 1975; Bradshaw et al., 1977) a vyvolá nástup diapauzy u poloviny populace. To umožňuje populacím, které žijí ve vyšších polohách přizpůsobit se dřívějšímu nástupu zimy (Meuti et al., 2013).

### 1.2.1 Struktura a mechanismus fotoperiodických hodin

Aby se organismus mohl přizpůsobit vnějším podmínkám a případně vstoupit do diapauzy musí mít vyvinutý specifický systém (Obr. 6), který je citlivý na změnu vnějších podnětů. Takže podobně jako cirkadiánní hodiny musí obsahovat část, která je zodpovědná za detekci vnějších podnětů (zejména fotoperiody), dále centrum fotoperiodických hodin a výstupní dráhu specializovanou na vytváření specifické odpovědi, jako je nástup diapauzy (Košťál, 2011).



**Obr. 6:** Schématické znázornění fotoperiodických hodin. Podněty z vnějšího prostředí vstupují prostřednictvím receptorů do centra fotoperiodických hodin, kde jsou tyto informace zpracovány a vzniká tak specifická odpověď organismu např. vstup do diapauzy. Princip a správné fungování fotoperiodických hodin je ale zatím stále neznámé. Dosavadní známé informace byly získány za

využití tzv. black-box přístupu vedoucí ke vzniku různých modelů popisující fungování tohoto mechanismu. Převzato z Košťál, 2011.

#### 1.2.1.1 Vstupní dráha

Světlo vstupuje do centra fotoperiodických hodin prostřednictvím buněk citlivých na světlo (Nelson, Denlinger, Somers, 2009). Podobně jako u cirkadiánních hodin se mohou nacházet v mozku, což bylo prokázáno studiem na larvách a kuklách u zástupců řádu Lepidoptera, *Antheraea pernyi* (Tanaka, 1950), *Pieris brassicae* (Seugé, Veith, 1976), *Manduca sexta* (Bowen, 1984) nebo *Bombyx mori* (Shimizu, 1982). Nicméně kromě fotorecepce zprostředkované mozkem, hmyz může vnímat fotoperiodu i pomocí složeného oka, jako to bylo prokázáno studiem dospělců u zástupců řádu Hemiptera, *Megoura viciae* (Lees, 1964) a řádu Diptera, *Calliphora vicina* (Cymborowsky et al., 1996). U jednotlivých druhů hmyzu převládá rozdílný způsob fotorecepce, ať už se jedná o mozek, složené oko nebo kombinaci obou způsobů.

#### 1.2.1.2 Centrum fotoperiodických hodin

Centrum fotoperiodických hodin zahrnuje dva vzájemně propojené mechanismy – z nichž jeden je zodpovědný za měření délky noci, tj. rozlišení krátkého a dlouhého dne a druhý, jehož úkolem je akumulace fotoperiodického signálu, tj. měří kolikrát byl organismus vystaven příslušné fotoperiodě (Saunders, 1982, Saunders, 1987). Při dosažení prahové hodnoty (required day number) je vyvolána fotoperiodická odpověď (vstup do diapauzy nebo vývoj). Aby nastala, musí být organismus vystaven podmínkám dlouhého nebo krátkého dne po dobu několik za sebou jdoucích dní, a to během jeho fotoperiodicky citlivého vývojového stádia (sensitive period). Toto fotoperiodicky citlivé stádium se může mezidruhově lišit a může se nacházet jak v embryonálním a larválním stádiu, tak i v kukle nebo u dospělého (Košťál, 2006).

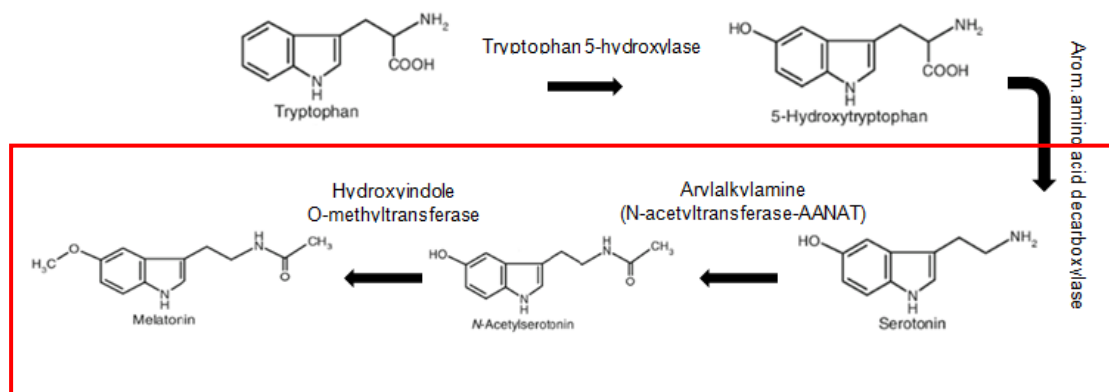
#### 1.2.1.3 Výstupní dráha

Způsob, jakým je informace z centra fotoperiodických hodin zpracována ve specifickou odpověď není ještě zcela jasné, ale předpokládá se účast neuropeptidů produkovaných neurosekretorickými buňkami v mozku (Košťál, 2011). Tyto buňky jsou pomocí nervových drah propojeny s neurohemálními orgány *corpora cardiaca* a *corpora allata* a s protorakální žlázou (Orchard, Loughton, 1985; Shiga et al., 2007), kde dochází k uvolňování či



k zablokování specifických hormonů regulujících fyziologické projevy spojené s vývojem nebo se vstupem do diapauzy (Denlinger, 2000, 2002, Denlinger et al., 2005).

Jedním z hormonů spojených s přenosem fotoperiodického signálu může být i melatonin, který je u savců známý jako hormon přenášející informace o cirkadiálním čase na periferii (Dibner et al., 2010; Tan et al., 2010; Lucas, 2013). U hmyzu se předpokládá uplatnění melatoninu jak ve výstupní dráze cirkadiálních hodin, na základě evidence denních změn jeho hladiny v centrální nervové soustavě (Finocchiaro et al., 1988), tak ve výstupní dráze hodin fotoperiodických (Gorbet et al., 2003; Bembenek et al., 2005; Mohamed et al., 2014). Fotoperiodické změny v závislosti na hladině melatoninu byly zaznamenány u mšice *Acyrtosiphon pisum* (Barberá et al., 2018), kdy se v podmínkách dlouhého dne rozmnožují partenogeneticky a v podmínkách krátkého dne změni svůj životní cyklus, přepnou do pohlavního rozmnožování a produkují odolná, diapauzní vajíčka. Důležitou komponentou v biosyntetické dráze (Obr. 7) melatoninu je arylalkamin (N-acetyl transferáza, aaNAT), enzym katalyzující syntézu melatoninu z jeho prekurzoru, serotoninu (Cazaméa-Catalan et al., 2014).



**Obr. 7:** Biosyntetická dráha melatoninu. Převzato ze Seithikurippu et al., 2013.

### 1.3 Vztah cirkadiálních a fotoperiodických hodin

Přestože některé studie prokázaly zahrnutí komponent cirkadiálních hodin v hodinách fotoperiodických, není stále jasné, jestli denní a sezónní hodiny pracují nezávisle nebo ve vzájemné interakci (Bradshaw et al., 2001; Saunders, 2010). Hypotézu, že endogenní cirkadiální rytmy jsou důležité pro vnímání fotoperiody navrhl již v roce 1936 Erwin Bünning (Bünningova teorie), (Bünning, 1936; 1969). Na základě této teorie byl navrhnout model „vnější náhody“ (external coincidence model), (Pittendrigh a Minis, 1964), kdy světlo vstupuje do cirkadiálních hodin a jednak osvětluje fázi citlivou na světlo, která odpovídá konci kritické



délce noci. Pokud v této fázi nedojde k osvětlení, noc je vnímána jako dlouhá, pokud dojde k osvětlení, noc je vnímána jako krátká (Pittendrigh, 1966). Model „vnitřní náhody“ (internal coincidence model) rovněž počítá se zahrnutím cirkadiánního oscilátoru, ale předpokládá přítomnost dvou (nebo více) oscilátorů, které jsou pod kontrolou světelných cyklů a jejich fázový vztah určuje délku noci (Pittendrigh, 1972). Identifikace jednotlivých hodinových genů (Konopka a Benzer, 1971; Bargiello et al., 1984; Reddy et al., 1984) ovlivnila výzkum fotoperiodických hodin směrem k identifikaci, zda a jakým způsobem jsou hodinové geny zahrnuty v kontrole fotoperiodických hodin. Bylo ukázáno, že exprese hodinových genů může být ovlivněna délkou fotoperiody např. u *Bombyx mori* (Iway et al., 2006) nebo *Pyrrhocoris apterus* (Hodková et al., 2003; Syrová et al., 2003; Doležel et al., 2005). Dále genetické manipulace hodinových genů ovlivňují fotoperiodické projevy u *Antheraea pernyi* (Williams, 1969), *Manduca sexta* (Bell, 1975) nebo u *Gryllus bimaculatus* (Kennerdell a Carthew, 1998). Na druhou stranu, výzkumy na *per*<sup>0</sup> mutantech u *D. melanogaster* ukazují, že některé geny nejsou zahrnuty ve fotoperiodismu, protože i za nepřítomnosti *per* jsou tyto mutanti stále schopni rozpoznat dlouhý a krátký den (Saunders et al., 1989).

Všechny tyto výzkumy zatím nepřinesly žádný jednoznačný závěr. Současný názor na vztah mezi cirkadiánními a fotoperiodickými hodinami může být rozdělen do 3 hlavních kategorií: (1) úplná nezávislost dvou fyzicky oddělených systémů, (2) spolupráce dvou fyzicky oddělených systémů a (3) sjednocení obou systémů do jednoho systému s duální funkcí (Košťál, 2011).

#### 1.4 *Chymomyza costata*, vhodný model pro studium vztahu cirkadiánního a fotoperiodického systému

*D. melanogaster*, modelový organismus cirkadiánních hodin se neukázal jako vhodný pro studium hodin fotoperiodických, neboť její fotoperiodické projevy spočívají ve slabé ovariální diapauze pozorovatelné pouze při teplotě nižší než 14 °C (Saunders et al., 1989). Jako výhodnější se jeví studium fotoperiodicky velmi senzitivní octomilky, *Chymomyza costata*, žijící ve vyšších nadmořských výškách (Košťál et al., 2000). Indukce diapauzy u larev *C. costata* vyžaduje podmínky krátkého dne a přítomnost genu *tim*. V podmínkách dlouhého dne se larvy *C. costata* vyvíjí až do dospělce (Riihima a Kimura, 1988; Košťál et al., 2000). Na základě experimentálních pokusů byla vyzolována linie *C. costata*, označená jako Non-Photoperiodic-Diapause (NPD), která má mutaci v *npd* lokusu genu *timeless* na jednom

autosomu a tato linie není citlivá vůči sezónním změnám prostředí (Riihima a Kimura, 1988). Denní změny v hladině Tim proteinu jsou pod kontrolou fotoperiodických hodin.

Současné studie cirkadiálních hodin u *C. costata* odhalily, že jsou lokalizované ve stejných nervových buňkách jako octomilky, žijící v nižší nadmořské výšce, jako je *D. melanogaster*. Ale narozdíl od *D. melanogaster*, dospělci *C. costata* vykazují arytmicitu v konstantních podmínkách, přestože denní oscilace hodinového proteinu Pdf1 je zachována. V podmínkách konstantní tmy nedochází k rytmickému uvolňování PDF, což svědčí o chybějícím propojení centrálních hodin s výstupní dráhou (Bertolini et al. 2019). Naproti tomu u fotoperiodicky citlivých larev nebyly zjištěny znaky funkčních cirkadiálních hodin, tj. nebyly detekovány výrazné denní oscilace v expresi genů centrálních hodin, jak na úrovni mRNA, tak proteinů, s výjimkou *tim* mRNA (Shöttner, unpublished data, Stehlík et al., 2008). Proteiny Per a Clock se permanentně nachází v jádře. Rovněž nebyla zaznamenána endogenní rytmicita v lokomoční a respirační aktivitě (Shöttner, unpublished data).

