Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Funkční analýza exprese HSP komplexu v odpovědi na chlad u *Drosophila melanogaster*

Diplomová práce

Bc. Tomáš Štětina

Školitel: prof. Ing. Vladimír Košťál, CSc.

České Budějovice 2015

Poděkování:
Tímto bych rád poděkoval všem přátelům, spolupracovníkům Entomologického ústavu a rodinným příslušníkům za neustávající podporu. Především ale děkuji školiteli prof. Ing. Vladimíru Košťálovi, CSc. za jeho profesionální přístup, bez kterého by tato práce nemohla vzniknout.

ŠTĚTINA, T., 2015: Funkční analýza exprese komplexu HSP v odpovědi na chlad u *Drosophila melanogaster*. [Functional analysis of HSP complex expression in response to cold in *Drosophila melanogaster*. MSc Thesis, in Czech.] – 47 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace: The constitutively obsereved up-regulation of Hsp70 expression often led to premature conclusions about its critical role as a repair mechanism of cold injury that is, besides, expressed by protein misfolding/denaturation. In this study, we analyze the cold tolerance and the expression of 24 different mRNA transcripts of Hsp complex and other genes, that are associated with the repair of injury caused by cold. We use two strains of *D. melanogaster*: the wild type and the mutant type Hsp70$^-$ null, that lacks all 6 copies of the gene *hsp70*. We found out, that the larvae of two strains do not differ in their patterns of target genes expression during long term acclimation nor during recovery from chronic cold exposure and acute cold shock, therefore there is no transcriptional compensation of any other Hsp gene for the missing *hsp70* in Hsp70$^-$ strain. The cold tolerance of Hsp70$^-$ strain larvae was impaired only, when they were exposed to strong acute cold shock by temperatures below -8°C. No difference in cold tolerance was observed, when the larvae were exposed to chronic cold exposure in 0°C or to mild acute cold shock by temperatures up to -4°C. Based on our results we assess, that the cold injury caused by strong acute cold schock is of another nature than caused by mild cold conditions and only in the first case Hsp70 expression is critical for the repair of cold injury in *Drosophila melanogaster* larvae.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval 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 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, 20. dubna 2015 .....

Tomáš Štětina

Obsah:

1. Úvod **1**

2. Materiál a metody **5**

2.1 Modelové organismy 5

2.2 Vývojové aklimace a vystavení chladu 6

2.3 Analýza četnosti transkriptu mRNA 8

2.4 Statistika 9

3. Výsledky **10**

3.1 Larvy kmene Hsp70^{-} vykazují sníženou tepelnou odolnost 10

3.2 Přežívání larev Oregon a Hsp70^{-} se nelišíí po chronickém vystavení chladu 0°C (CCE) 10

3.3 Larvy kmene Hsp70^{-} se vyznačovaly narušeným přežíváním po vystavení akutnímu chladovému šoku (ACS) 11

3.4 Larvy tří kmenů se liší v konstitutivní úrovni exprese cílových genů 11

3.5 Exprese genů v odpovědi na dlouhodobou chladovou aklimaci (LTA) se mezi dvěma kmeny neliší 12

3.6 Exprese genů během zotavování neodhaluje žádnou kompenzaci za chybějící gen Hsp70 u kmene Hsp70^{-} 13

4. Diskuze **14**

4.1 Up-regulace mRNA transkriptů Hsp70 v odpovědi na chlad není vždy nutná pro reparaci chladového poškození 14

4.2 Up-regulace transkriptu genu Hsp70 může být potřebná k nápravě chladového poškození způsobeného silným akutním chladovým šokem 16

4.3 Exprese genů komplexu Hsps v reakci na chlad 17

4.4 Odpověď dalších genů spojovaných s reparací chladového poškození v reakci na vystavení chladu 19

5. Závěry **21**

6. Citace **22**

7. Obrázková a tabulková příloha **32**

1. Úvod

V podstatě veškeré druhové zástupce třídy *Insecta* můžeme popsat jako malé ektotermní organismy se sníženou schopností udržování tělesné teploty. Kvůli tomuto omezení si hmyz vyvinul různé komplexní fyziologické mechanismy, které mu umožňují vyrovnávat se s nízkou tělesnou teplotou (Lee, 2010). Mezi takové mechanismy patří např.:

(a) kvalitativní a kvantitativní změny ve strukturálním složení kutikuly: je významné zejména pro zabránění evaporace a inokulace způsobené průnikem ledu skrze tělní schránku.

(b) biosyntéza nízkomolekulárních kryoprotektantů: spočívá ve znatelném snížení rovnovážného bodu mrznutí (konkrétně 1,86 °C na 1 Osmol/kg solutů) (Lee, 2010). Mezi kryoprotektanty řadíme polyoly (glycerol, sorbitol, mannitol nebo etylenglykol), cukry (glukóza a trehalóza) a také volné aminokyseliny (Lee, 1991).

(c) akumulace AFPs: z angl. „Anti-freeze Proteins“, jsou skupinou proteinů zabraňujících v růstu zárodečných krystalů adsorpcí na jejich povrch (Dumann, 1997; Dumann et al., 2010).

(d) restrukturace membrán: je potřebná pro zabránění přechodu z tekuté/funkční fáze, která je zaručena při optimálních teplotách, do tuhé/nefunkční gelové fáze, do které se membrány dostávají působeních teplot nízkých (Košťál, 2010).

(e) aktivace komplexu Hsps: viz níže

Tyto mechanismy jsou důležité pro zabránění výskytu různých typů chladového poškození, které se dají obecně rozdělit do tří kategorií:

(a) *nepřímé chladové poškození*: narůstá během dlouhodobého, chronického vystavení (v řádu dní až měsíců) mírnému chladu (hypotermní teploty okolo 0°C nebo nad 0°C) a je pravděpodobně svou podstatou spojeno s: narušením fungování metabolických drah, akumulací toxických meziproduktů, včetně reaktivních molekul (oxidativní stres), nedostatkem volné chemické energie a následným narušením iontové rovnováhy (Hochachka, 1986; Rojas & Leopold, 1996; Košťál et al., 2004; MacMillan & Sinclair, 2011; MacMillan et al., 2012).

(b) *přímé chladové poškození*: nastává jako důsledek krátkého vystavení podmínkám silného chladu (kryotermní teploty blížící se bodu podchlazení SCP, avšak bez zmrznutí) akutního rázu (v řádu minut až hodin). Následky takového poškození jsou: disociace multimerních makromolekulárních komplexů, ztráta enzymatické aktivity, denaturace proteinů (Privalov, 1990; Tsai et al., 2002; Razvi & Scholtz, 2006), fázové přechody

v membránových lipidech, masivní průtok iontů membránami a rychlá buněčná smrt (Knight et al., 1986; Drobnis et al., 1993).

(c) *mrazové poškození*: je spojeno s růstem ledových krystalů, přičemž dochází k mechanickému poškození buněčných struktur a zakoncentrování solutů, které mohou překročit limity toxicity a vážnou dehydrataci, což má za následek fůzi nekompatibilních buněčných membránových organel (Muldrew et al., 2004).

Naše studie se soustřeďuje na opravu chladového poškození u larev octomilky *Drosophila melanogaster*, což je druh hmyzu tropického původu pocházející z oblasti rovníkové Afriky (Lachaise et al., 1988). Tropické druhy hmyzu se obvykle vyznačují pouze omezenou tolerancí k chladu, např. vývoj vajíček, larev a kukel octomilky se zastavuje již při poklesu teplot pod 10°C (Loeb et al., 1917). Některé druhy nicméně disponují schopnostmi umožňující vylepšení chladové tolerance jako důsledek dlouhodobé aklimace (z angl. long-term acclimation; dále jen LTA) v časovém rozsahu dnů až týdnů (Emerson et al., 2009; Košťál et al., 2011; Colinet & Hoffmann, 2012). V praxi se veškerý doposud studovaný hmyz, včetně octomilky mimo jiné vyznačoval i schopností zlepšení své chladové tolerance v časové škále řádu minut až hodin (z angl. rapid cold hardening; dále jen RCH) (Lee et al., 1987, Lee & Denlinger, 2010). Tento mechanismus napomáhá k prevenci chladového poškození během denních změn okolní teploty (Kelty & Lee, 2001).

Fyziologické mechanismy probíhající při LTA a RCH jsou pravděpodobně různé (Lee & Denlinger, 2010; Teets & Denlinger, 2013). RCH je závislé na rychlých buněčných procesech založených na signálních kaskádách a změnách ve fosforylaci proteinů (Teets & Denlinger, 2013). LTA, stejně jako v přirozených podmínkách probíhající sezónní chladová aklimace, je již více systemická, vysoce komplexní záležitost a často je spuštěna s předstihem, před příchodem období chladu. Je spojována s přechodem z aktivního stavu života do stavu pozastavení vývoje, který nazýváme diapauzou (Denlinger, 1991; Košťál, 2006). Diapauza a sezónní aklimatizace se vyznačují výraznou proměnou fenotypu, založenou na celkových změnách v transkripci genů, expresi proteinů a složení metabolomu (Ragland et al., 2010; Colinet et al., 2012; Hayward, 2014). Adaptivní komplex LTA vede k iniciaci hned několika fyziologických mechanismů, mezi něž řadíme:

(a) regulaci aktivity nukleátorů ledu pro ovlivnění rovnovážného bodu mrznutí SCP (z angl. „supercooling capacity point“) (Salt, 1961; Zachariassen, 1985);

(b) syntézu nízkomolekulárních kryoprotektantů (Sömme, 1982; Storey & Storey, 1991);

(c) syntézu proteinů regulujících postup formace zárodečných ledových krystalů; (Zachariassen & Krisansen, 2000; Dumann, 2001);

(d) kompoziční resturkturaci membrán (Košťál, 2010);

(e) up-regulaci buněčných ochranných systémů sloužících k ochraně před apoptózou (Yi et al., 2007), oxidativním poškozením (Lalouette et al., 2011) a denaturací proteinů (Rinehart et al., 2007; Košťál & Borovanská, 2009).

Kvůli komplexitě, rozsálosti a provázanosti různých procesů je však velmi obtížné studovat role mechanismů LTA jednotlivě (Hayward et al., 2007).

Ve své práci popisuji úlohu šokových proteinů (z angl. Heat Shock Proteins; dále jen Hsps), konkrétně inducibilní formu Hsp70, jako součást adaptivního komplexu LTA u larev *D. melanogaster*. Důvodů pro výběr octomilky je hned několik: (1) *Drosophila* je dobře ustanovený, geneticky probádaný modelový organismus a zaručuje dobrou znalost genetické struktury a fyziologických funkcí Hsps (Adams et al., 2000; Crill et al., 1996; Ritossa, 1962; Lindquist, 1986; Lindquist & Craig, 1988; Sorensen et al., 2003; Sorensen et al., 2005). (2) *Drosophila* disponuje značnou schopností zdokonalení chladové odolnosti v reakci na chladovou aklimaci, jak v případě RCH tak LTA (Košťál et al., 2011; Czajka & Lee, 1990; Košťál et al., 2012), avšak fyziologický princip tohoto přizpůsobení je vpodstatě neznámý. (3) Druhová rozmanitost v rodině *Drosophilidae* je často využívána ve srovnávacích studiích různých geografických linií v oblasti stresové odolnosti, včetně chladové odolnosti, s cílem porozumět evolučním vzorům speciace, vysvětlit principy obývání ekologických nik a/nebo předpovědět případnou odezvu na klimatické změny (Hoffmann, 2010; Kellermann et al., 2012). (4) Hlavním důvodem je však to, že doposavadní studie zabývající se Hsps ve spojitosti s chladem přinesly variabilní výsledky (Yiangou et al., 1997; Goto et al., 1998; Nielsen et al., 2005; Qin et al., 2005; Sinclair et al., 2007; Udaka et al., 2010; Colinet et al., 2010a). Bylo zjištěno, že 70 kDa Hsps se syntetizují během zotavování z dlouhodobého vystavení 0°C při absenci tepelného šoku, a že mírné tepelné „před-ošetření“ (angl. pre-treatment; dále jen PT) napomohlo k prevenci mortality způsobené následovaným vystavením chladu (Burton et al., 1988). Od této průlomové studie byla chladem vyvolaná up-regulace komplexu Hsps opakovaně pozorována u octomilek na úrovni jak RNA, tak proteinu (Goto & Kimura, 1998; Goto et al., 1988; Sinclair et al., 2007; Colinet et al., 2010a). Colinet et al. (2010b) navíc zjistili, že znemožnění exprese malých genů *Hsp22* a *Hsp23* pomocí RNAi prodlužuje dobu zotavení z chladového komatu. Tyto výsledky, spolu s funkčními studiemi (RNAi) provedenými na Hsps u jiných druhů hmyzu (Rinehart et al., 2007; Košťál & Tollarová-Borovanská, 2009) podpořily představu o tom, že Hsps hrají důležitou roli v chladové

odolnosti hmyzu. Nielsen et al. (2005) však provedli studii s tepelně citlivým mutantním kmenem *D. melanogaster*, který je postižen mutací v genu *Hsf*, poskytující produkt šokový faktor (angl. Heat Shock Factor; dále jen HSF). Exprese mRNA genu HSF se zastavuje při teplotách nad 30°C (Nielsen et al., 2005; Jedlicka et al., 1997). Ve své studii Nielsen et al. (2005) přesvědčivě prokázali, že aktivace HSF a následující exprese *Hsp70* se neprojevila během RCH a, ačkoliv se projevila během LTA, žádný příznivý efekt této up-regulace pro chladovou odolnost *D. melanogaster* nebyl zpozorován.

Hlavní úlohou této práce bylo objasnit, zda-li up-regulace inducibilního genu Hsp70 v souvislosti s LTA a se zotavováním po vystavení chladu hraje, či nehraje roli v adaptačním komplexu chladové odolnosti *D. melanogaster*. Odpovědi na chlad byly srovnávány u dvou kmenů octomilky: divoký typ (z angl. wild-type, *wt*), v práci označován jako kmen Oregon R (Lindsey et al., 1968) a mutantní, zde označován jako Hsp70^{-}, který postrádá všech 6 kopií genu *Hsp70* (Gong & Golic, 2004). Zaměřili jsme se na chladovou odolnost larev plně rostlého 3. instaru, které byly aklimovány (LTA) při nízkých teplotách (15°C a následně 6°C) za účelem dosažení jejich maximální chladové odolnosti (Košťál et al., 2011). Následovné působení dlouhodobého vystavení mírnému chladu (angl. chronic cold exposure; dále jen CCE) bylo odlišeno od působení krátkodobého vystavení akutnímu chladovému šoku (angl. acute cold shock; dále jen ACS). Ve studii byly navíc aplikovány dva různé chladové PT subletálními dávkami chladu, a to chronického či akutního rázu, za účelem vyvolání exprese inducibilních Hsps před samotným vystavením chladu. Metodou qRT-PCR byly kvantifikovány úrovně exprese transkriptu mRNA *Hsp70* a dalších 19 genů komplexu Hsp plus 4 další geny (*Frost, Menin, Starvin,* CG9705), pravděpodobně spojené s chladovou aklimací či nápravou chladového poškození, nebyla však pozorována žádná kompenzační odpověď za chybějící gen *Hsp70* u kmene Hsp70^{-}. Na základě našich výsledků tvrdíme, že up-regulace mRNA *Hsp70* nemusí být vždy potřebná pro nápravu chladového poškození, ačkoliv je tato up-regulace vždy přítomna v odpovědi na chladovou aklimaci a při zotavování z chladového vystavení. Zjistili jsme, že chladová odolnost mutantů Hsp70^{-} je snížena pouze, pokud jsou larvy vystaveny ACS při teplotách ≤ -8°C. Vystavení mírnějším dávkám chladu, a to jak CCE (0°C) či ACS (až do -4°C), mělo za následek podobné poměry přežívání/mortality mezi oběma kmeny Oregon a Hsp70^{-}.

2. Materiál a metody:

2.1. Modelové organismy:

Hlavní část experimentu byla prováděna na dvou kmenech octomilky *Drosophila* (*Sophophora*) *melanogaster* (Meigen, 1830): divoký typ *wt*, konkrétně kmen Oregon R (Lindsley & Grell, 1968), a mutaní kmen Hsp70$^-$ (Gong & Golic, 2004), který byl získán z „Bloomington Drosophila Stock Center, ev. č. 8841 s genotypen: w[1118]; Df(3R)Hsp70A, Df(3R)Hsp70B. Kmen Oregon disponuje ve svém genomu šesti téměř identickými kopiemi genu, který kóduje protein Hsp70. Právě Hsp70 svou četností zodpovídá za většinu objemu produktů Hsps, které jsou exprimovány po tepelném šoku (Feder & Krebs, 1998). U mutantního kmene w[1118] bylo z genomu všech šest kopií genu *Hsp70* odstraněno metodou homolgní rekombinace, což dalo vzniknout homozygotnímu kmenu Hsp70$^-$. (Gong & Golic, 2004). Larvy kmene White (mutace v lokusu *white*; Morgan, 1910), které sloužily jako genetické pozadí při tvorbě kmene Hsp70$^-$, byly použity v naší studii za účelem ověření konstitutivní úrovně genové exprese nestresovaných larev. V důsledku ztráty genu *Hsp70*, larvy i dospělci kmene Hsp70$^-$ vykazovali sníženou tepelnou odolnost, která se projevovala nízkým nebo nulovým přežíváním po silném tepelném šoku (39-39,5°C), kterému předcházel neletální tepelný PT (35-36°C). Je zajímavé, že přežití po mírném tepelném šoku (<37°C) není negativně ovlivněno ztrátou *Hsp70* (Gong & Golic, 2006; Bettencourt et al., 2008). Chovy všech kmenů byly udržovány ve skleněných tubičkách (výška 12 cm, průměr 2,5 cm) při konstantních 18°C, se světelnou periodou 12h/12h světlo/tma (L/D) v inkubátorech MIR 154 (Sanyo Electric, Osaka, Japonsko). Každá tubička obsahovala cca 7-10 g diety, obsahující agar (1%), cukr (5%), kvasnice (4%), kukuřičnou mouku (8%) a metylparaben (0,2%). K ověření, zda-li náš kmen ev. č. 8841 získaný z Bloomington centra skutečně postrádá všechny kopie genu *Hsp70*, jsme navrhli tři páry oligonukleotidových primerů, specifických k sekvenci *Hsp70Aa* (obr. příloha; **Obr. 1**). Následně byla provedena amplifikace PCR úseků gDNA, která byla izolována z deseti dospělých jedinců kmenů Oregon, White a Hsp70$^-$. K získání genomové DNA byl použit „DNeasy Tissue Kit“ (Qiagen, Hilden, Německo) dle návodu výrobce. PCR probíhala na bloku T3000 cycler (Biometra, Goettingen, Německo), za použití enzymu HS ExTaq DNA polymerázy (TaKaRa, Shiga, Japonsko). Podmínky PCR byly následující: (denaturace 94°C / 30 s; annealing 61°C/30 s, extenze 72°C/30 s) opakováno při 20 cyklech. Produkty PCR byly vizualizovány na 2% agarózovém gelu (**Obr. 1**).

Provedli jsme také experiment, který měl potvrdit, že kmen Hsp70$^-$ vykazuje sníženou odolnost vůči tepelnému šoku (Gong & Golic, 2006; Bettencourt et al., 2008). Larvy byly

odebírány z chovů a rozděleny do skupinek po cca 20 kusech na malý kousek diety (asi 0,25 g) ve 2 ml plastových zkumavkách (ústí bylo uzavřeno nylonovou sítí), tyto zkumavky byly vloženy do hliníkového bloku inkubátoru MD-01 (Major Science, Saratoga, California), který byl přednastaven na požadovanou teplotu. Přesná teplota shodující se s teplotou uvnitř zkumavek byla zaznamenána pomocí loggeru S0122 (Comet System, Rožnov pod Radhoštěm). Larvy, aklimované v 22°C, byly v první části experimentu přímo vystaveny 1h tepelnému šoku (angl. „heat shock"; dále jen HS) různé intenzity od 32°C do 38°C bez jakéhokoliv předcházejícího ošetření PT. Druhá skupina stejně aklimovaných larev byla navíc podrobena 1h PT sub-letální teploty 36°C, až poté byly vystaveny silnému HS 38°C nebo 39°C. Mezi PTa HS se vždy larvy 1h zotavovaly při teplotě 22°C. Po HS byly larvy umístěny na čersvou dietu a zotavovaly se při teplotě 18°C po dobu 14 dní. Byla použita dvě kritéria jako indikátor přežití šoku: úspěšná pupariace a ekloze životaschopného dospělce. Přesná data pro tento experiment jsou doložena ve výsledcích.

2.2. Vývojové aklimace a vystavení chladu

Abychom docílili synchronního vývoje larev , dospělcům (cca 30 párů na tubičku) bylo umožněno klást vajíčka po dobu 24 hodin v 18°C. Vajíčka byla následovně převedena do tří různých teplotně aklimačních režimů/protokolů (schéma na **Obr. 2**), kde probíhal jejich vývoj (Colinet & Hoffmann, 2012). Protokoly byly naprogramovány v inkubátorech MIR 154 následujícím způsobem:

(a) Aklimační režim A: konstantních 25°C při fotoperiodě 12L/12D po dobu 4 dnů
(b) Aklimační režim B: konstantních 15°C při fotoperiodě 12L/12D po dobu 12 dní
(c) Aklimační režim C: konstantních 15°C při fotoperiodě 12L/12D po dobu 12 dní následováno 2 dny při konstantních 6°C při stálé tmě (LTA).

Veškeré experimenty byly prováděny na téměř plně rostlých, ale stále se krmících larvách 3. instaru, které byly vždy vzorkovány výběrem největších larev 3. instaru z tubiček, kde se začínaly objevovat první larvy v tzv. „wandering" fázi přibližně v dobách ukončení aklimace (tzn. „wandering" larvy nebyly vzorkovány). Aklimované larvy byly poté podrobeny různým chladovým vystavením a/nebo použity k analýze mRNA.

U většiny experimentů nebyl použit žádný PT. V některých pokusech se však vystavení chladu skládalo ze dvou kroků: chladový PT subletální dávkou chladu následovaný samotným chladovým vystavením. Rozlišovali jsme dva typy chladového vystavení: (a) chronické vystavení chladu (CCE) relativně mírné teploty 0°C po různou dobu v rozsahu 1,25 až 7 dní; (b) akutní chladový šok (ACS) po konstantní dobu 1h, avšak při teplotách silnějšího chladu

od 0°C do -12°C. Podobně provedený PT byl buď chronický (1.25 dní při 0°C, následováno zotavením při 18°C po dobu 2 h) nebo akutní (1h při -4°C, následováno zotavením při 18°C po dobu 2 h). Používáme termín *pre-treatment*, jelikož se naše protokoly liší od klasického RCH jak v době trvání, tak v přítomnosti zotavovací periody, při které byla pozorována exprese Hsps. Veškeré manipulace s larvami před vystavením chladu byly prováděny standardizovaným způsobem, larvy byly odebírány ve stejném čase i při stejné teplotě, aby se minimalizoval potenciální negativní efekt na chladovou odolnost larev. Manipulace vždy trvala 20 min a voda, použitá pro propláchnutí larev z diety, byla vytemperována na hodnotu aklimační teploty.

Skupinky po cca 20 larvách byly buď (CCE) umístěny do 1 g diety v plastových zkumavkách (délka 5 cm; průměr 1 cm), které byly ucpány obvazovou vatou, nebo (ACS) zabaleny mezi dvě vrstvy vatové buničiny (75 mg), která byla napuštěna 300 µl 50% glycerolu v dH_2O a poté umístěny do stejných zkumavek popsaných výše. Voda v takovýchto „vatových kuličkách“ zabránila dehydrataci larev a glycerol sloužil jako ochrana před spontánním krystalizací vody při podnulových teplotách. V záznamu nebyly pozorovány žádné exotermy značící přítomnost promrznutí tkání. V předběžném experimentu jsme si ověřili, že glycerol nemá žádný negativní efekt na přežívání larev. Teplota uvnitř diety či vatové kuličky byla průběžně zaznamenávána během každého experimentu pomocí prób připojených k dataloggeru TC08 (Pico Technology, St. Neots, UK). Při CCE byly tubičky ponechány při konstantní 0°C na tajícím ledu. V případě ACS byly zkumavky s larvami umístěny do nachlazené lázně programovatelného termostatu Minisat 240-cc (Huber, Offenburg, Německo). Teplotní program se skládal ze tří kroků:

(1) zchlazení na požadovanou teplotu (0°C až -12°C) po dobu 10 min;

(2) udržení požadované teploty po dobu 60 min;

(3) ohřátí na 0°C po dobu 10 min.

Po vystavení chladu, byly larvy buď (CCE) vráceny do konst. 18°C v pokusných zkumavkách obsahující dietu nebo (ACS) vybaleny z vatových kuliček a přendány na čerstvou dietu do klasických chovných tubiček. Po obou typech chladového vystavení (CCE a ACS) bylo larvám umožněno zotavit se při konst. 18°C dalších 14 dní. Dvěma kritériemi po přežití byla úspěšná pupariace a úspěšné vylíhnutí životaschopného dospělce. Přesné počty larev použitých pro každý experiment jsou uvedeny ve výsledcích.