Přesto jsou tyto nefunkční cirkadiální hodiny citlivé ke vnímání fotoperiody, vzhledem ke zjištěným změnám v expresi proteinu Cry u diapauzních a nediapauzních jedinců. Vysoká hladina Cry směřuje k vývoji, zatímco nízká k diapauze. Množství Cry v LNvs buňkách závisí na délce fotofáze a narozdíl od *D. melanogaster* se nerozpadá na světle, a to ani v případě několikadennímu vystavení podmínkám konstantního světla. Nejen délka světelné fáze, ale i přítomnost Tim je nezbytná pro udržení vysoké hladiny Cry. Naproti tomu Cry v DN1 buňkách vykazuje podobné vlastnosti jako Cry u *D. melanogaster*, tj. kdy je možná jeho detekce pouze v podmínkách konstantní tmy (Stehlík et al., 2008).

Ačkoliv je přítomnost Tim důležitá pro regulaci hladiny Cry v s-LNv u *C. costata*, Tim nebyl imunologicky detekován v buňkách centrálního cirkadiálního oscilátoru. Dostupné protilátky proti *C. costata* Tim značily pouze neurony mimo centrální oscilátor (Stehlík et al.). V této studii byly použity protilátky namířené proti dvěma různým úsekům *C. costata* Tim k lokalizaci příslušného proteinu v larválním mozku. Imunodetekce Tim byla dána do souvislosti s distribucí neuropeptidu serotoninu, jako zástupce výstupní dráhy fotoperiodických hodin. Srovnání lokalizace obou komponent umožnilo nastínit vztah cirkadiálních a fotoperiodických hodin u tohoto organismu.

## 2 Cíle práce

Hlavním cílem magisterské práce byla imunohistochemická lokalizace proteinu Timeless v centrální nervové soustavě diapauzních a nediapauzních larev *Chymomyza costata* a stanovení vzájemné distribuce tohoto proteinu a neurotransmiteru serotoninu, u kterého se předpokládá uplatnění při regulaci fotoperiodických hodin.

Předpokladem k dosažení stanoveného cíle bylo osvojení si techniky imunodetekce na totálních preparátech a práce na konfokálním mikroskopu FluoView<sup>TS</sup>1000 (Olympus). Dále bylo nutno si osvojit analýzu získané fotodokumentace v programech Imaris verze 6.3.1 (Bitplane) a Adobe Photoshop (Adobe Systems) a kvantifikaci fluorescenčního signálu v programu ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health).

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Laboratorní zvířata

K experimentům byly použity larvy 3. instaru přírodního typu *C. costata* a NPD mutantní linie *C. costata* (laboratoř Diapauzy hmyzu, Entomologického ústavu Biologického centra AV ČR), v době fotoperiodicky senzitivní fáze, tj. 15-18 den po ovipozici. Larvy byly udržovány na umělé dietě při konstantní teplotě 18 °C za podmínek dlouhého (světelná fáze 18 hod, temnostní fáze 8 hod) a krátkého dne (L:12 hod, D: 12 hod). Dlouhý den vyvolá přímý vývoj (tzn. larvy se přes kuklu vyvinou do dospělce), zatímco krátký den navozuje fakultativní diapauzu.

Pro experimenty srovnávající hladinu serotoninu a proteinu Tim v průběhu a po uplynutí fotoperiodicky senzitivní fáze byly larvy synchronizovány následujícím způsobem. Po ovipozici byly vajíčka ve skleněných zkumavkách umístěny do podmínek LD a SD. Jedenáctý den larválního vývoje byly na základě morfologických znaků odstraněny larvy 3. instaru. Dvanáctý den byly nově vyvinuté larvy 3. instaru vybrány pro experimenty a ponechány ve vývoji do stádia 15 až 20 dnů od vylíhnutí, kdy byly zpracovány pro potřeby imunodetekce.

### 3.2 Pitva a fixace tkáně

Z larev byla ve fosfátovém pufru (PB) pomocí preparačních nůžek odstřiženy první třetiny těla a okamžitě fixovány ve 4 % paraformaldehydu po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Poté byly tkáně promyty třikrát po 15 minutách promyty v PB. Pomocí preparačních pinzet byly z hlavové části vypreparovány mozky a podrobeny imunohistochemické analýze.

### 3.3 Imunohistochemie

Principem je fixace proteinů ve tkáni a jejich následné zviditelnění pomocí specifické protilátky. V experimentech byla použita nepřímá imunohistochemická detekce, která využívá sekundární protilátku k detekci neznačené protilátky primární.

### 3.3.1 Primární protilátky

K detekci proteinu Tim byly použity komerčně připravené králičí polyklonální protilátky (Moravian Biotechnology Ltd) namířených proti dvěma různým úsekům proteinu Tim C. costata (Obr. 8). Protilátka pracovně označená Tim 19 namířená proti peptidu DAPQGKPKQHKKP, který odpovídá oblasti 489 – 501 v aminokyselinové sekvenci Tim proteinu a protilátka Tim 24 namířená proti peptidu TPRKTAEAISRK, které se nachází v oblasti 1265 – 1277 aminokyselinové sekvence Tim proteinu. K ověření specificity detekovaného signálu byla využita preiumunní séra, tj. séra, která byla odebrána donorovému organismu před imunizací antigenem. Primární protilátky byly ředěny v blokovacím médiu, tvořeným 5% kozím sérem v PB s Triton X-100 (PB-T) v poměru 1:100.

```
MDWLLATPQLHSAFSSLGALVGDYVSPDALAILEEINYKLIY
EDQTLRTRFRRAIAFGQNVRSDLIPVLENTKDDAVLESVIRLLVNLTPVVECLFSVDVM
YRTEMGRHTIFELNKLKLYNSKEAFTDPKSTKSVVEYMKHILDSETKLSPOKCDQINNC
LLLLRNILHIPETNANFIKPMQLQSSSRHGTSMQNTILWNLFIQSIDKMLLYLMTCPQR
ALWGVMTVQLIALIYKDQHI STLQKLLNLWFEASLESSEDNESNTTPPKQSGDYS
MLTSDPTSDCSEKDGDERRQTLREGTDATLQEVSRKGQEQYQDAMFGVPAKKLECAETA
SEVTSEAPSSPQQHWKVTEPPEPEKEMAMAATEQQASMIMQLTQPADNAKTTTNTTC
TANQERFKQPPPLPVRPLTCTQAEKLGEMADETYPKHVSAVKGQKSPHSGQLHLTKG
KCFPQKRECASSQSELSDCGYGTQVENQESISTSSNDD DAPQGKPKQHKKP PCNTKPRS
KQRNIVTPLDKKEQRRKLVKRSKSNLINMKGLCQHTPTDDDISNLLKEFTVDFLLKG
YNYLVKVLHHLHITSNAKISIDTSHFFWLVTYFLKFAAQLELDMEHIDTILNFDVLTYL
TSEGVSLCEQLELNARQEGSDLKPYLRMHLVVTAREFLQAIETYSKVTHLSEDDRT
QLLKLQIQISAATDLRSLFVLLLRFRNPSIHSKQYLQDLVVTNHHKMLMLVLDRAAKLEG
QGSVNLTEHLLQFATPEVMHYYGILLEDFNYNGEFLNDCIFTMMHHIGGDLKQIGVLF
QPIILKTF SRLWETDNGLCDDWTDLIAVIRKFMSTPPKSPILPTSSLTEMTKEHNL
QNNLFTWTQEDMDTLYWYVQSKKSNVVGKIVKLF SNNGNKLSRISIIQQLLAQDM
INLLEYDDLKMFEEAEYQRSLLNTPTSGTNASGIESGKPSNDTQMLLDLIIKDNKQQH
LIWLQQLLLECCYIKLKLRSNGNSCSTDAIMEPVAYHCILMQKSIPIVQWNNDSAIML
YQPFVLLLHKLGIQLPADAGTIFARI PDYWTPETMYGVAKKLGTLDKLTCLKFDPIELE
VASSTTSRHCMRSRNSLSSVSSLDVDMPESEELPLIPEVDA AIEKAHEIFVAPKAKNC
NSIIRYTPDVT PAVPNWLQLVMRSKCNQQSAPSRPATDISDCTGADDESMHSSSQAP
TQQLLATSNSNVNHATTLGCQPSII GAHNDNSSSSGCGGTDSSQSMAAVVSNTRTTG
NN TPRKTAEAISRK TTHMYEDAAMKSFQRLQATNSHFSRANLEQQYSALVASIYENE
MANCDNISMASDLEHMYVSDDEEDTHENHEQRVPYYH
```

**Obr. 8:** Aminokyselinová sekvence proteinu Tim. Protein se skládá ze 1356 aminokyselin. Modře je zobrazena sekvence peptidu, proti kterému byla namířena primární protilátka Tim 19, červeně je zobrazena sekvence peptidu, proti kterému byla namířena primární protilátka Tim-24.

Per protein byl lokalizován pomocí králičí polyklonální protilátky namířené proti proteinu Per z *D. melanogaster*, ředěné v blokovacím médiu 1:1000. Věrohodnost protilátky byla již mnohokrát ověřena při identifikaci proteinu Per u *D. melanogaster* (Veleri et al., 2003).

K detekci serotoninu v larvách *C. costata* byla využita komerčně připravená králičí, polyklonální protilátka anti-Serotonin Aldrich (c.nu. S5545), ředěna v blokovacím médiu v poměru 1:200.

### 3.3.2 Sekundární protilátky

K vizualizaci navázaných primárních protilátek byly využity fluorescenčně značené kozí sekundární protilátky firmy Life Technologies, a to Goat anti-rabbit IgG značena fluoroforem Alexa Fluor 488 a Goat anti-rabbit IgG značena fluoroforem Alexa Fluor 647. Protilátky byly opět ředěny v blokovacím médiu v poměru 1:200.

### 3.3.3 Imunohistochemická lokalizace na totálních preparátech

Ve fixované tkáni byly nejdříve blokovány nespecifická vazebná místa aplikací normálního séra po dobu 60 minut. Následovala inkubace primární protilátky po dobu 2 dnů ve 4 °C. Dále byla tkáň promyta 6x po 10 minutách v PB-T a inkubována se sekundární protilátkou přes noc 4° C. Poté byla tkáň opět promyta 6x po 10 minutách v PBTa mozky byly přemístěny na podložní sklíčko opatřené podpurnými kroužky a zalaty do zalévacího média (Vectashield, Vector laboratories). Účelem těchto podpurných kroužků byla ochrana tkáně, jelikož by mohlo dojít k jejich poničení způsobené tlakem krycího sklíčka vůči podložnímu. Preparáty byly skladovány ve tmě ve 4 °C a následně fotodokumentovány a analyzovány.

Při kolokalizaci serotoninu a proteinu Tim byly primární protilátky aplikovány postupně, protože se jedná o protilátky ze stejného donorového zvířete. Nejdříve byla aplikována primární protilátka anti-serotonin a vizualizována pomocí Goat anti – Rabbit značená Alexou 488. Poté byl použit druhý set protilátek, a to anti-Tim a Goat anti – Rabbit značená Alexou 647.