2.3. Analýza četnosti transriptu mRNA

Zkoumali jsme expresi celkem 24 různých genů spojených s buněčným stresem: jedenáct inducibilních *„heat shock proteins“* (*Hsp70AaAb, Hsp68, Hsp83, Hsp40, Hsp22, Hsp23, Hsp26, Hsp27, Hsp67Ba, Hsp67Bb, Hsp67Bc*), pět konstitutivních *„heat shock cognates“* (*Hsc70-1, Hsc70-2, Hsc70-3, Hsc70-4, Hsc70-5*), čtyři sestřihové varianty faktoru *„heat shock factor“* (*HsfA, HsfB, HsfC, HsfD*) a čtyři další geny pravděpodobně spojené se stresovou odpovědí a/nebo chladovou aklimací či s reparací v důsledku chladového poškození (*Fst, Mnn, Stv,* CG9705). **Tab. I** obsahuje kompletní seznam cílových a referenčních genů. Relativní četnost transkriptů mRNA cílových genů byla měřena ve třech experimentálních skupinách larev:

(a) vystavené různým dlouhodobým aklimačním režimům (A, B, C; viz výše);
(b) vystavené aklimačnímu režimu C (LTA), poté vystavené CCE 0°C/1,25 dní, s následovaným zotavením při konstantních 18°C po dobu 1, 3 a 24 h;
(c) vystavené aklimačnímu režimu C (LTA), poté vystavené ACS -4°C/1h, s následovaným zotavením při konstantních 18°C po dobu 1, 3 a 24 h.

Pro vystavení larev podmínkám CCE a ACS jsme určili takové dávky chladu, které zaručují poměrně nízkou mortalitu larev po zotavení v časovém rozsahu 24 h, abychom minimalizovali šanci vzorkování mrtvých larev. Mortalita dospělců je ve výše popsaném případě znatelně vyšší (25 - 50%).

Celková RNA byla vyextrahována z celých larev (použito 10 larev/vzorek, každý vzorek byl proveden ve třech biologických replikátech) s použitím RiboZol RNA Extraction Reagent (Amresco, Solon, OH, USA). Peleta s RNA byla rozpuštěna ve 26 µl vody ošetřené DEPC, přičemž alikvot 1 µl byl použit pro měření koncentrace pomocí NanoDrop 2000 (ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA). Koncentrace RNA byly vyrovnány na stejnou hodnotu 1 µg/1 µl. 5 µl alikvoty obsahující 5 µg RNA byly použity k ošetření DNasou I (Ambion, Life Technologies) následovanou syntézou cDNA pomocí kitu Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA). Produkty cDNA byly naředěny 25x sterilní vodou a použity jako templáty pro reakce na qRT-PCR.

Relativní četnosti mRNA transkriptů cílových genů byly měřeny kvantitavtiním Real Time PCR (qRT-PCR) na přístroji CFX96 PCR light cycler (BioRad, Philadelphia, PA, USA) s použitím IQ SYBR Green SuperMix (BioRad). Reakce PCR probíhaly za použití genově specifických oligonukleotidových párů primerů (Generi Biote, Hradec Králové) (**Tab I**). Primery byly navrženy pomocí softwaru Geneious (Biomatters, Nový Zéland), přičemž byla,

pro zachování jejich specifičnosti, zvláštní pozornost věnována genům, které jsou si svou strukturou vysoce podobné (např. rodina šesti genů *Hsp70, Hsp68, Hsp83,* pěti *Hscs*, rodina sedmi malých *Hsps*, čtyři sestřihové varianty *Hsf*).

PCR produkty všech párů primerů byly sekvenovány (GATC Biotech, Constance, Německo) a získané sekvence BLASTovány (blastn) k databázi NCBI. Ve všech případech se sekvence produktů PCR vysoce shodovaly s očekávanými sekvencemi obsaženými v jednotlivých genech (**Tab. I**). Dva geny, *Hsp67Bb* a *Hsp22* se však ve svém lokusu překrývají svou sekvencí pro mRNA. V tomto případě nezaručují naše primery dokonalou specificitu, rozhodli jsme se však tyto výsledky ponechat, jelikož vzory exprese těchto dvou kmenů se liší. V případě genu *Hsp70* byly naše páry primerů použité pro qRT-PCR vysoce specifické pro kopie *Aa* a *Ab*, používáme tedy zkratky *Hsp70Aa, Ab* pro jejich mRNA. Emise fluorescentního signálu vycházejícího z vázání SYBR Green na dvouvláknové DNA produkty PCR byla zaznamenána s narůstajícími cykly PCR reakce. Kvantitativní cyklus (C_Q) každého vzorku byl automaticky vypočten pomocí algoritmu v softwaru cykleru CFX96 PCR light cycler. Úrovně transkriptů mRNA *Ribosomálního proteinu L32 a β-tubulinu 56D* (**Obr. 3**) sloužily jako vnitřní referenční standardy pro relativní kvantifikaci četnosti transkriptů cílových genů (Ponton et al., 2011).

2.4. Statistika

Čas (t) nebo teplota (T), vedoucí k mortalitě 50% populace ve vzorku (dále již jen Lt_{50}, popř. LT_{50}), byla určena v případech vystavení CCE nebo ACS ze sigmoidních křivek zaznamenávajících četnost přežití jako hodnota inflexního bodu křivky mezi horní hranicí (vypočtenou z křivky) a spodní hranicí (ohraničena nulou). Rozdíly v přežití mezi dvěma kmeny (Oregon a $Hsp70^-$) byly posuzovány za použití Studentova nepárového t-testu (alpha = 0,05) nebo pomocí Fischerova exaktního testu. Relativní poměry úrovně transkriptu mRNA cílových genů (C_Q) ku geometrickému průměru úrovně mRNA dvou referenčních genů byly vypočítány dle Pfaffla (Pfaffl, 2001). Relativní poměry převedené na logaritmy (Log2) byly statisticky analyzovány pomocí jednocestné ANOVA (s konfidenčním intervalem nastaveným na 95%) poté podrobeny Bonferronimu post-hoc testu nebo, kde byly srovnávány pouze dva průměry, za pomocí Studentova nepárového dvou výběrovéhot-testu (alpha = 0,05). Výše uvedené statistické operace byly provedeny v programu Prism6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Celkový trend v expresi cílových genů byl analyzován za pomoci analýzy hlavních komponent (PCA) v programu Canoco v. 4.52 (Biometris-Plant Research Institute, Wageningen, Nizozemí).

3. Výsledky:

3.1. *Larvy kmene Hsp70$^-$ vykazují sníženou tepelnou odolnost*

Na **Obr. 4** je znázorněno přežívání larev kmenů Oregon a Hsp70$^-$ vystavených různým podmínkám dlouhodobé aklimace (A, B, C). Ve všech aklimačních režimech larvy vykazovaly vysoký podíl přežívání do stádia pupariace (v rozmezí hodnot 86,8 – 95%). Oba kmeny se však dramaticky lišily v kritériu úspěšného vylíhnutí životaschopného dospělce. U kmene Oregon se většina larev, které dosáhly stádia pupariace, úspěšně vylíhla v dospělé jedince (celkové přežívání do dospělce se pohybovalo v rozmezí 83,1 – 91,8%). Jinak je tomu u kmene Hsp70$^-$, kde byl pozorován poměrně vysoký rozdíl v mortalitě mezi stadii puparia a dospělého jedince, kde se přežívání do dospělce pohybovalo v rozmezí hodnot 44,0 – 55,0 %. Vysoká mortalita byla většinou způsobena neschopností farátního dospělce dostatečně otevřít pupariální schránku a puparium opustit nebo se vyznačovala morfologickými abnormalitami dospělců, kteří prošli úspěšným vylíhnutím (nejčastěji nedovyvinutá křídla). Abychom se tedy vyhnuli zkreslení výsledků způsobeným konstitutivně přítomnou vysokou mortalitou dospělců u kmene Hsp70$^-$, hlavním kritériem pro přežití při porovnání obou kmenů byla zvolena schopnost úspěšné pupariace u experimentů chladové i tepelné odolnosti.

Na **Obr. 5** jsou zobrazeny výsledky testů tepelné odolnosti. Byl pozorován pouze malý rozdíl v přežití mezi larvami kmenů Oregon a Hsp70$^-$, které byly vystaveny pouze přímému tepelnému šoku různé intenzity (od 32°C do 38°C) po konstantní dobu 1 h, bez jakéhokoliv PT. Hodnoty LT_{50} byly u obou kmenů prakticky totožné: Oregon, 35,84°C; Hsp70$^-$, 36,13°C (t-test: t = 1,796, *df* = 10, *P* = 0,1028). Žádné larvy nepřežily přímý tepelný šok o teplotě 38°C. V případě aplikace PT (36°C/1h, není zobrazeno na obr.), který byl proveden před samotným tepelným šokem, bylo přežívání pozitivně ovlivněno u kmene Oregon: 60,6% (*N* = 160) larev ošetřených PT přežilo vystavení 38°C a 38,3% (*N* = 120) přežilo 39°C. Na druhou stranu, velmi malý nebo žádný pozitivní efekt nebyl pozorován u kmene Hsp70$^-$ ošetřených PT: 7,5% (*N* = 160) larev ošetřených PT přežilo vystavení 38°C a 0,3% (*N* = 120) přežilo 39°C. Tyto výsledky potvrzují, že tepelná odolnost larev kmene Hsp70$^-$ je prokazatelně narušena ve srovnání s kmenem Oregon.

3.2. *Přežívání larev Oregon a Hsp70$^-$ se nelišíí po chronickém vystavení chladu 0°C (CCE)*

Výsledné hodnoty Lt_{50} (**Obr. 6A**) se u obou kmenů prakticky neliší: Oregon, 3,61 dní; Hsp70-, 3,63 dní (t-test: *t* = 0,07717, *df* = 10, *P* = 0,9400). Pouze malé procento larev bylo

schopno pupariovat po vystavení CCE 5 dní (Oregon, 10,1%; Hsp70$^-$, 5,0%) a žádné nepřežily vystavení CCE 7 dní. Žádný pozitivní efekt pro přežívání nebyl pozorován, pokud byl aplikován chronický či akutní pre-treatment před CCE 5 dní (není zobrazeno na Obr.), naopak měl mírně negativní efekt na přežívání, což znamená, že kontrolní (bez PT) skupina měla nižší riziko smrti způsobené CCE 5 dní, než skupina larev ošetřených pre-treatmentem (**Tab. II A**)

3.3. *Larvy kmene Hsp70$^-$ se vyznačovaly narušeným přežíváním po vystavení akutnímu chladovému šoku (ACS)*

Výsledné hodnoty LT_{50} (**Obr. 6B**) se u obou kmenů prokazatelně liší: Oregon, -11,00°C; Hsp70$^-$, -8.59°C (t-test: $t = 8{,}668$, $df = 10$, $P < 0{,}0001$). Pouze 46,6, 23,3 a 6,3% larev Hsp70$^-$ přežilo do stádia pupariace po vystavení ACS při teplotách -8°C, -10°C a -12°C v tomto pořadí, zatímco za stejných podmínek přežilo 78,6, 43,8 a 31,0% larev kmene Oregon. Žádný pozitivní efekt nebyl pozorován u larev vystavených PT chronickým či akutním chladem před vystavením ACS -12°C. Negativní efekt PT na přežívání byl statisicky prokázán v případě larev kmene Oregon, v případě Hsp70$^-$ nebyl rozdíl signifikantní (**Tab. II B**).

3.4. *Larvy tří kmenů se liší v konstitutivní úrovni exprese cílových genů*

Obr. 7 shrnuje přítomné rozdíly v relativních úrovních četnosti mRNA cílových genů za nestresových (aklimace A; 25°C) podmínek u tří kmenů. Pokud určíme práh rozdílnosti jako dvojnásobek porovnávaných hodnot, deset genů bylo konstitutivně up-regulováno u kmene Hsp70$^-$ ve srovnání s kmenem Oregon: *Hsp67Bb* (5,6 krát), *Hsp23, Hsp68, Fst, Hsp67Bc, Hsc70-4, Hsp40, Hsp22, Hsp67Ba* a *Hsc70-5* (2,0 krát). Žádný z cílových genů nebyl statisticky prokazatelně down-regulován u larev kmene Hsp70$^-$, pouze úroveň transkriptu *Hsp27* byla 1,6 krát nižší, než u srovnávaného kmene Oregon (**Obr. 7B**). Pozorovaná konstitutivní up-regulace cílových genů u kmene Hsp70$^-$ byla pravděpodobně způsobena rozdílností v genetickém pozadí kmene White, jelikož podobná skupina deseti genů byla konstitutivně up-regulována u larev kmene White při srovnání s larvami kmene Oregon: *Hsp67Bb* (3,5 krát), *Hsp23, Mnn, Hsp68, Hsp67Bc, Fst, Hsp67Ba, Hsp22, Hsc70-1* a *Hsp26* (2,1 krát). Konstitutivní úroveň mRNA transkriptu genu *Hsp27* byla 1,9 krát nižší u kmene White ve srovnání s kmenem Oregon. Nutno dodat, že úrovně mRNA transkriptů *Hsp70Aa, Ab* byly také konstitutivně up-regulovány (3,5 krát) u kmene White ve srovnání s kmenem Oregon (**Obr. 7B**).

3.5. *Exprese genů v odpovědi na dlouhodobou chladovou aklimaci (LTA) se mezi dvěma kmeny neliší*

Odpovědi na tři aklimační režimy (A, B, C) byly kvantitativně a kvalitativně podobné u larev kmenů Oregon a Hsp70$^-$ vyjma jedné zjevné výjimky, kterou je chybějící mRNA transkript u kmene Hsp70$^-$. U kmene Oregon byl transkript mRNA genu *Hsp70Aa, Ab* prokazatelně up-regulován 14,7 krát u chladově aklimovaných larev (C), v porovnání s výchozím (pre-aklimačním) režimem (A). Je zjevné, že tato up-regulace proběhla zejména v odpovědi na finální krok LTA režimu C (tj. 6°C/2 d; **Obr. 10**).

Souhrnná data exprese transkriptů mRNA v odpovědi na aklimační režimy byla zpracována pomocí analýzy PCA (**Obr. 8**). Detailní výsledky statistické analýzy jsou uvedeny na **Obr. 10**. Abychom se vyhnuli zkreslení výsledků PCA kvůli chybějícímu mRNA transkriptu *Hsp70* u kmene Hsp70$^-$, vyřadili jsme tento gen z PCA. Rozdíl v konstitutivních úrovních exprese cílových genů mezi oběma kmeny je zjevný jako jasné rozdělení příslušných vzorků podle komponenty PC2. Tři aklimační režimy jsou očividně rozděleny podle komponenty PC1, která odpovídá za 96,4% variability. Vlastní vektory představující jednotlivé mRNA, které jsou zobrazeny v horní části **Obr.** 8, mohou být interpretovány jako hnací síly určující celkové změny v genové expresi. Zdaleka nejsilnější up-regulace spojená s aklimací byla pozorována u mRNA *HsfD*: 82-krát u kmene Oregon, 93-krát u kmene Hsp70$^-$ Up-regulační odpovědi nižší intenzity (až 6-krát) spojené s aklimačním režimem byly také pozorovány u obou kmenů na úrovni mRNA genů *HsfC, Hsp22, Hsp23, Hsp26, Hsp27, Fst* a *Stv*. Všechny malé *Hsps* a *Mnn* vykazovaly podobný vzor sestávající ze dvou kroků, kdy byly úrovně transkriptu na počátku down-regulovány v odpovědi na aklimaci 15°C (B) a následně byly up-regulovány v odpovědi na finální krok 6°C/2d (C) (**Obr. 10**). Down-regulace úrovně transkriptu v odpovědi na chladovou aklimaci byla jasně pozorovatelná u *HsfA*: 201-krát u kmene Oregon, 139-krát (**Obr. 10**), podobně u *HsfB* a *Hsc70-3*. Pouze několik genů nevykazovalo žádné statisticky významné odchylky v odpovědi na chladovou aklimaci (CG9705, *Hsp67Bc* a dva kognáty *Hsc70-1* a *Hsc70-2*) nebo jen mírnou kmenově specifickou odpověď (kognáty *Hsc70-4, Hsc70-5*).

3.6. *Exprese genů během zotavování neodhaluje žádnou kompenzaci za chybějící gen Hsp70 u kmene Hsp70$^-$*

Úrovně mRNA transkriptu inducibilního genu *Hsp70Aa, Ab* byly opět vyloučeny z analýzy PCA (**Obr. 9**), jelikož gen *Hsp70* chyběl u kmene Hsp70$^-$ a byl silně up-regulován

během zotavování z chladového vystavení u larev kmene Oregon. Nejvyšší úrovně mRNA *Hsp70Aa, Ab* u kmene Oregon byly pozorovány v čase 1 h během zotavování z CCE: 18,7-krát vyšší ve srovnání se samotnou chladovou aklimací (C), a tedy 275-krát vyšší ve srovnání s pre-aklimací (A). V čase 1 h během zotavování z akutního chladového šoku (ACS) byla up-regulace mRNA *Hsp70Aa, Ab* taktéž zjevná: 3,2-krát vyšší ve srovnání s (C), tzn. 47-krát vyšší ve srovnání s (A) (**Obr. 10**)

Čtyři hlavní komponenty PCA vysvětlují varianci četnosti mRNA transkriptu následujícím rozdělením: PC1, 55,0%; PC2, 13,6%; PC3, 9,6%; PC4, 7,7% (85,9% celkově). Diagram prvních dvou PC komponent (**Obr. 9**) znázorňuje očividné rozdělení vzorků odebíraných v různých časech zotavování podle komponenty PC1, pravděpodobně charakterizující rychlou časovou variaci, která je typická pro expresi inducibilních Hsps. Komponenta PC2 rozlišuje larvy vystavené CCE (kladné hodnoty PC2) od larev vystavených ACS (záporné hodnoty PC2). Dva kmeny *D. melanogaster* nejsou očividně rozděleny na PCA diagramu.

Až na zjevnou výjimku v expresi genu *Hsp70*, vykazovaly ostatní cílové geny podobný vzor exprese u obou kmenů a obou situací (CCE, ACS). V žádném z případů nebyla pozorována viditelná up-regulace jiného genu, který by tímto kompenzoval chybějící gen *Hsp70* u kmene Hsp70^{-}. U obou kmenů byly pozorovány obdobné up-regulační odpovědi během zotavování z chladového vystavení u všech inducibilních *Hsps* (také *Stv*) (**Obr. 10**). PCA poukazuje na malé inducibilní *Hsps* (22, 23, 26, 27) jakožto dobré indikátory odpovědi na ACS, a obdobně velké inducibilní *Hsps* (40, 68, 83) a malé (67Bb, 67Bc) jakožto indikátory odpovědi na CCE (**Obr. 9**).

4. Diskuze

4.1. *Up-regulace mRNA transkriptů Hsp70 v odpovědi na chlad není vždy nutná pro reparaci chladového poškození*

V této práci prokazujeme, že různá vystavení nízkým teplotám vyvolávají patrnou up-regulaci mRNA transkriptu inducibilního *Hsp70* u larev divokého kmene *D. melanogaster*. Toto není nový objev. Již dříve byla stimulace exprese Hsp70 v odpovědi na chlad často zaznamenávána nejen u octomilky (Goto & Kimura, 1998; Goto et al., 1988; Sinclair et al., 2007; Colinet et al., 2010a), ale i u mnoha jiných druhů hmyzu (Yocum, 2001; Hayward et al., 2005; Yocum et al., 2006; Rinehart et al., 2006). Ačkoliv funkční studie na toto téma byly provedeny jen zřídkakdy, časté pozorování masivní up-regulace Hsp70 vedlo ke spekulacím o jeho přímé účasti na reparaci chladového poškození. RNAi byla použita k potlačení up-regulační odpovědi Hsp70 u dvou druhů hmyzu: kukly *Sarcophaga crassipalpis* (Rinehart et al., 2007) a dospělců *Pyrrhocoris apterus* (Košťál & Tollarová-Borovanská, 2009). V obou případech měla RNAi suprese *Hsp70* za následek sníženou chladovou odolnost jedinců. V podobném případě, měla RNAi suprese malých šokových proteinů *Hsp22* a *Hsp23* za následek sníženou schopnost zotavování po vystavení chladu u dospělců *D. melanogaster* (Colinet et al., 2010b). Účinek RNAi byl nejvíce zřetelný u *S. crassipalpis*, kdy bylo přežívání diapauzních kukel sníženo z 80% kontrolní skupiny na 15% pro mladé jedince nebo 50% pro starší jedince po injikaci *Hsp70* dsDNA a následném vystavení chladovému šoku -15°C/24 h. U *P. apterus* byl účinek suprese Hsps relativně malý a projevoval se na části pokusných jedinců neschopností reparace chladového poškození (nekoordinované plazení), tito však zůstávali po vystavení chladu naživu. Nicméně, chladová odolnost hmyzu ošetřeného RNAi nebyla ohrožena úplně, ale spíše jen částečně ve srovnání s kontolními, RNAi neošetřenými jedinci, což dobře koresponduje s obecně přijímaným názorem, podle kterého je odolnost vůči chladu reprezentována celým komplexem fyziologických uzpůsobení (Lee & Denlinger, 2010; Teets & Denlinger, 2013), jejichž jednou součástí je právě up-regulace Hsps. Relativní důležitost tohoto mechanismu je silně závislá na druhu a populaci (souvislost taxonomická), na ontogenetickém stadiu vývoje, aklimačním a diapauzním stavu (souvislost fyziologická) a přesných environmentálních podmínkách (souvislost ekologická).

Jednou z dobře zdokumentovaných rolí inducibilních Hsps u *D. melanogaster* je umožnění odolávat vysokým teplotám (Ritossa, 1962; Lindquist, 1986; Lindquist & Craig, 1988; Sorensen et al., 2003; Sorensen et al., 2005; Feder & Krebs, 1998). To platí zejména pro larvy, které jsou často vystavovány přímému slunečnímu svitu na hnijícím ovoci, tudíž

zažívají velmi vysoké teploty, což způsobuje částečnou mortalitu (Feder & Krebs, 1998). Tepelný stres typicky narušuje přirozenou konformaci proteinů (Parsell & Lindquist, 1993). Denaturované proteiny vystavují své hydrofobní postraní skupiny, což způsobí jejich agregaci, nedostatek funkčních proteinů a následkem toho přímou toxicitu. V této situaci fungují Hsps jako molekulární šaperony. Rozpoznávají denaturované proteiny a vážou se na ně, chrání hydrofobní skupiny od neplánovaných interakcí a, později, pomáhají ve znovuskládání denaturovaných proteinů nebo je označí pro degradaci v proteosomových systémech (Hartl, 1996). Šokové kognáty (Hscs) také hrají podobou roli při nepřítomnosti buněčného stresu. Asistují během skládání vznikajících peptidových řetězců nebo se spoluúčastní transportu nesložených proteinů přes membrány (Feder & Krebs, 1998). Mimo vysokou teplotu může celá škála dalších stresových faktorů, včetně chladu, narušit normální proces skládání nascentních peptidů a transportu proteinů, způsobit disociaci polymerních proteinů a/nebo částečně způsobit jejich denaturaci (Privalov, 1990; Tsai et al., 2002). To je pravděpodobně důvod, proč je up-regulace inducibilních Hsps tak často pozorována jako přímý důsledek vystavení chladu. Nicméně, mnoho proteinových komplexů je schopno složit se do původního stavu spontánně při ohřátí (Privalov, 1990; Tsai et al., 2002). Tím pádem je pravděpodobné, že vystavení relativně mírné dávce chladu bude způsobovat up-regulaci inducibilních Hsps, to však bude mít jen malý nebo nebude mít žádný pozorovatelný efekt na chladovou odolnost. Jiné druhy poškození spojované s vystavením chladu, jako např. selhání funkčnosti membrán, mohou mít mnohem větší význam a jejich výskyt a rozsah rozhodne mezi přežitím/mortalitou. Je také třeba podotknout, že četnost inducibilního Hsp70 proteinu produkovaného po teplotním šoku je vždy menší, než četnost konstitutivních forem kognátů Hscs (Palter et al., 1986). Kognátní formy tudíž mohou přispívat k odolnosti vůči chladu/opravě přímého chladového poškození, nehledě na přítomnost/absenci inducibilních forem Hsps. Kognátní formy a různé inducibilní Hsps se při nápravě chladového poškození neprojevují, avšak mohou vzájemně kompenzovat funkci chybějících genů/proteinů (Ish-Horowitz et al., 1979). Tento fakt komplikuje rozhodování o specifické roli jednotlivých genů/proteinů nebo skupině genů/proteinů pro odolnost vůči chladu, které jsou geneticky manipulovány (např. pomocí RNAi nebo cílenou mutací). Navíc, up-regulace Hsps byla u larev *D. melanogaster* pozorovaná v souvislosti s dlouhodobou chladovou aklimací, během níž je mnoho životních procesů zpomaleno a dochází k indukci značných fenotypických změn (Vesala et al., 2012). Podobně, jako je tomu v případě up-regulace Hsps při diapauze (Yocum et al., 1998; Rinehart et al., 2000), up-regulace spojená s chladovou aklimací může být dávána do souvislosti

s regulací vývojových procesů, apoptózou či imunitní odpovědí (Jaattela et al., 1998; Wallin et al., 2002) spíše než s opravou chladového poškození.