### 3.3.4 Analýza získané fotodokumentace

Získané vzorky byly analyzovány v konfokálním mikroskopu FluoView™ FV 1000 (Olympus), pomocí kterého byly získány série snímků s rozlišením 1024 x 1024. V programu Imaris verze 6.3.1 (Bitplane) byly jednotlivé vrstvy byly poskládány do 3D obrazu. Takto složený obraz ve formátu TIF byl následně graficky upraven (korekce jasu a kontrastu) v programu Adobe Photoshop (Adobe Systems). Takto upravený obraz byl přenesen na plato o rozměrech 18 x 27 cm a rozlišení 300 pixelů/palec, v barevném režimu RGB s bílým pozadím a 8bitovém formátu. Grafické zpracování kolokalizačních experimentů zahrnovalo proložení snímků s rozdílnými spektrálními barvami. Výsledné fotografie byly opatřeny měřítkem a popisky.

### 3.3.5 Kvantifikace pozitivního signálu

Intenzita pozitivního signálu byla stanovena pomocí programu ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health). Průměrné hodnoty stupňů šedi (mean grey value), přičemž byl program kalibrován na minimální hodnotu 0 až maximální hodnotu 255 stupňů. V každém mozku byly proměřeny neurony v abdominální části ventrálního ganglia. Do každé buňky byla v místě nejvýraznějšího pozitivního signálu vložena úsečka v rámci, které byla proměřena intenzita ve stupních šedi, stejně velká úsečka byla vložena i do okolního pozadí buňky. Odečtením hodnoty stupňů šedi naměřených v buňce a v jejím okolí byla získána intenzita pozitivního signálu. Po proměření všech pozitivních buněk byly hodnoty zpracovány v programu Excel, kdy byly hodnoty průměrné hodnoty pro jednotlivé skupiny vzorků a vypočtená směrodatná odchylka. Dále byla provedena statistická analýza v programu Statistica za využití párového t-testu a zjištěna hodnota p-value. Ze získaných dat byl v programu Excel sestaven sloupcový graf.

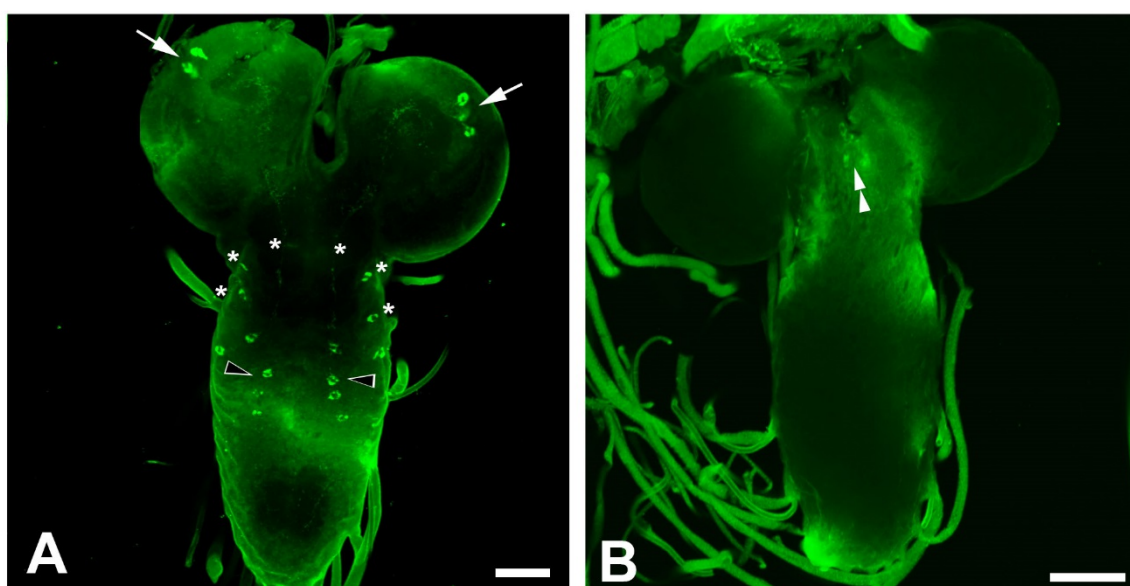
## 4 Výsledky

### 4.1 Testování specificity protilátek proti Tim z *C. costata*

K lokalizaci proteinu Tim v larvách *C. costata* byly využity komerčně připravené primární protilátky (Moravian biotech) namířené proti dvěma různým úsekům proteinu Tim *C. costata* o délce 1356 aminokyselin (bližší specifikace viz Materiál a metody).

Nejprve byla testována jejich specifita na totálních preparátech mozků larev *C. costata* (9A). Získaný pozitivní signál byl porovnán se signálem v kontrolních vzorcích, kam bylo místo primární protilátky aplikováno příslušné preimunní sérum (9B), a to ve stejném ředění jako primární protilátka.

Protilátka anti-Tim 24 nevykazovala žádný pozitivní signál, zatímco s protilátkou anti-Tim 19 byl zaznamenán pozitivní signál jak v neuronech centrálního mozku, tak v buňkách ventrálního ganglia. Aplikace preimunního séra neodhalila žádný pozitivní signál.

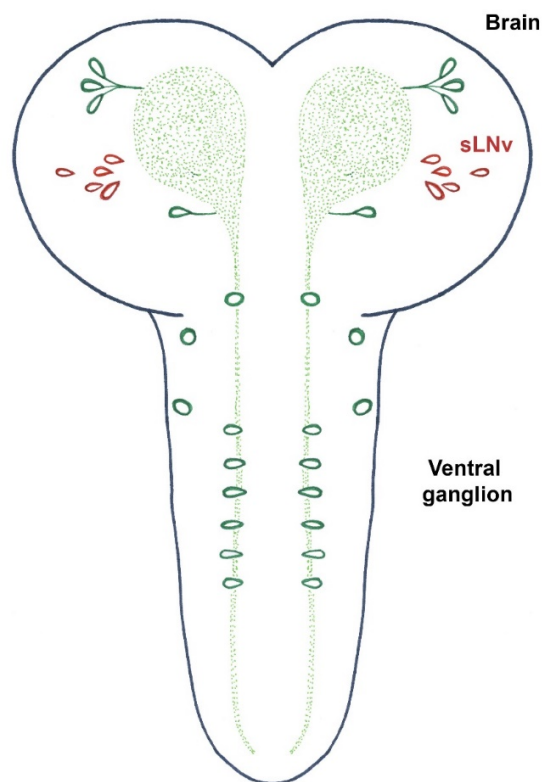


**Obr. 9:** Srovnání imunoreaktivit protilátky Tim-19 (A) a příslušného preimunního séra (B) v mozku larvy *C. costata*. A Imunodetekce Tim: bílé šipky, buňky dorzálního protocerebra; hvězdičky, buňky v subesophageální a thorakální části ventrálního ganglia; černé hlavy šipek, buňky v abdominální části ventrálního ganglia. B Imunodetekce při záměně primární protilátky preimunním sérem odhalila nespecifický signál v několika buňkách v mediální oblasti subesophageální části ventrálního ganglia (dvojitá bílá hlava šipky). Měřítka 50 µm.

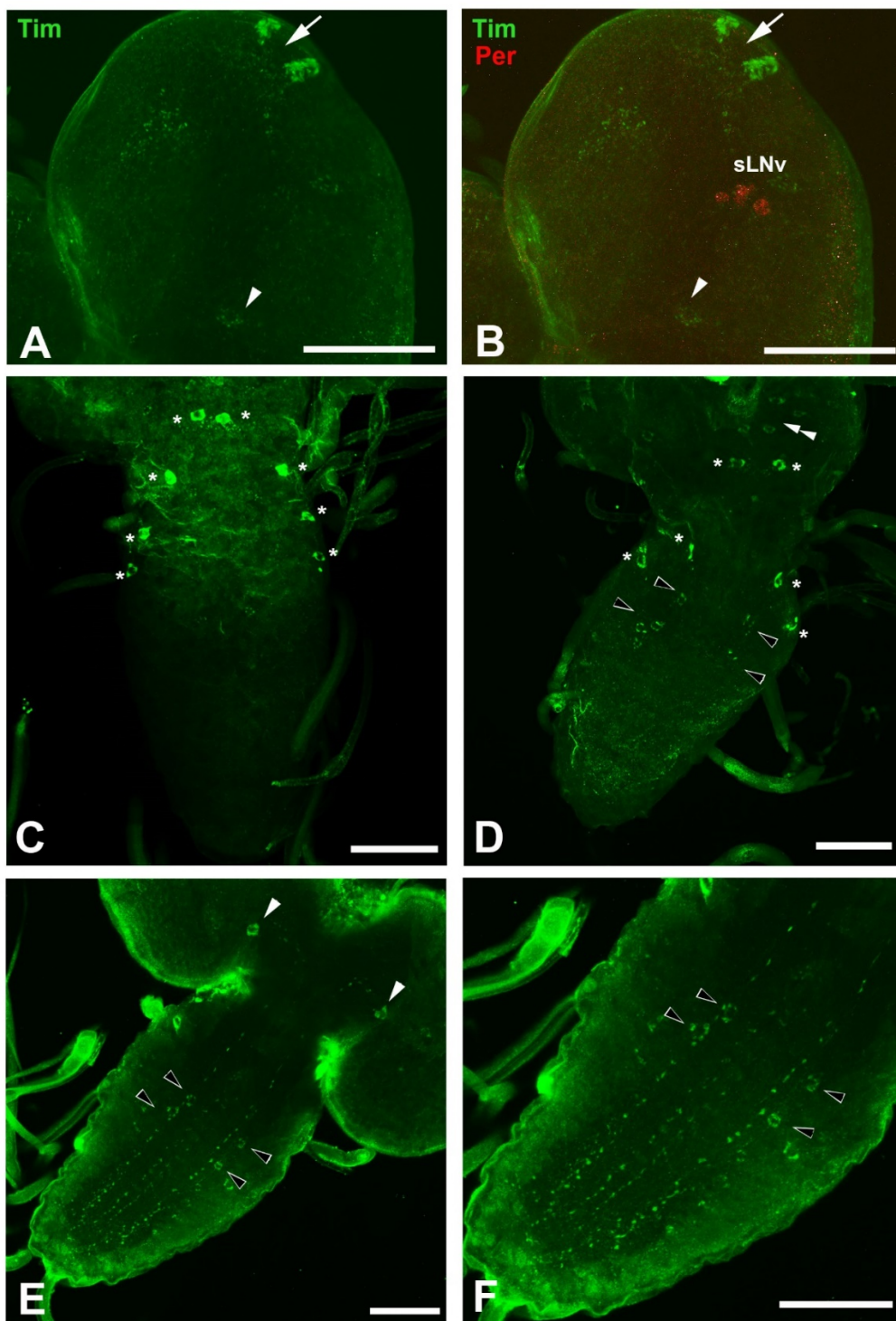


## 4.2 Imunohistochemická lokalizace proteinu Tim v mozku larvy *C. costata*

V centrálním mozku byl s protilátkou anti-Tim 19 zaznamenán pozitivní signál ve 3 neuronech ležících v dorzolaterální oblasti obou mozkových hemisfér a 1 neuronu v medioventrální části mozku (Obr. 10, 11A). V předpokládané pozici cirkadiálního oscilátoru, tj. v sLNv buňkách nebyl zaznamenán pozitivní signál. sLNv byly vizualizovány pomocí protilátky proti Per proteinu (Obr 11B). Ve ventrálním gangliu protilátka značila několik typů neuronů. Pár velkých, silně značených neuronů se nachází mediálně v suboesophageální části ventrálního ganglia (Obr. 11 C, D), somata 2 bilaterálně uspořádaných buněk leží ve ventrální oblasti thorakální části ventrálního ganglia (Obr. 11 C, D). Osovou rovinou ventrálního ganglia prochází 2 tenké svazky nervových vláken, ke kterým v abdominální oblasti přiléhá 5–6 malých, slabě značených neuronů, které jsou segmentálně uspořádány (Obr. 11 E, F). Intenzita signálu těchto neuronů byla nízká oproti ostatním pozitivním skupinám neuronů. Pro imunodetekci byly použity larvy 3. instaru ve fotoperiodicky senzitivní fázi. Vzhledem k tomu, že v buňkách cirkadiálního oscilátoru nebyl zaznamenán pozitivní signál, nebyly dál testovány denní fluktuace v hladině Per proteinu.