Pokud uvážíme různé důvody pro inducibilní up-regulaci Hsps, je zřejmé, že chladem vyvolaná up-regulační odpověď nemusí být ani spojována s nápravou přímého chladového poškození ve všech situacích, ve shodě se závěry publikovanými Nielsenem et al. (2005). Pozorovali jsme, například, že larvy obou kmenů, Oregon i Hsp70$^-$, mají dramaticky navýšenou odolnost vůči chladu v odpovědi na LTA (**Obr. 6**; Košťál et al., 2011), zatímco pouze larvy kmene Oregon jsou schopny up-regulovat mRNA produkt *Hsp70*. Naše jiné pozorování také prokázalo, že mortalita způsobená vystavením chronickému mírnému chladu (CCE) byla podobná u obou kmenů (**Obr. 6A**), i když pouze Oregon byl schopen masivní up-regulace mRNA Hsp70 během zotavování z CCE. Pouze v případě silného akutního šoku (ACS) byl pozorován rozdíl mezi larvami kmenů Oregon a Hsp70$^-$.

4.2. Up-regulace transkriptu genu Hsp70 může být potřebná k nápravě chladového poškození způsobeného silným akutním chladovým šokem

Pozorovali jsme, že přežívání je značně narušeno u larev kmene Hsp70$^-$ ve srovnání s larvami kmene Oregon v případě jejich vystavení chladovým šokům (ACS) o teplotě ≤ -8°C (1 h; **Obr. 6B**). Larvy kmene Oregon měly pouze 59,3%, 53,2% a 20,2% relativní pravděpodobnost smrti ve srovnání s larvami kmene Hsp70$^-$, pokud byly vystaveny ACS -8°C, -10°C či -12°C v tomto pořadí. Zajímavé je, že podíl přežívání po mírnějším ACS -2°C a -4°C byl relativně srovnatelný u obou kmenů. Tyto výsledky naznačují, že denaturace proteinů způsobená silným chladovým šokem se může kvantitativně/kvalitativně lišit od té způsobené šokem mírnějším. Z toho vyplývá, že up-regulace Hsp70 u kmene Oregon by mohla být potřebná k podpoření aktivity dalších členů komplexu Hsps které pak spolu napomáhají k reparaci chladového poškození způsobeného silným chladovým šokem.

Pokud má up-regulace Hsp70 pozitivní efekt na přežívání silného chladovéhom šoku, je možné očekávat, že se přežívání navýší po předcházející stimulaci up-regulace Hsp70 za použití vhodného PT. Na základě podobného principu je tepelná tolerance u *D. melanogaster* znatelně vylepšena vhodným předcházejícím subletálním tepelným šokem (Feder & Krebs, 1998; Gong & Golic, 2006; Bettencourt et al., 2009). Navzdory našim očekáváním jsme pozorovali jasně negativní efekt jak chronického, tak akutního PT na přežívání po vystavení ACS (**Tab I B**). Podobně tomu bylo tak v případě chronického vystavení CCE, kdy PT působil na přežívání neutrálně nebo mírně negativně (**Tab. I A**). Komplexita chladového poškození

může opět objasnit tyto pozorované výsledky: zavedení PT vždy znamená navýšení celkové dávky chladu a také kombinování různých typů chladového poškození (v případě chronického PT *vs.* vystavení akutnímu chladovému šoku a naopak). Zde narážíme na trade-off situaci, kdy potenciální pozitivní efekt PT na up-regulaci Hsps (spojenou s částečnou a často neškodnou denaturací proteinů) je na druhé straně převažován negativními efekty způsobenými navíc přidaným chladovým poškozením.

4.3. *Exprese genů komplexu Hsps v reakci na chlad*

V této práci přinášíme detailní analýzu změn v četnosti transkriptů mRNA v reakci na chlad u 24 různých transkriptů u *D. melanogaster* při pokrytí většiny genů komplexu Hsps plus čtyř dalších genů, které byly spojovány s nápravou chladového poškození. Hlavním cílem této analýzy bylo zaznamenat jakoukoliv potenciální kompenzaci za chybějící gen *Hsp70* u larev mutantního kmene Hsp70^{-}. Žádná taková kompenzace, však, nebyla pozorována. Naopak, larvy obou kmenů, divokého typu Oregon a mutantního Hsp70^{-}, vykazovaly podobné vzory exprese genů v odpovědi na LTA a následně na CCE a ACS (**Obr. 8, 9**)**.** Jsme si vědomi omezení, které analýza genové transkripce pro přímé vysvětlení funkční aktivity cílových genů obnáší (Feder & Walser; 2005) a též si uvědomujeme, že indukce syntézy Hsps je částečně regulována také na translační úrovni (Lindquist, 1986). Vliv delece genu Hsp70 na tepelně indukovanou expresi jiných kódujících genů Hsps byl dříve studován u kmene Hsp70^{-} (Bettencourt et al., 2008). Ti ve své studii zjistili, že, ačkoliv nějaká změna v expresi inducibilních a konstutivních genů byla pozorována, tato úroveň není dostatečná, aby vykompenzovala ztrátu schopnosti odolávat silnému tepelnému šoku. Nicméně jsme v našem experimentu očekávali, že u kmene Hsp70^{-} budeme pozorovat chladem vyvolanou up-regulaci inducibilních *Hsps* (jiných, než *Hsp70*), která by mohla být běžným mechanismem stresově regulovaným transkripčním faktorem HSF (Jedlicka et al., 1997; Wu, 1995).

U *Drosophily* je HSF přítomen v inaktivní monomerické formě a/nebo je stabilizován v komplexu s Hsps. V reakci na vysokou teplotu, chlad nebo jiné stresory jsou monomerní HSFs a komplexy HSF-Hsps destabilizovány a rychle se shlukují do trimerických forem (Westwood et al., 1991). Trimery HSF se vážou na šokové elementy (HSEs) v promotorech genů inducibilních *Hsps* a spouštějí jejich transkripci (Wisniewski et al., 1996). Jelikož značná část HSEs chybí v genomu octomilky kmene Hsp70^{-}, kde bylo odstraněno 6 kopií genu *Hsp70,* předpokládali jsme, že trimerické HSFs se budou vázat na zbývající HSEs u ostatních inducibilních *Hsps* s vyšší frekvencí a, následně, způsobí jejich „kompenzační“ up-regulaci.

Pozorovali jsme však jen to, že většina typicky elementy regulovaných inducibilních *Hsps* (Lindquist & Craig, 1988; Jedlicka et al., 1997) vykazuje blízce podobné vzory exprese jak v čase tak v intenzitě u obou kmenů *Drosophily* (**Obr. 10**). V případě inducibilního Hsp68, který je svou sekvencí nejvíce příbuzný Hsp70, byla up-regulace v odpovědi na vystavení chladu dokonce slabší u kmene Hsp70$^-$ ve srovnání s kmenem Oregon (**Obr. 10**). Na druhou stranu, výchozí úrovně transkriptů mRNA mnoha inducibilních genů, včetně *Hsp68*, byly konstitutivně vyšší u tepelně aklimovaných (aklimační režim A) larev kmene Hsp70$^-$ oproti kmenu Oregon (**Obr. 10**). Tato konstitutivní up-regulace několika *Hsps* genů nebyla důsledkem „adaptace" na absenci *Hsp70* u kmene Hsp70$^-$, ale spíše odrážela rozdíly v genetickém pozadí kmenů Oregon a White (Gong & Golic, 2004; viz **Obr. 7**). Navzdory konstitutivní up-regulaci u několika genů *Hsps* u kmene Oregon, larvy kmenů Oregon a White vykazovaly téměř identickou schopnost tepelné odolnosti, včetně téměř identických odpovědí na PT a neletální dávky tepelného šoku [viz srovnání našich výsledků u kmene Oregon, **Obr. 5**, s výsledky kmene White,(Gong & Golic, 2006; Bettencourt et al., 2008)]. Usuzujeme, tedy, že konstitutivní up-regulace mRNA inducibilních Hsps u kmene Hsp70$^-$ má zanedbatelný účinek pro jeho tepelnou i chladovou odolnost.

Hlavní úloha HSF při transkripční up-regulaci inducibilních Hsps je dobře zdokumentována (Jedlicka et al., 1997; Wu, 1995; Pirkkala et al., 2001). U *Drosophily* byly identifikovány čtyři alternativní sestřihy genu *Hsf* (*A, B, C, D*) a byla prokázána regulace poměru těchto isoforem tepelným/chladovým stresem. Relativní poměr transkriptu isoformy *Hsf B* byl přibližně 2,5-krát vyšší v důsledku vystavení vysoké teplotě (37°C/1 h), zatímco transkript isoformy *Hsf D* zvýšil svou četnost přibližně 5-krát v důsledku vystavení chladu (4°C/2 dny) u dospělců octomilky (Fujikake et al., 2005). Toto dřívější pozorování jsme rozšířili a zjistili jsme, že LTA byla doprovázena masivní down-regulací isoforem *Hsf A* (více než 130-krát) a *Hsf B* (10-krát), zatímco isoformy *Hsf C* a *Hsf D* byly silně up-regulovány (přibližně 5-krát a více než 80-krát ve stejném pořadí, **Obr. 10**). Transkripční aktivity různých isoforem HSF byly studovány metodou reporter assay a bylo zjištěno, že isoformy C a D vykazují několikanásobně vyšší transkripční aktivitu než isoformy A a B (Fujikake et al., 2005). Je tedy možné, že alternativní sestřih napomáhá „vylaďovat" citlivost up-regulačí odpovědi Hsps na teplotu prostředí. Pokud se okolní teplota sníží (např. během LTA), isoformy s vyšší transkripční aktivitou (C a D) mohou být přednostně povolávány ve snaze kompenzovat sníženou účinnost biochemických reakcí při nižších teplotách. Když se okolní teplota zvýší, vysoký podíl méně transkripčně aktivních isoforem (A a B) může pomáhat při

ochraně organismu před nežádoucími účinky nadprodukce *Hsp70* (Krebs & Feder, 1997; Krebs & Feder, 1998). Fujikake (2005) navíc naznačuje, že různé isoformy by mohly indukovat různé Hsps. Tato hypotéza však zůstává neotestována. Nicméně teplotou regulovaný alternativní sestřih a dramatická up-regulace specifických isoforem v důsledku vystavení chladu podporuje názor, že komplex Hsps má životně důležitou funkci při nízkých teplotách u *D. melanogaster*.

4.4. Odpověď dalších genů spojovaných s reparací chladového poškození v reakci na vystavení chladu

Produkt genu *Frost* má neznámou funkci, ale byl navržen jako kandidátní gen zprostředkovávající chladovou odolnost na základě četných pozorování jeho up-regulace mRNA v odpovědi na vystavení chladu (Sinclair et al., 2007; Goto, 2001; Colinet & Hoffmann, 2011; Bing et al., 2012). Pozorovali jsme, že úroveň mRNA genu *Fst* se zvýšila 2 až 4-krát u larev obou kmenů *D. melanogaster* v odpovědi na LTA. Na rozdíl od předchozích studií nebyla pozorována žádná up-regulační odpověd v reakci na CCE nebo ACS a úroveň mRNA *Fst* se během zotavování postupně vrátila na úroveň výchozích pre-aklimačních hodnot (**Obr. 10**). Je zajímavé, že útlum exprese *Fst* pomocí RNAi zvýšil čas zotavování z chladového komatu (Colinet et al., 2010c), ale přežívání po 2 h vystavení podnulovým teplotám u *Fst* RNAi linie nebylo ve srovnání s kontrolní skupinou narušeno (Udaka et al., 2013).

Menin byl považován za gen hrající roli v řízení genové exprese (Agarwal et al., 1999). Jiná studie (Papaconstantinou et al., 2005) naznačuje, že Menin je zapojen do regulace exprese inducubilních Hsps. Nadprodukce mRNA *Mnn* měla za následek navýšení exprese mRNA *Hsp70* u embryí *D. melanogaster*, zatímco RNAi inhibice *Mnn* snížila expresi *Hsp70* a znemožnila transkripci *Hsp23* v odpovědi na tepelný šok. Proto jsme se rozhodli sledovat úrovně mRNA *Mnn* a zjistili jsme, že jeho transkript se up-reguluje přibližně 5-krát v reakci na LTA u kmene $Hsp70^{-}$ a pouze 1,8-krát u kmene Oregon. Další up-regulace, přibližně 4-krát, úrovně mRNA *Mnn* byla pozorována v reakci na ACS ale pouze u kmene Oregon (**Obr. 10**). Možná propojenost mezi expresí *Mnn* a úrovní mRNA sedmi malých *Hsps* je naznačena jejich ojedinělou reakcí na LTA, skládající se ze dvou kroků: úroveň mRNA nejdřív poklesla při 15°C a v reakci na poslední krok LTA (6°C/2 d) se úroveň mRNA zvýšila (**Obr. 10**).