**Obr. 10:** Schématické znázornění Tim pozitivních buněk v CNS larev *C. costata*. Zeleně, Tim imunoreaktivní buňky a jejich procesy, červeně Per pozitivní sLNv buňky.

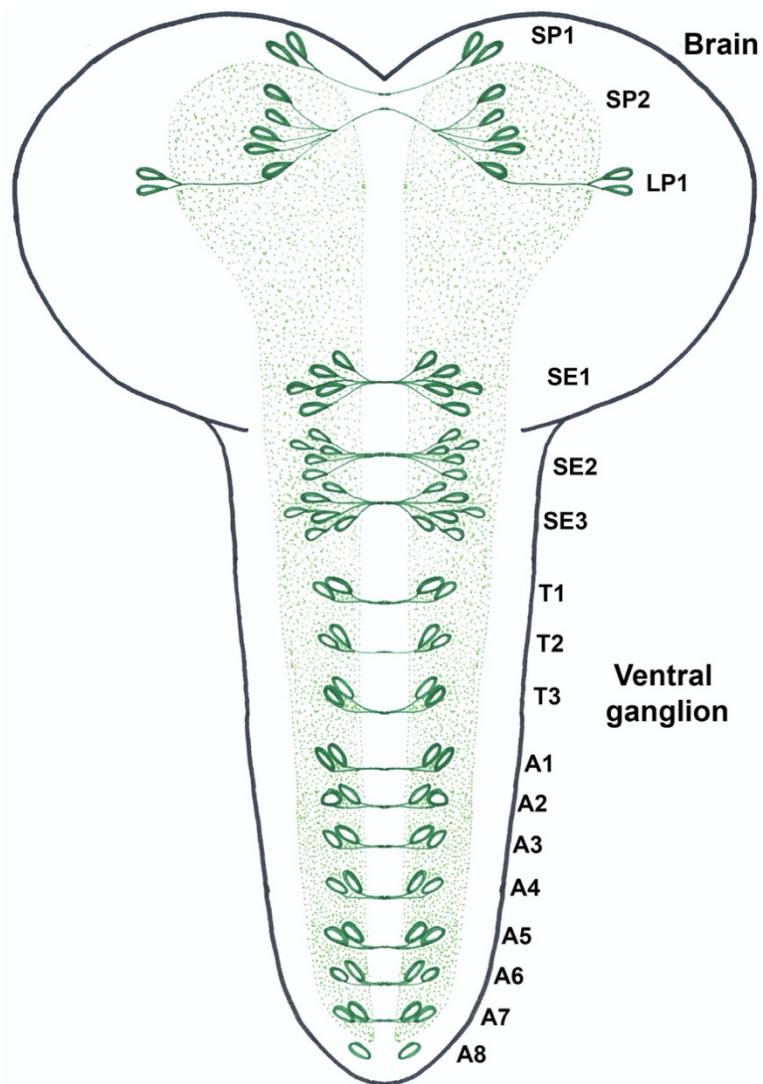


**Obr. 11:** Tim pozitivní buňky v CNS u larev *C. costata*. **A, B** Tim pozitivní buňky v centrálním mozku a ukázka vzájemné polohy s Per pozitivními sLNv buňkami (červeně v obrázku B). Bílé šipky značí 3 dorzolaterální neurony a bílá hlava šipky 1 neuron v medioventrální části mozku. **C-F** Lokalizace Tim pozitivních buněk ve ventrálním gangliu a jejich axonální procesy. Bílé hvězdičky zobrazují neurony ležící v suboesophageální a thorakální části ventrálního ganglia; černá hlava šipky ukazuje 5-6 bilaterálních slabě značených neuronů v thorakální části ventrálního ganglia; bílé hlavy šipek zobrazují buňky v mediální části centrálního mozku, dvojitá bílá hlava šipky značí nespecifický signál v buňkách v suboesophageální části ventrálního ganglia Měřítka 50  $\mu$ m.

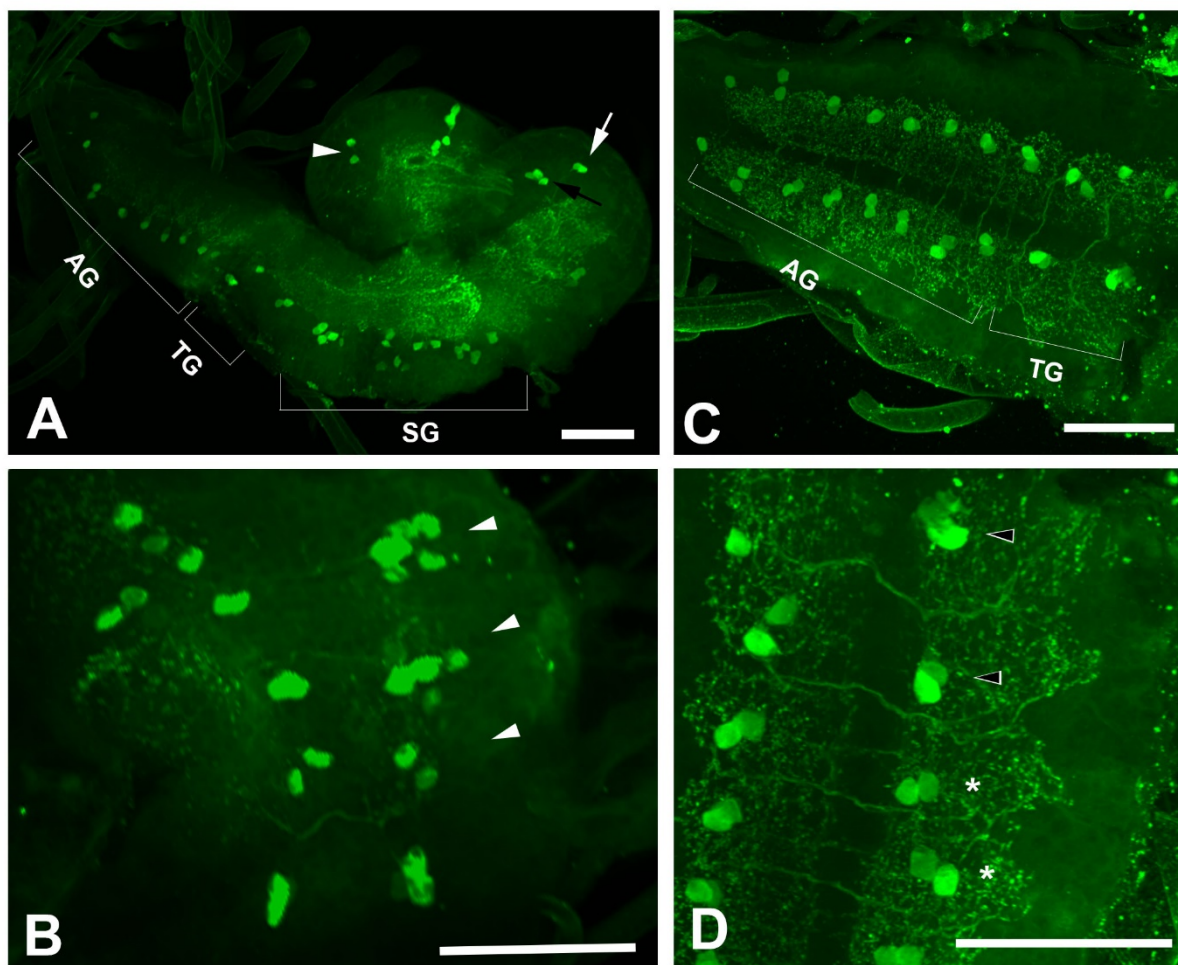
### 4.3 Imunohistochemická lokalizace serotoninu v mozku larvy *C. costata*

Zjištěná distribuce Tim proteinu byla porovnána s lokalizací neurotransmiteru serotoninu, u kterého se předpokládá jeho uplatnění v indukci diapauzy. K detekci serotoninu byla využita komerčně připravena králičí polyklonální protilátka (Sigma Aldrich, Cat. nu. S5545).

Protilátka proti serotoninu značí několik desítek neuronů v buňkách centrálního mozku i ventrálního ganglia (Obr. 12). Skupina buněk složená ze 4 menších a 2 větších dorzálněji umístěných neuronů (Obr. 13A) se nachází v dorzomediálním protocerebru každé mozkové hemisféry. Axony vybíhající z těchto buněk dávají vznik nervovému vláknu směřujícímu k ventrálnímu gangliu a dvěma kontralaterálním spojkám. Rovněž vytváří hustou síť nervových vláken v mediální oblasti centrálního mozku, která bilaterálně vybíhá do ventrálního ganglia a splývá s hustou sítí nervových vláken tvořených buňkami ventrálního ganglia. V každé hemisféře centrálního mozku se laterálně od této nervové sítě nachází pár slabě značených neuronů (Obr. 13A). Ve ventrálním gangliu k této síti ventrálně přiléhají segmentálně uspořádané bilaterální klastry neuronů, které jsou navíc propojeny komisurami. V suboesophageální části ventrálního ganglia se nachází 3 klastry tvořené 4-5 buňkami (Obr. 13B). V thorakální části leží 3 klastry tvořené dvěma buňkami a v abdomenální části ganglia se nachází 7 klastrů tvořených 2 buňkami, z nichž vždy 1 vykazuje slabší signál oproti druhé (Obr. 13 C, D). Nejvíce posteriorně se nachází pouze 1 bilaterální neuron (Obr. 13C)



**Obr. 12:** Schématické znázornění serotonin pozitivních buněk v CNS larev *C. costata*. Zkratky označují jednotlivé serotonin pozitivní neurony v mozku. SP1-SP2: dorzální neurony; LP1: laterální neurony; SE1-SE3: neurony v subesophageální části ventrálního ganglia; T1-T3: neurony v thorakální části ventrálního ganglia; A1-A8: neurony v abdominální části ventrálního ganglia.

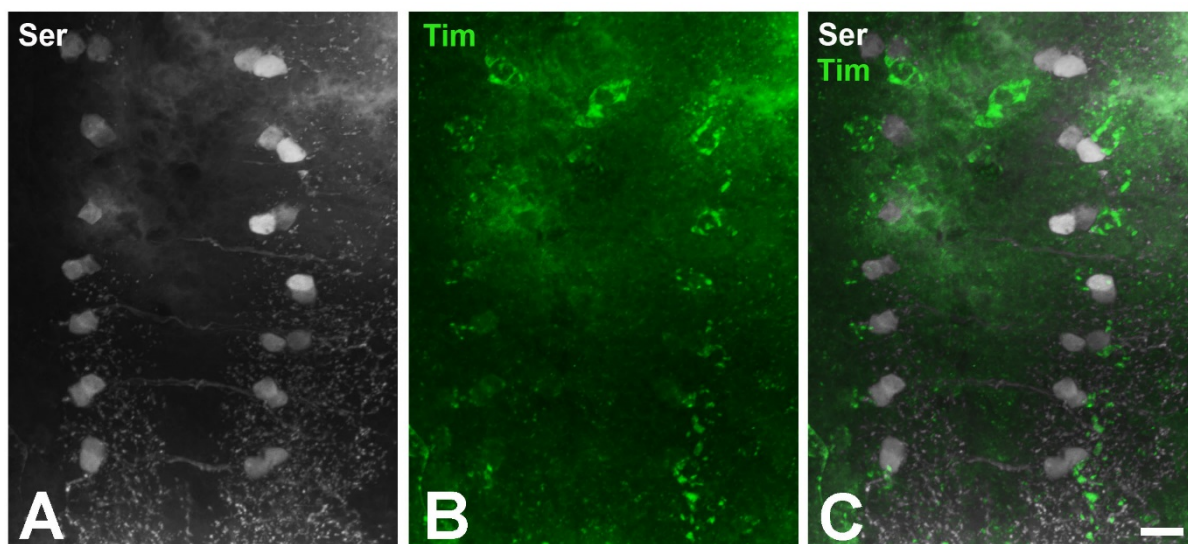


**Obr. 13:** Serotonin pozitivní buňky v CNS larev *C. costata*. **A** Imunodetekce serotoninu v celé CNS. Bílá šipka zobrazuje 2 větší dorzální neurony; černá šipka klastr 4 menších neuronů v dorzomediálním protocerebru obou mozkových hemisfér, bílá hlava šipky slabé, laterální neurony. **B** detailní snímek serotonin pozitivních neuronů v subesophageální (SG) oblasti mozku, bílé hlavy šipek. **C** buňky v thorakální (TG) a abdominální části ventrálního ganglia (AG). **D** detailní zobrazení buněk v thorakální části ventrálního ganglia (TG, černé hlavy šipek) a buněk v abdominální části ventrálního ganglia (AG, bílé hvězdičky). Měřítka A a B 50  $\mu\text{m}$ , měřítka C a D jsou 30  $\mu\text{m}$ .