Členové rodiny proteinů obsahující tzv. cold shock domému (CSD) jsou známé svou indukcí exprese v odpovědi na vystavení chladu u bakterií a jejich předpokládanou rolí je

vázání mRNA a regulace ribosomální translace při nízkých teplotách (Ermolenko & Makhatadze, 2002; Weber et al., 2002). CSD je také obsažena v neanotovaném genu CG9705 (FBgn0036661) u *D. melanogaster*, jeho funkce nebyla doposud zjištěna. Žádná signifikantní změna v úrovni mRNA CG9705 nebyla pozorována v odpovědi na vystavení chladu u *D. melanogaster* (**Obr. 10**).

Starvin je členem rodiny BAG u *D. melanogaster* (Coulson et al., 2005). BAG (Bcl-2-associated anthanogene) proteiny vážou ATPasovou doménu Hsp70 a mohou tedy regulovat jeho šaperonovou aktivitu (Doong et al., 2002). Colinet & Hoffmann (2010) prokázali, že vystavení chladu (0°C/9 h) má za následek up-regulaci transkriptu mRNA *Stv* přibližně 8-krát, zatímco úroveň proteinu se zvýšila přibližně 2,5-krát. Vzory exprese pozorované na časové ose chladově indukované exprese byly značně podobné u genů *Stv* a *Hsp70*, což naznačuje, že starvin se může chovat jako košaperon, který reguluje aktivitu Hsp70 během zotavování z chladového stresu (Colinet & Hoffmann; 2010). V souladu s předchozími výsledky jsme pozorovali přibližně 3 až 4-násobnou up-regulaci úrovně mRNA *Stv* v odpovědi na LTA a následnou 2 až 3-násobnou up-regulaci u larev obou kmenů vystavených CCE a ACS (**Obr. 10**).

5. Závěry:

Na základě výsledků naší studie tvrdíme, že chladem vyvolaná up-regulace celého komplexu inducibilních genů Hsps u larev *D. melanogaster* může být spojována s alternativním sestřihem mRNA *Hsf*, kdy je produkce sestřihových variant C a D upřednostňována před variantami A a B při nízkých, ale nad-nulových teplotách okolí (během dlouhodobé chladové aklimace). Vystavení chladu, ať již chronické podstaty (0°C po různou časovou periodu) nebo akutní (různé podnulové teploty při pevné časové periodě 1 h), vyúsťuje v následnou up-regulaci inducibilních Hsps, včetně masivní exprese mRNA *Hsp70*, během zotavování z těchto podmínek. Mutant Hsp70^{-} *D. melanogaster* nevykazuje žádnou chladem vyvolanou kompenzační up-regulační odpověď (v reakci na chybějící gen *Hsp70*) na úrovni mRNA. Navzdory tomu, přežívání mutantních larev Hsp70^{-} není narušeno ve srovnání s larvami divokého typu, ať již byly vystaveny chronickému mírnému chladu či mírnému akutnímu chladovému šoku. Chladová odolnost mutanta Hsp70^{-} je narušena pouze, pokud jsou larvy vystaveny silnému akutnímu chladovému šoku při teplotách rovnajících se nebo nižších -8°C. Takový výsledek naznačuje, že mírný chladový šok způsobuje chladové poškození jiné podstaty, než silný chladový šok. Tato podstata poškození se dá vysvětlit kvantitativním a/nebo kvalitativním rozdílem v denaturaci proteinů. Exprese inducibilního Hsp70 může být potřebná k podpoření aktivity ostatních členů rodiny komplexu Hsps, jejichž úlohou je poté vypořádat se s denaturovanými proteiny produkovanými v důsledku silného chladového šoku.

6. Citace

ADAMS, M.D., CELNIKER, S.E., HOLT, R.A., EVANS, C.A., GOCAYNE, J.D., et al. (2000) The genome sequence of Drosophila melanogaster. Science 287: 2185–2195.

AGARWAL, S.K., GURU, S.C., HEPPNER, C., ERDOS, M.R., COLLINS, R.M., PARK, S.Y., SAGGAR, S., CHANDRASEKHARAPPA, S.C., COLLINS, F.S., SPIEGEL, A.M., MARX, S.J., BURNS, A.L. (1999) Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. Cell 96:143–152.

BETTENCOURT, B.R., HOGAN, C.C., NIMALI, M., DROHAN, B.W. (2008) Inducible and constitutive heat shock gene expression responds to modification of Hsp70 copy number in Drosophila melanogaster but does not compensate for loss of thermotolerance in Hsp70 null flies. BMC Biol 6: 5.

BING, X., ZHANG, J., SINCLAIR, B.J. (2012) A comparison of Frost expression among species and life stages of Drosophila. Insect Mol Biol 21: 31-39.

BURTON, V., MITCHELL, H.K., YOUNG, P., PETERSEN, N.S. (1988) Heat shock protection against cold stress of Drosophila melanogaster. Mol Cell Biol 8: 3550-3552.

COLINET, H., HOFFMANN, A.A. (2010) Gene and protein expression of Drosophila Starvin during cold stress and recovery from chill coma. Insect Biochem Mol Biol 40: 425-428.

COLINET, H., HOFFMANN, A.A. (2011) Comparing phenotypic effects and molecular correlates of developmental, gradual and rapid cold acclimation responses in Drosophila melanogaster. Funct Ecol 26: 84-93.

COLINET, H., HOFFMANN, A.A. (2012) Comparing phenotypic effects and molecular correlates of developmental, gradual and rapid cold acclimation responses in Drosophila melanogaster. Funct Ecol 26: 84-93.

COLINET, H., LEE, S.F., HOFFMANN, A.A. (2010a) Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult Drosophila melanogaster. FEBS J 277: 174-185.

COLINET, H., LEE, S.F., HOFFMANN, A.A. (2010b) Knocking down expression of Hsp22 and Hsp23 by RNA interference affects recovery from chill coma in Drosophila melanogaster. J Exp Biol 213: 4146-4150.

COLINET, H., LEE, S.F., HOFFMANN, A.A. (2010c) Functional characterization of the Frost gene in Drosophila melanogaster: Importance for recovery from chill coma. PloS One 5: e10925.

COLINET, H., RENAULT, D., CHAROY-GUEVEL, B., COM, E. (2012) Metabolic and proteomic profiling of diapause in the aphid parasitoid Praon volucre. PLoS ONE 7: e32606.

COULSON, M., ROBERT, S., SAINT, R. (2005) Drosophila starvin encodes a tissue-specific BAG domain protein required for larval food uptake. genetics 171: 1799-1812.

CRILL, W.D., HUEY, R.B., and GILCHRIST, G.W. (1996) Within and between generation effects of temperature on the morphology and physiology of Drosophila melanogaster. Evolution 50: 1205–1218.

CZAJKA, M.C., LEE, R.E. Jr. (1990) A rapid cold-hardening response protecting against cold shock injury in Drosophila melanogaster. J. Exp. Biol. 148: 245–254.

DENLINGER, D.L. (1991) Relationship between cold hardiness and diapause. In: Lee RE Jr, Denlinger DL, eds. Insects at Low Temperature. New York and London: Chapman and Hall, pp. 174-198.

DOONG, H., VRAILAS, A., KOHN, E.C. (2002) What's in the BAG? A functional domain analysis of the BAG-family proteins. Cancer Lett 188: 25-32.3

DROBNIS, E.Z., CROWE, L.M., BERGER, T., ANCHORDOGUY, T.J., OVERSTREET, J.W., et al. (1993) Cold shock damage is due to lipid phase transition in cell membranes: a demonstration using sperm as a model. J Exp Zool 265: 432-437.

DUMAN, J.G. (1977) The role of macromolecular antifreeze in the darkling beetle, Meracantha contracta. Journal of Comparative Physiology B 115: 279–286.

DUMAN, J.G. (2001) Antifreeze and ice nucleator proteins in terrestrial arthropods. Annu Rev Physiol 63: 327-357.

EMERSON, K.J., UYEMURA, A.M., MCDANIEL, K.L., SCHMIDT, P.S., BRADSHAW, W.E., HOLZAPFEL, C.M. (2009) Environmental control of ovarian dormancy in natural populations of Drosophila melanogaster. J Comp Physiol A 195: 825-829.

ERMOLENKO, D.N., MAKHATADZE, G.I. (2002) Bacterial cold-shock proteins. Cell Mol Life Sci 59: 1902-1913.

FEDER, M.E., KREBS, R.A. (1998) Natural and genetic engineering of 823 the heat-shock protein Hsp70 in Drosophila melanogaster: Consequences for thermotolerance. Amer Zool 38: 503-517.

FEDER, M.E., WALSER, J-C (2005) The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses. J Evol Biol 18: 901-910.

FUJIKAKE, N., NAGAI, Y., POPIEL, H.A., KANO, H., YAMAGUCHI, M., TODA, T. (2005) Alternative splicing regulates the transcriptional activity of Drosophila heat shock transcription factor in response to heat/cold stress. FEBS Letters 579: 3842-3848.

GONG, W.J., GOLIC, K.G. (2004) Genomic deletions of the Drosophila melanogaster Hsp70 genes. Genetics 168: 1467-1476.

GONG, W.J., GOLIC, K.G. (2006) Loss of Hsp70 in Drosophila is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration. Genetics 172: 275-286.

GOTO, S.G. (2001) A novel gene that is up-regulated during recovery from cold shock in Drosophila melanogaster. Gene 270: 259-264.

GOTO, S.G., KIMURA, M.T. (1998) Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of Drosophila. J Insect Physiol 44: 1233-1239.

GOTO, S.G., YOSHIDA, K.M., KIMURA, M.T. (1998) Accumulation of Hsp70 mRNA under environmental stresses in diapausing and nondiapausing adults of Drosophila triauraria. J Insect Physiol 44: 1009-1015.

HARTL, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. Nature 381: 571-580.

HAYWARD, S.A.L. (2014) Application of functional "Omics" in environmental stress physiology: Insights, limitations, and future challenges. Curr Opinion Insect Sci 4: 35-41.

HAYWARD, S.A.L., PAVLIDES, S.C., TAMMARIELLO, S.P., RINEHART, J.P., DENLINGER DL (2005) Temporal expression patterns of diapause-associated genes in flesh fly pupae from the onset of diapause through post-diapause quiescence. J Insect Physiol 51: 631-640.

HAYWARD, S.A.L., MURRAY, P.A., GRACEY, A.Y., COSSINS, A.R. (2007) Beyond the lipid hypothesis: Mechanisms underlying phenotypic plasticity in inducible cold tolerance. In:

Csermely P, Vigh L, eds. Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperons, membranes and Networks. Austin: Landes Bioscience, pp. 132-142.

HOFFMANN, A.A. (2010) Physiological climatic limits in Drosophila: Patterns and implications. J Exp Biol 213: 870-880.

HOCHACHKA, P.W. (1986) Defense strategies against hypoxia and hypothermia. Science 231: 234-241.

ISH-HOROWICZ, D., PINCHIN, S.M., GAUSZ, H., GYURKOVICS, H., BENCZE, G. (1979) Deletion mapping of two D. melanogaster loci that cod for the 70,000 dalton heat-induced protein. Cell 17: 565-571.

JAATTELA, M., WISSING, D., KOKHOLM, K., KALLUNKI, T., EGEBLAD, M. (1998) Hsp70 exerts its antiapoptotic function downstream of caspase-3-like proteases. EMBO J 17: 6124-6134.

JEDLICKA, P., MORTIN, M.A., WU, C. (1997) Multiple functions of Drosophila heat shock transcription factor in vivo. EMBO J 16: 2452-2462.

KELLERMANN, V., LOESCHKE, V., HOFFMANN, A.A., KRISTENSEN, T.G., FLOJGAARD, C., DAVID, J.R., SVENNING, J.C., OVERGAARD, J. (2012) Phylogenetic constraints in key functional traits behind species' climate niches: Patterns of desiccation and cold resistance across 95 Drosophila species. Evolution 66: 3377-3389.

KELTY, J.D., LEE, R.E. Jr (2001) Rapid cold-hardening of Drosophila melanogaster (Diptera: Drosophilidae) during ecologically based thermoperiodic cycles. J Exp Biol 204: 1659-1666.

KNIGHT, J.D., BALE, J.S., FRANKS, F., MATHIAS, S.F., BAUST, J.G. (1986) Insect cold hardiness – supercooling points and prefreeze mortality. CryoLett 7: 194-203.

KOŠŤÁL, 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. J Exp Biol 207: 1509-1521.

KOŠŤÁL, V. (2006) Eco-physiological phases of insect diapause. J Insect Physiol 52: 113-127.

KOŠŤÁL, V., TOLLAROVÁ-BOROVANSKÁ, M. (2009) The 70 kDa heat shock protein assists during the reparation of chilling injury in the insect, Pyrrhocoris apterus. PLoS One 4, e4546.

KOŠŤÁL, V. (2010) Cell structural modifications in insects at low temperatures. In Low temperature biology of Insects (Lee, R.E., Denlinger, D.L.). Cambridge University Press. 390 p.

KOŠŤÁL, V., KORBELOVÁ, J., ROZSYPAL, J., ZAHRADNÍČKOVÁ, H., CIMLOVÁ, J., TOMČALA, A., ŠIMEK, P. (2011) Long-term cold acclimation extends survival time at 0°C and modifies the metabolomic profiles of the larvae of the fruit fly Drosophila melanogaster. PLoS ONE 6: e25025.

KOŠŤÁL, 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 Proc. Nat. Acad. Sci. USA 109: 3270-3274.

KREBS, R.A., FEDER, M.E. (1997) Tissue-specific variation in Hsp70 expression and thermal damage in Drosophila melanogaster larvae. J Exp Biol 200: 2007-2015.

KREBS, R.A., FEDER, M.E. (1998) Hsp70 and larval thermotolerance in Drosophila melanogaster: How much is enough and when is more too much? J Insect Physiol 44: 1091-1101.

LACHAISE, D., CARIOU, M.L., DAVID, J.R., LEMEUNIER, F., TSACAS, L., ASHBURNER, M. (1988) Historical biogeography of the Drosophila melanogaster species subgroup. Evol. Biol. 22: 159–225.

LALOUETTE, L., WILLIAMS, C.W., HERVANT, F., SINCLAIR, B., RENAULT, D. (2011) Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. Comp Biochem Physiol A 158: 229-234.

LEE, R.E. (1991) Principles of insect low temperature tolerance. In Insects at Low Temperature, ed. Lee, R.E. and Denlinger, D.L. New York and London: Chapman and Hall, pp. 17–46.

LEE, R.E. (2010) A primer on insect cold-tolerance. In Low temperature biology of Insects (Lee, R.E., Denlinger, D.L.). Cambridge University Press. 390 p.

LEE, R.E. Jr, DENLINGER, D.L. (2010) Rapid cold-hardening: Ecological significance and underpinning mechanisms. In: Denlinger DL, Lee RE Jr, eds. Low Temperature Biology of Insects. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 35-58.

LEE, R.E. Jr, CHEN, C.P., DENLINGER, D.L. (1987) A rapid cold-hardening process in insects. Science 238: 1415-1417.

LINDQUIST, S. (1986) The heat shock response. Annu Rev Biochem 55: 1151-1191.

LINDQUIST, S., CRAIG, E.A. (1988) The heat shock proteins. Annu Rev Genet 22: 631-677.

LINDSLEY, D.L., GRELL, E.H. (1968). Genetic variations of Drosophila melanogaster. Publs Carnegie Instn 627: 469pp.

LOEB, J., NORTHROP, J.H. (1917) On the influence of food and temperature upon the duration of life. J. Biol. Chem. 32: 103–121.

MACMILLAN, H.A., SINCLAIR, B.J. (2011) The role of the gut in insect chilling injury: cold-induced disruption of osmoregulation in the fall field cricket, Gryllus pennsylvanicus. J Exp Biol 214: 726-734.

MACMILLAN, H.A., WILLIAMS, C.M., STAPLES, J.F., SINCLAIR, B.J. (2012) Reestablishment of ion homeostasis during chill-coma recovery in the cricket Gryllus pensyllvanicus. Proc Natl Acad Sci USA 109: 20750-20755.

MORGAN, T.H. (1910) Sex Limited Inheritance in Drosophila. Science 32: 120-122.

MULDREW, K., ACKER, J.P., ELLIOTT, J.A.V., MCGANN, L.E. (2004) The water to ice transition: Implications for living cells. In: Fuller B, Lane N, Benson EE, eds. Life in the Frozen State. Boca Raton: CRC Press, pp. 67-108.

NIELSEN, M.M., OVERGAARD, J., SORENSEN, J.G., HOLMSTRUP, M., JUSTENSEN, J., LOESCHKE, V. (2005) Role of HSF activation for resistance to heat, cold and high-temperature knock-down. J Insect Physiol 51: 1320-1329.

PALTER, K.B., WATANABE, M., STINSON, L., MAHOWALD, A.P., CRAIG, E.A. (1986) Expression and localization of Drosophila melanogaster hsp70 cognate proteins. Mol Cell Biol 6: 1187- 1203.

PAPACONSTANTINOU, M., WU, Y., PRETORIUS, H.N., SINGH, N., GIANFELICE, G., TANGUAY, R.M., CAMPOS, A.R., BEDARD, P.A. (2005) Menin is a regulator of the stress response in Drosophila melanogaster. Mol Cell Biol 25: 9960-9972.

PARSELL, D.A., LINDQUIST, S. (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. Annu Rev Genet 27: 437-496.

PFAFFL, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29: e45.

PIRKKALA, L., NYKANEN, P., SISTONEN, L. (2001) Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. FASEB J 15: 1118-1131.

PRIVALOV, P. (1990) Cold denaturation of proteins. Crit Rev Biochem Mol Biol 25: 281-305.

QIN, W., NEAL, S.J., ROBERTSON, R.M., WESTWOOD, J.T., and WALKER, V.K. (2005) Cold hardening and transcriptional change in Drosophila melanogaster. Insect Mol. Biol. 14(6): 607–613.

RAGLAND, G.J., DENLINGER, D.L., HAHN, D.A. (2010) Mechanisms of suspended animation are revealed by transcript profiling of diapause in the flesh fly. Proc Natl Sci Acad USA 107: 14909-14914.

RAZVI, A., SCHOLTZ, J.M. (2006) Lessons in stability from thermophilic proteins. Protein Sci 15: 1569-1578.

RINEHART, J.P., HAYWARD, S.A.L., ELNITSKY, M.A., SANDRO, L.H., LEE, R.E. JR, DENLINGER, D.L. (2006) Continuous up-regulation of heat shock proteins in larvae, but not adults, of a polar insect. Proc Natl Acad Sci U S A 103: 14223-14227.

RINEHART, J.P., LI, A., YOCUM, G.D., ROBICH, R.M., HAYWARD, S.A.L., et al. (2007) Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. Proc Natl Acad Sci USA 104: 11130-11137.

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 Biochem Mol Biol 30: 515-521.

RITOSSA, F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. Experientia 13: 571-573.

ROJAS, R.R., LEOPOLD R.A. (1996) Chilling injury in the housefly: evidence for the role of oxidative stress between pupariation and emergence. Cryobiol 33: 447-458.

SALT, R.W. (1961) Principles of insect cold-hardiness. Annu Rev Entomol 6: 55-74.

SINCLAIR, B.J., GIBBS, A.G., ROBERTS, S.P. (2007) Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in Drosophila melanogaster. Insect Mol Biol 16: 435-443.

SÖMME, L. (1982) Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. Comp Biochem Physiol A 73: 519-543.,

SORENSEN, J., NIELSEN, M.M., KRUHOFFER, M., JUSTENSEN, J., LOESCHKE, V. (2005) Full genome expression analysis of the heat stress response in Drosophila melanogaster. Cell Stress Chap 10: 312-328.

SORENSEN, J.G., KRISTENSEN, T.N., LOESCHKE, V. (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. Ecol Lett 6: 1025-1037.

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

TEETS, N.M., DENLINGER, D.L. (2013) Physiological mechanisms of seasonal and rapid cold hardening in insects. Physiol Entomol 38, 105-116.

TSAI, C.-J., MAIZEL, J.V., NUSSINOV, R. (2002) The hydrophobic effect: A new insight from cold denaturation and two-state water structure. Crit Rev Biochem Mol Biol 37: 55-69.

UDAKA, H., UEDA, C., and GOTO, S.G. (2010) Survival rate and expression of heat-shock protein 70 and Frost genes after temperature stress in Drosophila melanogaster lines that are selected for recovery time from temperature coma. J. Insect Physiol. 56(12): 1889–1894.

UDAKA, H., PERCIVAL-SMITH, A., SINCLAIR, B.J. (2013) Increased abundance of Frost mRNA during recovery from cold stress is not essential for cold tolerance in adult Drosophila melanogaster. Insect Mol Biol 22: 541-550.

VESALA, L., SALMINEN, T.S., LAIHO, A., HOIKKALA, A., KANKARE, M. (2012) Cold tolerance and cold induced modulation of gene expression in two Drosophila virilis group species with different distributions. Insect Mol Biol 21: 107-118.

WALLIN, R.P., LUNDQUIST, A., MORE, S.H., VON BONIN, A., KIESSLING, R., LJUNGGREN, H.G. (2002) Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. Trends Immunol 23: 130-135.

WEBER, M.H.W., FRICKE, I., DOLL, N., MARAHIEL, M.A. (2002) CSDBase: an interactive database for cold shock domain-containing proteins and the bacterial cold shock response. Nucleic Acids Res 30: 375-378.

WESTWOOD, J.T., CLOS, J., WU, C. (1991) Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat-shock factor. Nature 353: 822-827.

WU, C. (1995) Heat shock transcription factors: structure and regulation. Annu Rev Cell Dev Biol 11: 441-469.

YI, S.X., MOORE, C.W., LEE, R.E. Jr (2007) Rapid cold-hardening protects Drosophila melanogaster from cold-induced apoptosis. Apoptosis 12: 1183-1193.

YIANGOU, M., TSAPOGAS, P., NIKOLAIDIS, N., and SCOURAS, Z.G. (1997) Heat shock gene expression during recovery after transient cold shock in Drosophila auraria (Diptera: Drosophilidae). Cytobios, 92(369): 91–98.

YOCUM, G.D. (2001) Differential expression of two HSP70 transcripts in response to cold shock, thermoperiod, and adult diapause in the Colorado potato beetle. J Insect Physiol 47: 1139-1145.

YOCUM, G.D., JOPLIN, K.H. 821 , DENLINGER, D.L. (1998) Upregulation of a 23 kDa small heat shock protein transcript during pupal diapause in the flesh fly, Sarcophaga crassipalpis. Insect Biochem Mol Biol 28: 677-682.

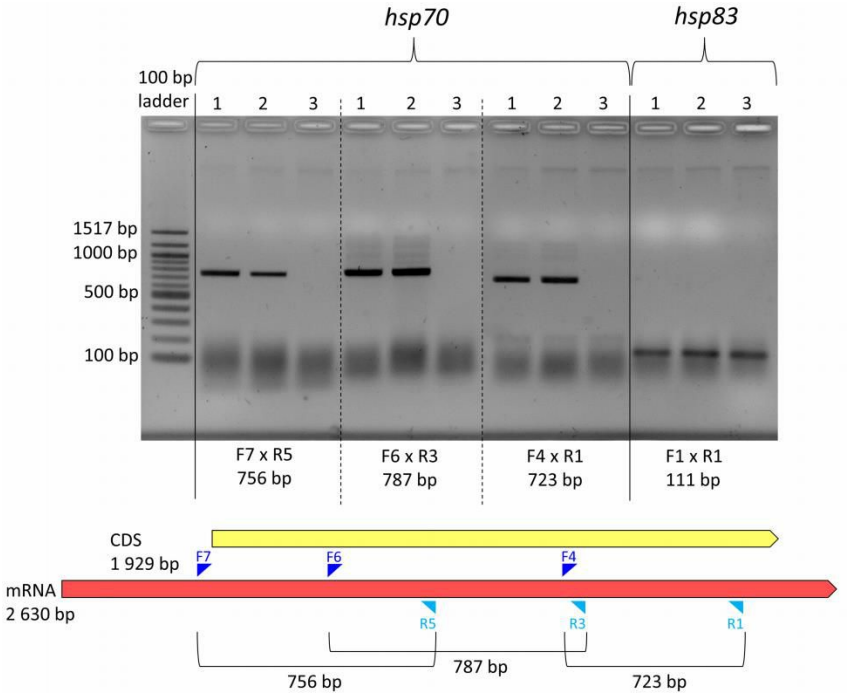
YOCUM, G.D., KEMP, W.P., BOSCH, J., KNOBLETT, J.N. (2006) Thermal history influences diapause development in the solitary bee Megachile rotundata. J Insect Physiol 52: 1113-1120.

ZACHARIASSEN, K.E. (1985) Physiology of cold tolerance in insects. Physiol Rev 65: 799-832.

ZACHARIASSEN, K.E., KRISTIANSEN, E. (2000) Ice nucleation and antinucleation in nature. Cryobiol 41: 257-279.