#### 4.4 Určení vzájemné polohy Tim a serotonin pozitivních neuronů ve ventrálním gangliu v mozku larev *C. costata*

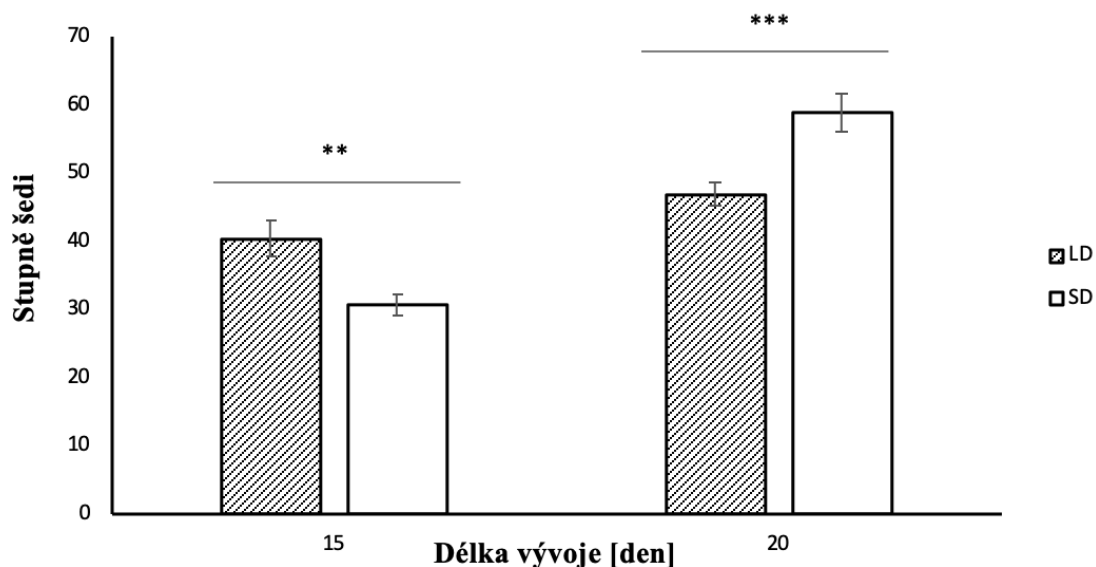
Během lokalizace Tim a serotoninu byla zaznamenána podobná poloha pozitivních neuronů ve ventrálním gangliu, proto byl proveden experiment, kdy obě protilátky byly aplikovány na jeden preparát a jelikož se jedná o primární protilátky ze stejného typu donorového organismu, musely být aplikovány postupně. Analýza získaných dat ukázala, že Tim pozitivní buňky se přímo dotýkají serotonin pozitivních buněk, které se nachází v abdominální oblasti ventrálního ganglia tak, že přiléhají k ventrálně umístěné buňce z každého bilaterálního páru (Obr. 14).



**Obr. 14:** Vzájemná lokalizace Tim a serotonin pozitivních neuronů v abdominální části ventrálního ganglia mozku larev *C. costata*. **A** serotonin pozitivní buňky. **B** Tim pozitivní buňky. **C** proložení snímků A a B. Měřítko 10  $\mu\text{m}$ .

#### 4.5 Stanovení intenzity signálu v serotonin pozitivních buňkách larev *C. costata* v různém stáří a fotoperiodických režimech

Vzhledem k předpokladu, že Tim protein by mohl ovlivňovat expresi serotoninu v závislosti na délce fotoperiody, byla studována intenzita Tim proteinu a serotoninu u fotoperiodicky senzitivních larev *C. costata*, starých 15 dnů po vylínutí a u diapauzních a nediapauzních larev starých 20 dnů od vylíhnutí. V intenzitě signálu mezi jednotlivými skupinami Tim pozitivních buněk nebyl pozorován žádný výrazný rozdíl, ale intenzita signálu byla ve všech případech velice nízká a nebylo možno nasnímat obrazy v dostatečném množství a kvalitě vhodné pro kvantifikaci. Intenzita serotoninového signálu byla měřena v programu ImageJ (viz Materiál a metody) v serotonin pozitivních buňkách pouze v abdomenální části ventrálního ganglia, a to v blízkosti buněk obsahující protein Tim. Srovnání intenzity signálu odrážející stupně šedi u fotoperiodicky senzitivních larev ukázalo zvýšenou hladinu serotoninu u larev držných v podmínkách dlouhého dne než v podmínkách krátkého dne, zatímco u larev, které vstoupily do diapauzy je hladina serotoninu signifikantně vyšší oproti intenzitě signálu naměřené u nediapauzních jedinců (Obr. 15).



**Obr. 15:** Srovnání intenzity signálu v serotonin pozitivních buňkách v abdomenální části ventrálního ganglia. Intenzita signálu byla stanovena ve stupních šedi v rozmezí od 0-255 a to 15. a 20. den vývoje u jedinců držných v dlouhém (LD) a krátkém (SD) dni. Statistická významnost byla stanovena pomocí párového t-testu na 0,01 % hladině průkaznosti (\*\*) pro 15. den vývoje a na 0,001 % (\*\*\*) hladině průkaznosti pro 20. den vývoje (průměr ± SEM, n = 102).

## 5 Diskuze

Funkční vztah cirkadiánních a fotoperiodických hodin byl studován u fotoperiodicky senzitivních larev *C. costata* pomocí imunodetekce proteinu Tim, který je nezbytný pro indukci diapauzy v podmínkách krátkého dne (Stehlík et al. 2008) a zároveň se předpokládá jeho zapojení v kontrolním mechanismu centrálního oscilátoru podobně jako je tomu u *D. melanogaster* (Seghal et al., 1994; Myers et al., 1995).

Pomocí protilátky namířené proti úseku proteinu Tim v rozmezí 489–501 aminokyselin byl detekován pozitivní signál ve 3 dorzálních a 1 mediálním neuronu každé mozkové hemisféry a v několika typech buněk ventrálního ganglia. Pár intenzivně značených neuronů se nachází v mediální oblasti anteriorní části ventrálního ganglia a 2 páry v jeho laterální oblasti. V mediální oblasti abdominální části ventrálního ganglia se nachází nejméně 5 párů segmentálně uspořádaných slabě značených buněk (Obr. 10). V oblasti centrálního oscilátoru (sLNv neurony) nebyl detekován žádný Tim pozitivní signál podobně jako při použití protilátky namířené proti úseku 557–663 Tim aminokyselinové sekvence (Stehlík et al. 2008). Nepřítomnost Tim proteinu v buňkách cirkadiánního oscilátoru naznačuje, že cirkadiánní hodiny *C. costata* jsou řízeny molekulárním mechanismem odlišným od *D. melanogaster*. Tim protein se v tomto mechanismu buď vůbec neuplatňuje nebo je velmi nestabilní. Na základě současných poznatků o charakteru světločivného pigmentu Cry u *C. costata* (Schotner, unpublished data) lze usuzovat, že nepřítomnost proteinu Tim v buňkách centrálního oscilátoru může být vysvětlena nepřetržitou degradací Tim způsobenou možnou interakcí s Cry, který není degradován světlem na rozdíl od Cry u *D. melanogaster* (Ashmore et al., 2003). Jaderná lokalizace Per v NPD mutantech *C. costata* ukazuje, že Tim není nezbytný pro translokaci Per do jádra (Schotner, unpublished data). Narozdíl od *D. melanogaster*, kde Per vstupuje do jádra jako heterodimer s Tim (Curtin et al., 1995; Gekakis et al., 1995; Zeng et al., 1996). Navzdory velice slabým oscilacím per mRNA u *C. costata* nedochází k akumulaci Per v cytoplazmě. Při absenci jeho dimerizačního partnera, Per pravděpodobně vstupuje do jádra jako monomer (Schotner, unpublished data).

Specifická Tim pozitivních buněk byla zjišťována pomocí aplikace preimunního séra, při jehož aplikaci nebyl detekován žádný pozitivní signál. Byla rovněž testována imunoreaktivita protilátky Tim-19 u NPD linií, kde byl zaznamenán slabý signál ve všech detekovaných Tim pozitivních buňkách, ale vzhledem k tomu, že se nejedná o nulového mutantu, pouze u mutantu s krátkou delecí, u kterého byla stanovena i určitá hladina *tim* mRNA, tyto pokusy nepřinesly jednoznačnou odpověď. Vzhledem k tomu, že nulový mutant není dostupný, tak další studie,



jako je in-situ hybridizace se sondou lokalizující *tim* mRNA je nezbytná k potvrzení specifacity signálu.

Expresní analýzy odhalily přítomnost sestřihové varianty *tim* mRNA, ve které nedochází k setřihu intronu 10 a dochází ke změně aminokyselinové sekvence na C-konci a ke zkrácení Tim proteinu (Schotner unpublished data). Použitá protilátka byla namířená proti úseku Tim proteinu obsaženém jak v dlouhé, tak v krátké variantě proteinu Tim. Nelze tedy určit, jaká varianta Tim proteinu se v jednotlivých Tim pozitivních buňkách nachází. S ohledem na to, že protilátka namířená proti delší variantě Tim proteinu, konkrétně proti úseku 1265–1277 původní aminokyselinové sekvence nacházející se v blízkosti jejího C-konce nedetekovala žádný pozitivní signál, mohly by všechny Tim pozitivní buňky detekované protilátkou Tim 19 obsahovat pouze krátkou variantu proteinu Tim. Nelze však vyloučit nefunkčnost protilátky Tim 24. Studie srovnávající expresi *tim* mRNA u fotoperiodicky senzitivních a u diapauzních a nediapauzních larev *C. costata* (Stehlík et al. 2008) ukázaly, že zatímco u fotoperiodicky senzitivních larev chovaných v obou fotoperiodických režimech je hladina *tim* mRNA relativně podobná, u vyvíjejících se larev, tj. larev držných v podmínkách dlouhého dne je hladina mRNA vysoká.

Vzhledem k tomu, že u mšice *A. pisum* byla prokázána korelace změn hladin exprese aaNAT a melatoninu s indukcí diapauzy (Barberá et al., 2018), byla exprese *tim* dána do souvislosti s expresí serotoninu, melatoninového prekurzoru. Typ a poloha serotonin pozitivních buněk u *C. costata* odpovídá umístění serotonin pozitivních neuronů u *D. melanogaster* (Nässel et al., 2010.) a z velké části se shoduje i s distribucí aaNAT a melatoninu u mšice *A. pisum* (Barberá et al., 2018). Vzhledem k tomu, že u *C. costata*, neurony obsahující serotonin byly lokalizovány v přímém kontaktu s Tim pozitivními buňkami ležícími v abdominální části ventrálního ganglia, mohl by Tim prostřednictvím těchto buněk regulovat hladinu serotoninu a ovlivňovat indukci diapauzy. Porovnání intenzity signálu v serotonin pozitivních buňkách v abdominální části ventrálního ganglia u fotoperiodicky senzitivních larev a larev vstupujících do diapauzy nebo pokračujících ve vývoji v podmínkách krátkého a dlouhého dne ukázalo zvýšení hladiny serotoninu u diapauzních larev. U *A. pisum* je produkce diapauzních stádií v podmínkách krátkého dne spojena se zvýšeným množstvím melatoninu (Barberá et al., 2018). Pro určení, zda se jedná o podobnou závislost by bylo zapotřebí změřit množství melatoninu u diapauzních a nediapauzních larev *C. costata* a stanovit tak vzájemný vztah mezi hladinou prekurzoru a jeho finálního produktu. Studie srovnávající množství serotoninu u diapauzních a nediapauzních larev *C. costata* pomocí kapalínové chromatografie (HPLC) však odhalily zvýšené množství serotoninu v CNS u nediapauzních larev (Košťál et

al., 1999). Tato měření však odráží množství serotoninu ve všech cca 64 serotonin pozitivních buňkách, zatímco intenzita signálu byla stanovena pouze v 34 buňkách abdominální části ventrálního ganglia. Podání serotoninu ve stravě nebo naopak jeho nedostatek nevyvolal změny ve schopnosti indukce, průběhu a terminace diapauzy (Košťál et al., 1999). Otázkou zůstává, zda serotonin pozitivní buňky abdominálního ganglia jsou citlivé na serotonin podávaný ve stravě a hladina vznikajícího melatoninu jako finální produktu nemusí být stravou ovlivněna.

Centrum fotoperiodických hodin by se mohlo nacházet ve ventrálním gangliu v Tim pozitivních buňkách. Právě ventrální ganglion je u *D. melanogaster* místem tvorby mnoha biogenních aminů a neuropeptidů, které by mohly být zahrnuty v regulaci indukce diapauzy. U *D. melanogaster* serotonin pozitivní buňky obsahují rovněž biogenní amin dopamin (Niens et al., 2017). Tyto neurony se nacházejí v podobné pozici jako buňky alatostatiny typu B a C (Nässel, et al., 2010.), které se podílí na tvorbě juvenilního hormonu. Juvenilní hormony spolu s biogenními aminy hrají roli v sezónní iniciaci diapauzy (Denlinger, 2000, 2002, Denlinger et al., 2005).

Vstupní dráha fotoperiodických hodin by mohla být zajištěna zatím nefunkčními cirkadiánními hodinami v s-LNv buňkách, kde protein Cry v součinnosti s Tim zprostředkovává informaci o délce fotoperiody. Tomu nasvědčuje rozdílná hladina Cry detekovaná u diapauzních a nediapauzních larev závislá na přítomnosti proteinu Tim (Schotner, unpublished data). Součinnost cirkadiánních a fotoperiodických hodin u *C. costata* by spadala do kategorie modelu dvou nezávislých vzájemně úzce kooperujících systémů, které sdílejí jednotnou vstupní dráhu s tím, že fotoperiodický systém převládá v larválním stádiu, zatímco systém cirkadiánních hodin se stává plně funkční až v pozdějších vývojových stádiích (Bertolini et al).

## 6 Závěr

Fotoperiodicky senzitivní larvy octomilky *C. costata* byly použity ke studiu vzájemné závislosti cirkadiánních a fotoperiodických hodin. Za tímto účelem byla u těchto larev stanovena exprese proteinu Tim v centrální nervové soustavě. Protein Tim byl vybrán jako známá komponenta zahrnutá v řízení cirkadiánních hodin hmyzu a zároveň jako složka zodpovědná za indukci diapauzy. Zjištěná distribuce Tim proteinu byla porovnána s distribucí biogenního aminu serotoninu, z kterého vzniká melatonin, tj. hormon, o kterém se předpokládá, že by mohl ovlivňovat jak fotoperiodické hodiny, tak cirkadiánní hodiny hmyzu. Na základě zjištěné lokalizace obou komponent byla vyslovena hypotéza, že cirkadiánní a fotoperiodické hodiny fungují jako dva nezávislé systémy, které sdílí vstupní dráhu světelného signálu. Zatímco u larev hrají významnou roli fotoperiodické hodiny, cirkadiánní hodiny nejsou ještě plně funkční.

## 7 Seznam použitých zkratek

5 <sup>th</sup> -sLNv	malý pátý ventro-laterální neuron
aaNAT	N-acetyltransferáza
<i>Clk</i>	<i>clock</i>
<i>cwo</i>	<i>clockwork</i>
<i>Cyc</i>	<i>cycle</i>
DNs	dorzální nervové buňky
ITP	iontový transportní peptid
l-LNv	velké ventro-laterální nervové buňky
LNd	dorzo-laterální nervové buňky
LNs	laterální nervové buňky
LNv	ventro-laterální nervové buňky
LPN	posteriorní laterální nervové buňky
NPD	non-photoperiodic diapause mutant
NPF	neuropeptid F
PDF	pigment disperzní faktor
Pdp1	PAR domain protein 1ε
<i>per</i>	<i>period</i>
s-LNv	malé ventrolaterální nervové buňky
<i>tim</i>	<i>timeless</i>
<i>vri</i>	<i>vrille</i>

## 8 Seznam použité literatury

- Allada, R. 2003. Circadian Clocks: A tale of Two Feedback Loops. *Cell*. 112 (3). 284-286. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00076-X.
- Allada, R., White, N.E., So, Wv., Hall, J.C., Rosbach, M.1998. A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell* 93. 791–804.
- Andrewartha, H.G. 1952. Diapause in relation to the ecology of insects. *Biological Reviews*. 27. 50–107.
- Ashmore, L. J., Sathyanarayanan, S., Silvestre D. W., Emerson, M. M., Schotland, P., Sehgal, A. 2003. Novel insights into the regulation of the timeless protein. *J Neurosci*. 23(21). 7810-7819. DOI:10.1523/JNEUROSCI.23-21-07810.2003.
- Barberá, M., Escrivá, L., Colantes-Allegre, J. M., Meca, G., Rosato, E., Martínez-Torres, D. 2018. Melatonin in the seasonal response of the aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Science*. 27 (2). 224-238. DOI: 10.1111/1744-7917.12652.
- Bargiello, T.A., Jackson, F.R., Young, M.W., 1984. Restoration of circadian behavioral rhythms by gene transfer in *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 312. 752–754.
- Bell, R.A., Rasul, C.G., Joachim, F.G. 1975. Photoperiodic induction of the pupal diapause in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Journal of Insect Physiology* 21. 1471–1480.
- Bembenek, J., Sehadová, H., Ichihara, N., Takeda, M. 2005. Day/Night fluctuations in melatonin content, arylalkylamine N-acetyltransferase activity and NAT mRNA expression in the CNS, peripheral tissues and hemolymph of the cockroach, *Periplaneta americana*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 140. 27-36.
- Bertolini, E., Schubert, F. K., Zanini, D., Sehadová, H., Helfrich-Förster, C., Menegazzi, P. 2019. Life at High Latitudes does not require circadian behavioral rhythmicity under constant darkness. *Current Biology*. 29. 3928-3936. DOI: 10.1016/j.cub.2019.09.032.
- Blau, J., Young, M. W. 1999. Cycling *wrille* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell*. 99 (6). 661-671. DOI:10.1016/s0092-8674(00)81554-8.
- Bloch, G., Hazan, E., Rafaeli, A. 2013. Circadian rhythms and endocrine functions in adult insects. *Journal of Insect Physiology*. 59 (1). 56-69. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2012.10.012.
- Boothroyd, E. C., Young, W. M. 2008. The In(put)s and Out(put)s of the *Drosophila* Circadian Clock. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1129. 350-357. DOI: 10.1196/annals.1417.006
- Bowen, M. F., Bollenbacher, W. E., Gilbert, L. I. 1984. In vitro studies on the role of the brain and prothoracic glands in the pupal diapause of *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 108. 9-24.

- Bradshaw, W. E., Holzapfel, C. M. 1975. Biology of tree-hole mosquitoes: photoperiodic control of development in Northern *Toxorhynchites rutilus* (Coq.). *Canadian Journal of Ecology*. 53 (7). 889-93. DOI: 10.1139/z75-102.
- Bradshaw, W. E., Lounibos, L. P. 1977. Evolution of dormancy and its photoperiodic control in the pitcher-plant mosquitoes. *Society for the Study of Evolution*. 31. 546-67. DOI: 10.2307/2407521.
- Bradshaw, W.E., Holzapfel, C.M. 2001. Phenotypic evolution and the genetic architecture underlying photoperiodic time measurement. *Journal of Insect Physiology*. 47. 809–820.
- Bünning, E. 1936. Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der Photoperiodischen Reaktion. *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft*. 53. 590-607.
- Bünning, E. 1969. Common features of photoperiodism in plants and animals. *Photochem Photobiol*. 9(3). 219-228. DOI:10.1111/j.1751-1097.1969.tb07286.x.
- Cazaméa-Catalan, D., Besseau, L., Falcón, J., Magnanou, E. 2014. The timing of timezyme diversification in vertebrates. *Plos One* 9. e112380.
- Curtin, K. D., Huang, Z. J., Rosbash, M. 1995. Temporally regulated nuclear entry of the *Drosophila* period protein contributes to the circadian clock. *Neuron*. 14 (2). 365-372. DOI:10.1016/0896-6273(95)90292-9.
- Cymborowski, B., Lewis, R.D., Hong, S.-F., Saunders, D.S. (1994). Circadian locomotor activity rhythms and their entrainment by light-dark cycles continues in flies (*Calliphora vicina*) surgically deprived of their optic lobes. *Journal of Insect Physiology*. 40. 501-510.
- Cyran, S. A., Buchsbaum, A. M., Reddy, K. L., Lin, M. Ch., Glossop, N. R. J., Hardin, P. E., Young, W. M., Storti, R. V., Blau, J. 2003. *Vrille*, *Pdp1*, and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*. 112 (3). 329-341. DOI:10.1016/s0092-8674(03)00074-6.
- Danilevsky, A.S. 1961. *Photoperiodism and Seasonal Development of Insects*. Leningrad State University Press, Leningrad (in Russian) s. 243.
- Danks, H.V. (Ed.). 1994. *Insect Life-Cycle Polymorphism: Theory, Evolution and Ecological Consequences for Seasonality and Diapause Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, s. 376.
- Denlinger, D. L. 1972. Induction and termination of pupal diapause of *Sarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae). *The Biological Bulletin*. 142 (1). 11-24.
- Denlinger, D.L., 2000. Molecular regulation of insect diapause. Storey, K.B., Storey, J.M. (Eds.), *Environmental Stressors and Gene Responses*. Elsevier, Amsterdam, 259-75.
- Denlinger, D.L., 2002. Regulation of diapause. *Annual Review of Entomology* 47. 93-122.

- Denlinger, D.L., Yocum, G.D., Rinehart, J.P., 2005. Hormonal control of diapause. Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science Endocrinology*. vol. 3. Elsevier. Amsterdam, s. 615–650.
- Dibner, C., Schibler, U., Albrecht, U. 2010. The Mammalian Circadian Timing System: Organization and Coordination of Central and Peripheral Clocks. *Annu. Rev. Physiol.* 72. 517-549.
- Doležel, D., Vaněčková, H., Šauman, I., Hodková, M., 2005. Is period gene causally involved in the photoperiodic regulation of reproductive diapause in the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*? *Journal of Insect Physiology*. 51. 655–659.
- Finocchiaro, L., Callebert, J., Launay, J. M., Jallon, J. M. 1988. Melatonin biosynthesis in *Drosophila*: Its Nature and Its effect. *Journal of Neurochemistry*. 50 (2). 382-387. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1988.tb02923.x
- Garczynski, S.F., Brown, M. R., Shen, P., Murray, T. F., Crim, J. W. 2002. Characterization of a functional neuropeptide F receptor from *Drosophila melanogaster*. *Peptides*. 23 (4). 773-780. DOI: 10.1016/S0196-9781(01)00647-7.
- Gekakis, N., Saez, L., Delahaye-Brownm A. M., et al. 1995. Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL. *Science*. 270(5237). 811-815. DOI:10.1126/science.270.5237.811.
- Glossop, N. R., Houl, J. H., Zheng, H., Ng, F. S., Dudek, S. M., Hardin, P. E. 2003. VRILLE feeds back to control circadian transcription of clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron* 37. 249–261.
- Gorbet, D. J., Steel, C. G. H. 2003. A miniature radioimmunoassay for melatonin for use with small samples from invertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134. 193-197.
- Grimma, B., Chélot, E., Xia, R., Rouyer, F. 2004. Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of The *Drosophila* brain. *Nature*. 431. 869-873. DOI: 10.1038/nature02935.
- Hall, C. J. 2000. Cryptochromes: sensory reception, transduction, and clock functions subserving circadian system. *Current Opinion in Neurobiology*. 10 (4). 456-466. DOI: 10.1016/S0959-4388(00)00117-3.
- Hall, J.C. 2003. Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila* and other insects. *Advance in Genetics*. 48. 1-280. DOI: 10-1016/S0065-2660(03)48000-0.
- Hardin, P. E. 2004. Transcription regulation within the circadian clock: the E-box and beyond. *Journal of Biological Rhythms*. 19 (5). 348-360. DOI:10.1177/0748730404268052.
- Hardin, P. E. 2005. The circadian timekeeping system of *Drosophila*. *Current Biology*. 15(17). DOI: 10.1016/j.cub.2005.08.019.
- Helfrich-Förster, C. 2002. The circadian System of *Drosophila Melanogaster* and Its Light Input Pathways. *Zoology*. 105 (4). 297-312. DOI: 10.1078/0944-2006-00074.

- Helfrich-Förster, C. 2003. The Neuroarchitecture of the Circadian Clock in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Microscopy Research and Technique* 62, 94-102.
- Helfrich-Förster, C. 2004. Neurobiology of the fruit fly's circadian clock. *Genes, Brain and Behaviour*. 4. 65-76. DOI: 10.1111/j.1601183X.2004.00092.x.
- Helfrich-Förster, C. 2004. The circadian clock in the brain: a structural and functional comparison between mammals and insects. *J Comp Physiol A*. **190**. 601–613. DOI: 10.1007/s00359-004-0527-2.
- Helfrich-Förster, C. 2006. The neural basis of *Drosophila*'s circadian clock. *Sleep and Biological Rhythms*. 4. 224-234. DOI: 10.1111/j.1479-8425.2006.00233.x.
- Helfrich-Förster, C. 2009. Neuropeptide PDF plays multiple roles in the circadian clock of *Drosophila melanogaster*. *Sleep and Biological Rhythms*. 7 (3). 130-143. DOI: 10.1111/j.1479-8425.2009.00408.x.
- Helfrich-Förster, C. 2019. Light input pathways to the circadian clock of insects with an emphasis on the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology A*. 206. 259-272. DOI: 10-1007/s00359-019-01379-5.
- Hermann-Luibl, Ch., Yoishii, T., Senthilan, R. P., Dircksen, H., Helfrich-Förster, C. 2014. The Ion Transport Peptide Is a New Functional Clock Neuropeptide in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Neuroscience*. 34 (29). 9522-9536. DOI: 10.1523/JNEURCOSCI.0111-14.2014.
- Hermann, C., Yoshii, T., Dusik, V., Helfrich-Forster, C. 2012. Neuropeptide F immunoreactive clock neurons modify evening locomotor activity and free-running period in *Drosophila melanogaster*. *J.Comp. Neurol*. 520 (5). 970-987. DOI: 10.1002./cne.22742.
- Hodková, M., Syrová, Z., Doležel, D., Šauman, I., 2003. Period gene expression in relation to seasonality and circadian rhythms in the linden bug *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *European Journal of Entomology*. 100. 267-273.
- Houl, J.H., Yu, W., Dudek, S.M. Hardin, P.E. 2006. *Drosophila* CLOCK is constitutively expressed in circadian oscillator and non-oscillator cells. *Journal of Biological Rhythms*. 21. 93-103. DOI: 10.1177/0748730405283697.
- Hunter-Ensor, M., Ousley, A., Seghal, A. 1996. Regulation of the *Drosophila* Protein Timeless Suggests a Mechanism for Resetting the Circadian Clock by Light. *Cell*. 84 (5). 677-85. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81046-6.
- Cheng-Jun, L., Xiao-Pei, Y., Xiao-Juan, Y., Bin, L. 2018. Functional Analysis of the Circadian Clock Gene Timeless in *Tribolium Castaneum*. *Insect Sci*. 25 (3). 418-428. DOI: 10.1111/1744-7917.12441.
- Chung, B., Kilman, L. V., Keath, J. R., Pitman, L. J., Allada, R. 2009. The GABA<sub>A</sub> Receptor RDL Acts in Peptidergic PDF Neurons to Promote sleep in *Drosophila*. *Current Biology*. 19 (5). 386-390. DOI: 10.1016/j.cub.2009. 01.040.



- Iwai, S., Fukui, Y., Fujiwara, Y., Takeda, M. 2006. Structure and expressions of two circadian clock genes, period and timeless in the commercial silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*.
- Jackson, F. R., Schroeder, A. J., Roberts, M.A., McNeil, G. P., Kume, K., Akten, B. 2001. Cellular and molecular mechanisms of circadian control in insects. *Journal of Insect Physiology*. 47 (8). 833-842. DOI: 10.1016/S0022-1910(01)00056-7.
- Johard, H., Yoishii, T., Dirksen, H., Cusumano, P., Rouyer, F., Helfrich-Förster, C., Nässe, R. 2009. Peptidergic clock neurons in *Drosophila*: Ion transport peptide and short neuropeptide F in subsets of dorsal and ventral lateral neurons. *The Journal of Comparative Neurology*. 516 (1). 59-73. DOI: 10.1002/cne.22099.
- Kadener, S., Stoleru, D., McDonald, M., Nawathean, P., Rosbash, M. 2007. Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Dev*. 21(13). 1675-1686. DOI:10.1101/gad.1552607.
- Kaneko, M., Hall, C. J. 2000. Neuroanatomy of Cells expressing Clock genes in *Drosophila*: Transgenic manipulation of the period and timeless Genes to Mark the Perikarya of Circadian Pacemaker Neurons and their Projections. *The Journal of Comparative Neurology*. 422. 66-94.
- Kaneko, M., Helfrich-Förster, C., Hall, J.C. 1997. Spatial and Temporal expression of the period and timeless genes in the developing nervous system of *Drosophila*, newly identified pacemaker candidates and novel features of clock gene product cycling. *J. Neurosci*. 17. 6745-6760.
- Kennerdell, J.R., Carthew, R.W. 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled2 act in the wingless pathway. *Cell*. 95. n1017–1026.
- Kim, E. Y., Edery, I. 2006. Balance between DBT/CKIepsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein. *Proceedings of the Nat. Acad. of Sci. U S A*. 103 (16). 6178-6183. DOI:10.1073/pnas.0511215103.
- Kloss, B., Price, L. J., Rotheffluh, A., Wesley, S. C., Young, W. M. 1998. The *Drosophila* Clock Gene double-time encodes a protein closely related to Casein kinase Iε. *Cell*. 94 (1). 97-107. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81225-8.
- Konopka, J. R., Benzer, S. 1971. Clock Mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 68 (9). 2112-2116. DOI. 10.1073/pnas.68.9.2112.
- Košťál, V. 2011. Insect photoperiodic calendar and circadian clock: Independence, cooperation or unity? *Journal of Insect Physiology*. 57. 538-556. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2010.10.006.
- Košťál, V., 2006. Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology* 52. 113–127.

- Košťál, V., Noguchi, H., Shimada, K., Hayakawa, Y. 1999. Dopamine and serotonin in the larval CNS of a drosophilid fly, *Chymomyza costata*: Are they involved in the regulation of diapause? *Archives of Insects Biochemistry and Physiology*. 42. 147-162.
- Košťál, V., Shimada, K., Hayakawa, Y. 2000. Induction and development of winter larval diapause in drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology*. 46. 217-428.
- Lee, G., Bahn, J. H., Park, J. H. 2006. Sex – and clock-controlled expression of the neuropeptide F gene in *Drosophila*. *Proceedings of the Nat. Acad. of Sci. USA*. 103 (33). 12580-12585. DOI: 10.1073/pnas.0601171103.
- Lees, A. D. The role of photoperiod and temperature in the determination of parthenogenetic and sexual forms in the aphid *Megoura viciae*. III. Further properties of the maternal switching mechanism in apterous aphids. *Journal of Insect Physiology*. 1963. 9. 153–164.
- Lees, A.D. 1955. *The Physiology of Diapause in Arthropods*. Cambridge University Press, Cambridge, s. 151.
- Lim, C., Chung, B. Y., Pitman, J. L., McGill, J. J., Pradhan, S., Lee, J., Keegan, K. P., Choe, J., Allada, R. 2007. Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in *Drosophila*. *Current Biology*. 2007. 17(12). 1082-1089. DOI: 10.1016/j.cub.2007.05.039.
- Lin, Y., Stormo, D. G., Taghert, H. P. 2004. The Neuropeptide Pigment-Dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* Circadian system. *Journal of Neuroscience*. 24 (36). 7951-7957. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2370-04.2004
- Lucas, R. J. 2013. Mammalian inner retinal photoreception. *Curr. Biol*. 23. 125-133.
- Masaki, S. 1980. Summer diapause. *Annual Review of Entomology* 25. 1–25.
- Matsumoto, A., Ukai-Tadenuma, M., Yamada, R. G., Houl, J., Uno, K. D., Kasukawa, T., Dauwalder, B., Itoh, T. Q., Takahashi, K., Ueda, R., Hardin, P. E., Tanimura, T., Ueda, H. R. 2007. A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev*. 21(13). 1687-1700. DOI:10.1101/gad.1552207.
- Meuti, M. E., Denlinger, D. 2013. Evolutionary links between circadian clocks and photoperiodic diapause in insects. *Integrative and Comparative Biology*. 53 (1). 131-143. DOI: 10.1093/icb/ict023.
- Miyasako, Y., Umezaki, Y., Tomioka, K. 2007. Separate set of cerebral clock neurons are responsible for light and temperature entrainment of *Drosophila* circadian locomotor rhythms. *Journal of Biological Rhythms*. 22 (2). 115-126. DOI: 10.1177/0748730407299344.
- Mohamed, A. A. M., Wang, Q., Bembenek, J., Ichihara, N., Hiragaki, S., Suzuki, T., Takeda, M. 2014. N-acetyltransferase (nat) is a critical conjunct of photoperiodism between the circadian system and endocrine axis in *Antheraea pernyi*. *Plos One* 9. e92680.

- Moritz, F. A. R., Sakofski, F. 1991. The role of the queen in circadian rhythms of honeybees (*Apis mellifera* L.). Behavioral Ecology and Sociobiology. 29. 361-365.
- Murad, A., Emery-Le, M., Emery, P. 2007. A subset of Dorsal Neurons modulates Circadian Behaviour and Light Responses in *Drosophila*. Neuron. Elsevier Inc. 53. 689-701. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.01.034.
- Myers, M. P., Wager-Smith, K., Rothenfluh-Hilfiker, A., Young, MW. 1996. Light-induced degradation of TIMELESS and entrainment of the *Drosophila* circadian clock. Science. 271(5256). 1736-1740. DOI:10.1126/science.271.5256.1736.
- Myers, M.P., Wager-Smith, K., Wesley, C.S., Young, M.W., Sehgal, A., 1995. Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, timeless. Science. 270. 805–808.
- Nässel, D., Winther, A. 2010. *Drosophila* neuropeptides in regulation of physiology and behavior. Progress in Neurobiology. 92. 42-104.
- Nelson, R. J., Denlinger, D. L., Somers, D. E. Photoperiodism. The Biological Calendar. 1. vydání. New York: Oxford University Pres, Inc. 2009. s. 580. ISBN 978-0-19-533590-3
- Niens, J., Reh, F., Riemensperger, T., et al. 2017. Dopamin modulates serotonin innervations in the *Drosophila* brain. Front. Syst. Neurosci. 11 (76). 1-13.
- Nijhout, H.F. 2003. Development and evolution of adaptive polyphenism. Evolution and Development 5. 9–18.
- Orchard, I., Loughton, B.G., 1985. Neurosecretion. Kerkut. G.A., Gilbert, L.I. (Eds.), Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Endocrinology, 7. Pergamon Press, Oxford, s. 61–107.
- Parisky, K., Agosto, J., Pulver, S., Shang, Y., Kuklin, E., Hodge, J., Kang, K., Liu, X., Garrity, P., Rosbash, M., Griffith, L. 2008. PDF Cells are a GABA-Responsive Wake – Promoting Component of the *Drosophila* Sleep Circuit. Neuron. 60 (4). 672-682. DOI: 10-1016/j.neuron.2008.10.042
- Picot, M., Cusumano, P., Klarsfeld, A., Ueda, R., Rouyer, F. 2007. PLoS Biol. 5(11). 315. DOI: 10.1371/journal.pbio.0050315
- Pittendrigh, C.S. 1966. The circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* pupae: A model for the photoperiodic clock. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie. 64. 275-307.
- Pittendrigh, C.S. 1972. Circadian surfaces and the diversity of possible roles of circadian organization in photoperiodic induction. Proceedings of the National Academy of Science USA 69. 2734–2737.
- Pittendrigh, C.S., Minis, D.H., 1964. The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. American Naturalist. 98. 261–294.

- Price, J.L., Blau, J., Rothenfluh, A., Abodeely, M., Kloss, B., Young, M.W. 1998. Double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell*. 94. 83-95. DOI: S0092-8674(00)81224-6
- Reddy, P., Zehring, W.A., Wheeler, D.A., Pirrotta, V., Hadfield, C., Hall, J.S., Rosbash, M., 1984. Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* 38. 701–710
- Rieger, D., Shafer, O. T., Tomioka, K., Helfrich-Förster, C. 2006. Functional Analysis of Circadian Pacemaker Neurons in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurosci.* 26 (9). 2531-43. DOI: 10/1523/JNEUROSCI.1234-05.2006
- Richier, B., Michard-Vanhée, C., Lamouroux, A., Papin, C., Rouyer, F. 2008. The clockwork orange *Drosophila* protein functions as both an activator and a repressor of clock gene expression. *Journal of Biological Rhythms.* 23(2). 103-116. DOI:10.1177/0748730407313817
- Riihimaa, A.J., Kimura, M. 1988. A mutant strain of *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae) insensitive to diapause-inducing action of photoperiod. *Physiological Entomology.* 13. 441–445.
- Rosato, E., Peixoto, A.E., Costa, R., Kyriacou, C.P. 2006. Linkage disequilibrium, mutational analysis and natural selection in the repetitive region of the clock gene, period, in *Drosophila melanogaster*. *Genetical Research.* 69, 89–99.
- Rubin, B. E., Shemesh, Y., Cohen, M., Elgavish, S., Robertson, M. H., Bloch, G. 2006. Molecular and Phylogenetic Analyses Reveal Mammalian-Like Clockwork in the Honey Bee (*Apis Mellifera*) and Shed New Light on the Molecular Evolution of the Circadian Clock. *Genome Res.* 16 (11), 1351-65. DOI: 10.1101/gr.5094806.
- Sandrelli, F., Costa, R., Kyriacou, C. P., Rosato, E. 2008. Comparative analysis of circadian clock genes in insects. *Insect Molecular Biology.* 17 (5), 447-463
- Saunders, D. S. (1982) *Insect Clocks*. 2nd ed. Pergamon, Oxford, UK.
- Saunders, D. S. (1987) Insect photoperiodism: The linden bug, *Pyrrhocoris apterus*, a species that measures daylength. *Experientia.* 43. 935-937.
- Saunders, D. S. 2002. *Insect Clocks*. 3rd edition. Elsevier Science. Amsterdam. s 560
- Saunders, D.S. 2010. Photoperiodism in insects: migration and diapause responses Photoperiodism. Nelson, R.J., Denlinger, D.L., Somers, D.E. (Eds.). *The Biological Calendar*. Oxford University Press. Oxford, s. 218–257.
- Saunders, D.S., Henrich, V.C., Gilbert, L.I. 1989. Induction of diapause in *Drosophila melanogaster*: Photoperiodic regulation and the impact of arrhythmic clock mutations on time measurement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 86. 3748–3752.

- Sehgal, A., Price, J.L., Man, B., Young, M.W., 1994. Loss of circadian behavioural rhythms and per mRNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science* 263. 1603–1606
- Seithikurippu, R. P.-P., Bahammam, A., Brown, M. G., Cardinali, D. P. 2013. Melatonin antioxidative defense: Therapeutical implications for aging and neurodegenerative processes. *Neurotoxicity research*. 23 (3). 237-300.
- Seugé, J., Vieth, K. 1976. Diapause de *Pieris brassicae*: role des photorécepteurs céphaliques, étude des caroténoïdes, cérébraux. *Journal Insects of Physiology*. 22. 1229-1235.
- Shafer, O. T., Helfrich-Förster, C., Renn, S., Taghert, P. 2006. Reevaluation of *Drosophila melanogaster*'s neuronal circadian pacemakers reveals new neuronal classes. *The Journal of Comparative Neurology*. 498. 180-193. DOI: 10.1002/cne
- Sharma, K. V. 2003 Adaptive Significance of Circadian Clocks, *Chronobiology International*. 20 (6). 901-919. DOI: 10.1081/CBI-120026099
- Sheeba, V. 2008. The *Drosophila Melanogaster* Circadian Pacemaker Circuit. *Journal of Genetics*. 87. 485-493. DOI: 10.1007/s12041-008-0071-x
- Sheeba, V., Fogle, K., Kaneko, M., Rashid, S., Chou, Y-T., Sharma, V., Holmes, T. 2008. Large Ventral Lateral Neurons modulate arousal and sleep in *Drosophila*. *Current Biology*. 18 (20). 1537-1545. DOI: 10.1016/j.cub.2008.08.033
- Shiga, S., Numata, H., 2007. Neuroanatomical approaches to the study of insect photoperiodism. *Photochemistry and Photobiology* 83. 76-86.
- Shimizu, I. 1982. Photoperiodic induction in the silkworm, *Bombyx mori*, reared on artificial diet: Evidence for extraretinal photoreception. *Journal of Insects Physiology*. 28. 841-846.
- Stanewsky, R. 2002. Clock mechanisms in *Drosophila*. *Cell and Tissue and Research*. 309. 11-26. DOI: 10.1007/s00441-002-0569-0
- Stehlík, J., Závodská, R., Shimada, K., Šauman, I., Košťál, V. 2008. Photoperiodic induction of diapause requires repressed transcription of Timeless in the larval brain of *Chymomyza costata*. *Journal of Biological Rhythms*. 23(2). 120-139.
- Stoleru, D., Nawathean, P., Fernández, M., Menet, S. J., Ceriani, F., Rosbash, M. 2007. The *Drosophila* Circadian Network is a Seasonal Timer. *Cell*. Elsevier. Inc. 129. 207-219. DOI: 10.1016/j.cell. 2007.02.038
- Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J., Rosbash, M. 2004. Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature*. 431. 862-868. DOI: 10.1038/nature02926
- Stoleru, D., Peng, Y., Nawathean, P., Rosbash, M. 2005. A resetting signal between *Drosophila* pacemakers synchronizes morning and evening activity. *Nature*. 438. 238-242.

- Syrová, Z., Doležel, D., Šauman, I., Hodková, M., 2003. Photoperiodic regulation of diapause in linden bugs: Are period and Clock genes involved? *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60. 2510–2515.
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Sanchez-Barcelo, E., Mediavilla, M. D., Reiter, R. J. (2010). Significance of high levels of endogenous melatonin in Mammalian cerebrospinal fluid and in the central nervous system. *Current neuropharmacology*. 3. 162–167. DOI: 10.2174/157015910792246182
- Tanaka, Y. 1950. Studies on hibernation with special reference to photoperiodicity and breeding of the Chinese Tussor-Silworm I. *Nippon Sanshigaku Zasshi*. 19. s. 358.
- Tauber, E., Kyriacou, C.P. 2001. Insect photoperiodism and circadian clocks: models and mechanisms. *Journal of Biological Rhythms*. 16. 381–390.
- Tauber, M. J., Tauber, C. A., Masaki, S. 1986. Seasonal adaptations of insects. Oxford University Press. New York
- Tomioka, K., Matsumoto, A. 2010. A comparative view of insect circadian clock systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 67, 1397-1406
- Tomioka, K., Uryu, O., Kamae, Y., Umezaki, Y., Yoshii, T. 2012. Peripheral circadian rhythms and their regulatory mechanism in insects and some other arthropods: a review. *Journal of Comparative Physiology B*. 182.729–740.
- Tomioka, K., Yoshii, T. 2006. Entrainment of *Drosophila* circadian rhythms by temperature cycles. *Sleep and Biological Rhythms*. 4. 240-247. DOI: 10.1111/j. 1479-8425.2006.00227.x
- Veleri, S., Brandes, C., Helfrich-Forster, C., Hall, J.C., and Stanewsky, R. (2003). A self-sustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. *Curr Biol*. 13. 1758-1767. DOI: 10. 1016/j.cub.2003.09.030
- Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W., Takahashi, J.S., 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene Clock, essential for circadian behaviour. *Science* 264, 719–725.
- Williams, C.M. 1969. Photoperiodism and the endocrine aspects of insect diapause. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 23. 85–300.
- Wolda, H. 1988. Insect seasonality. Why? *Annual Review of Ecology and Systematic* 19. 1–18
- Yadlapalli, S., Jiang, Ch., Bahle, A., Reddy, P., Meyhofer, E., Shafer T. O. 2018. Circadian Clock Neurons Constantly Monitor Environmental Temperature to Set Sleep Timing. *Nature*. 555 (7694). 98-102. DOI: 10.1038/nature25740
- Yoshii, T., Heshiki, Y., Ibuki-Ishibashi, T., Matsumoto, A., Tanimura, T., Tomioka, K. 2005. temperature cycles drive *Drosophila* oscillation in constant light that otherwise induces behavioral arrhythmicity. *European Journal of Neurosciences*. 22. 1176-1184. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04294.x

- Yu, W., Hardin, P.E. 2006. Circadian oscillators of *Drosophila* and mammals. *Journal of Cell Science*. 119(23). 4793-4795. DOI:10.1242/jcs.03174
- Zehring, W.A., Wheeler, D.A., Reddy, P., Konopka, R.J., Kyriacou, C.P., Rosbash, M., Hall, J.C., 1984. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell* 39. 369–376
- Zeng, H., Qian, Z., Myers, M. P., Rosbash, M. 1996. A light-entrainment mechanism for the *Drosophila* circadian clock. *Nature*. 380(6570). 129-135. DOI:10.1038/380129a0
- Zhu, H., Yuan, Q., Briscoe, A. D., Froy, O., Casselman, A., Reppert, S. M. 2005. The two CRYs of the butterfly. *Current Biology*. 15, 953-954