7. Obrázková a tabulková příloha

Obr. 1: Absence sekvence genu *Hsp70*, vyjmutého z genomu kmene Hsp70$^-$

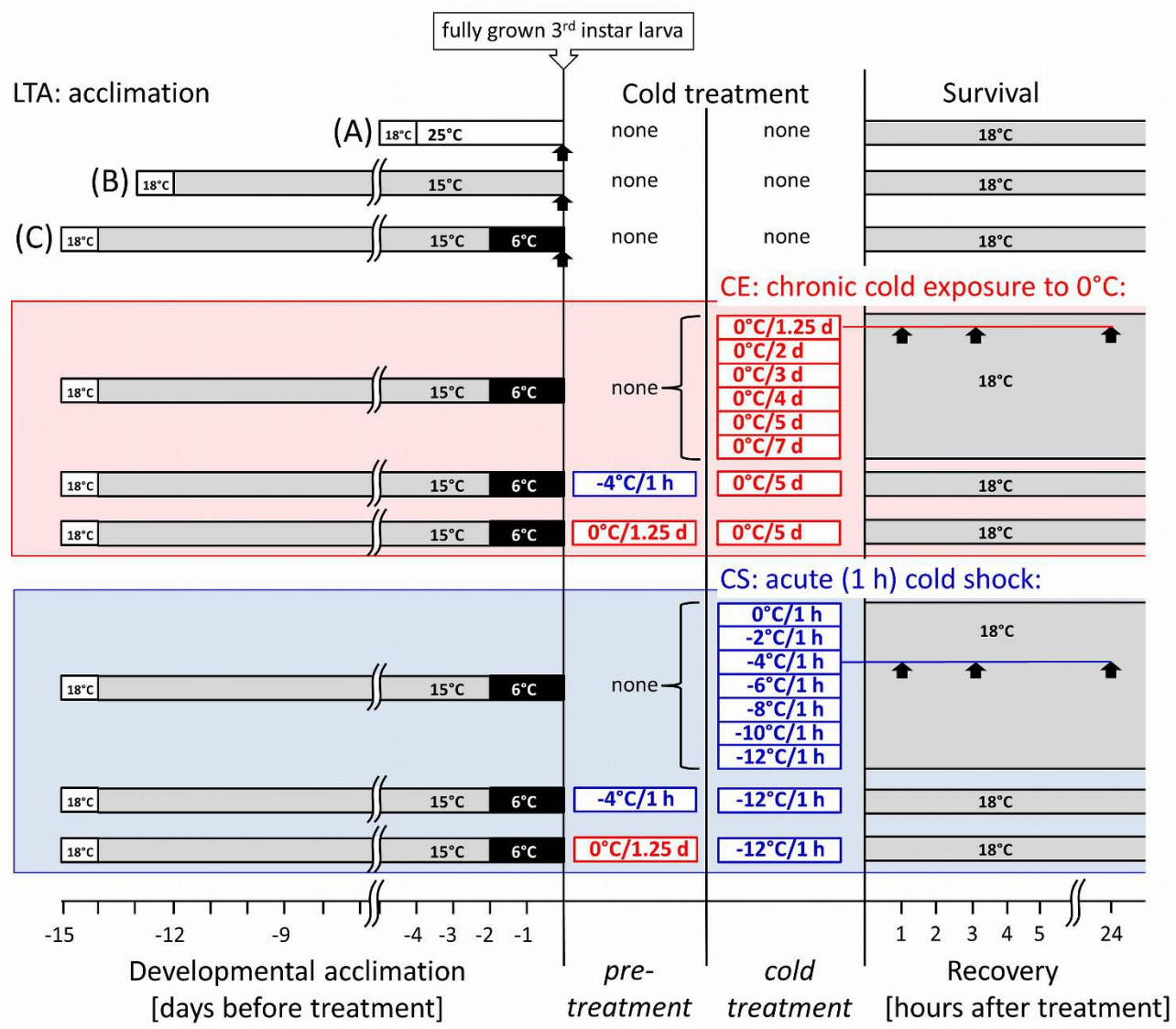


PCR tří různých oligonukleotidových párů primerů specifických pro gen *hsp70* (viz tabulka níže) produkovaly PCR produkty očekávané délky, pokud byla jako templát použita gDNA dospělců kmenů Oregon nebo White (č. 1, 2 na obrázku). Oproti tomu, žádný specifický produkt nebyl pozorován v reakcích, kde byla jako templát použita gDNA kmene Hsp70$^-$ (č. 3 na obrázku). Jako pozitivní kontrolu jsme použili primery pro gen *hsp83*, v tomto případě byly produkty očekávané délky pozorovány pro gDNA všech tří kmenů. Z toho vyvozujeme, že sekvence kódující gen *hsp70* nejsou přítomny v genomu mutantního kmene Hsp70$^-$.

Tab.: Genově specifické oligonukleotidové primery použité pro ověření přítomnosti/absence genu *hsp70* v genomu tří kmenů *D. melanogaster*.

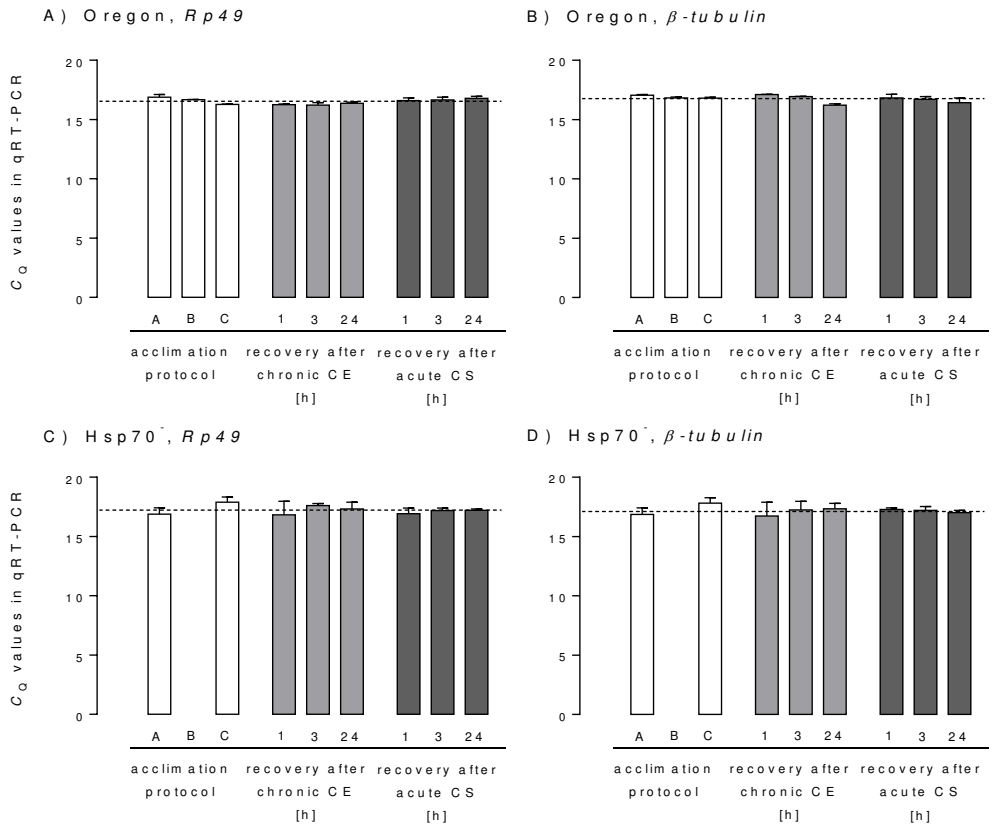
Gen	Název primeru a směr	Sekvence (5‘ → 3‘)	Délka produktu (bp)
Hsp70	F7 Fwd	ccgaggaagaagaactcaca	756
	R5 Rev	cttgaactcgtccgccagatgag	
	F6 Fwd	ggcatatctgggcgagagcatc	787
	R3 Rev	cagcagcacgtcctggatcttgcc	
	F4 Fwd	ctcagcggagaccagagcggcaag	723
	R1 Rev	tcttggtcatgatgggggagcagtg	
Hsp83	F1 Fwd	gcacgccagccgcatctacc	111
	R1 Rev	tcaaccagcgagggggcatct	

Obr. 2: Schématické zobrazení aklimčních protokolů a vystavení chladu použité ve studii.



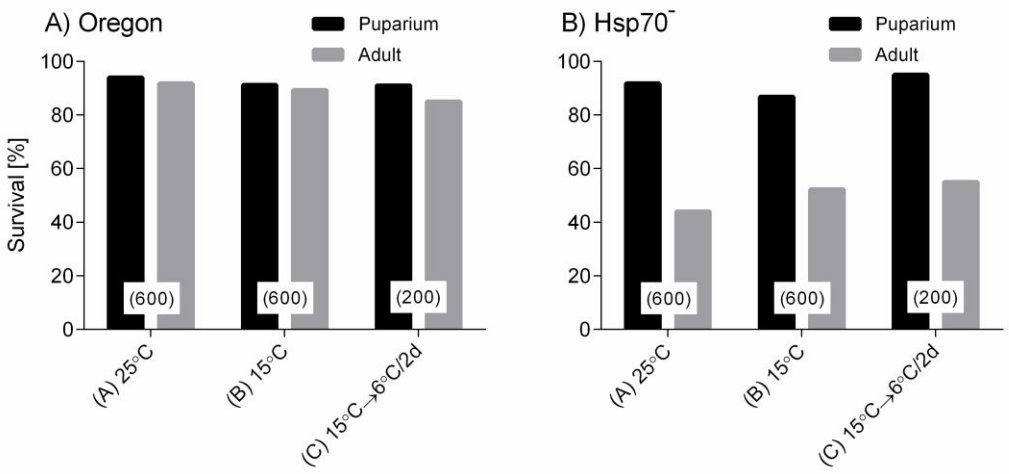
Experimenty jsou vyobrazeny na horizontální ose a jsou zde zobrazeny hlavní teplotní a časové podmínky. Vertikální čáry rozdělují experiment do čtyř hlavních částí: vývojová aklimace (LTA: acclimation), pre-treatment, vystavení chladu (cold treatment) a zotavování (recovery). Larvy byly aklimovány pomocí tří různých dlouhodobých aklimačních (LTA) protokolů (A, B, C) a, teprve když dosáhly stadia plně rostlého 3. instaru, byly vystaveny PT [žádný; chronický (0°C/1,25 d), nebo akutní (-4°C/1 h)], poté následovalo samotné vystavení chronickému či akutnímu chladu, poté zotavování v konst. 18°C. Pupariace a vylíhnutí dospělého životaschopného jedince, jakožto vybraná kritéria pro přežívání, byla kontrolována ve všech pokusech po dobu 14 dní zotavování. Vzorky pro analýzu genové exprese byly v čase odebírány dle bodů naznačených šipkami: na konci každého aklimačního protokolu (tedy před vystavením chladu) a poté po vystavení CCE (0°C, 1,25 dní) či ACS (-4°C/1 h) v časech 1, 3 a 24 h v průběhu zotavování.

Obr. 3: Relativní stabilita úrovně mRNA referenčních genů.



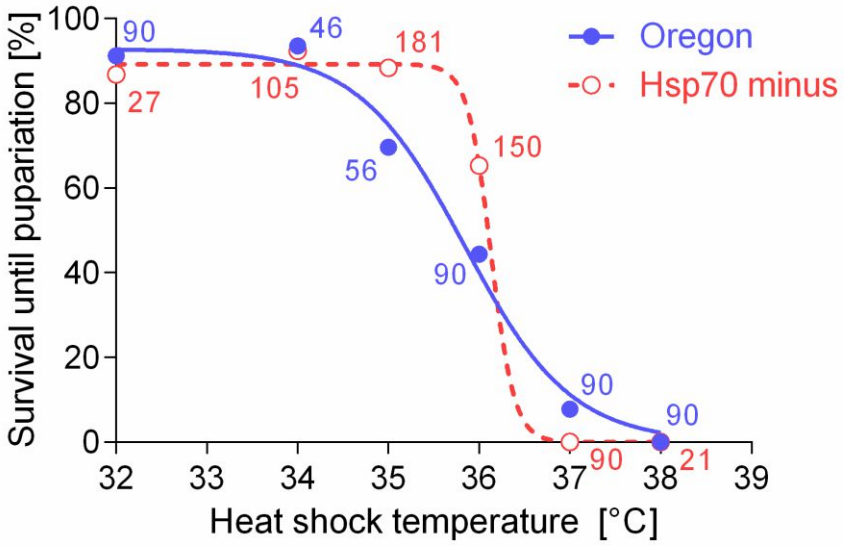
Úrovně transkriptů mRNA referenčních genů (zobrazené jako hodnoty C_Q v qRT-PCT analýze) byly relativně stabilní ve všech experimentálních variantách studie. Malé odchylky hodnot C_Q byly částečně způsobeny náhodným kolísáním způsobeným technickými limitacemi naší qRT-PCR analýzy a částečně systematickou transkripční odpovědí referenčních genů na různá chladová vystavení. Ve statistické analýze jsme se rozhodli ignorovat možnou systematickou odpověď referenčních genů, jelikož žádné vzory v expresi nebyly patrné (nebo nerozeznatelné od náhodného kolísání) a také proto, že celková variace C_Q hodnot byla ± 0,67 cyklu maximálně (což znamená ±1,42-násobný rozdíl v četnosti trenskriptu), zatímco změny v četnosti transkriptu některých vysoce regulovaných cílových genů se pohybovaly ve znatelně vyšších hodnotách, někdy až o dva řády vyšších.

Obr. 4: Vliv aklimace na přežívání dvou kmenů *D. melanogaster*.



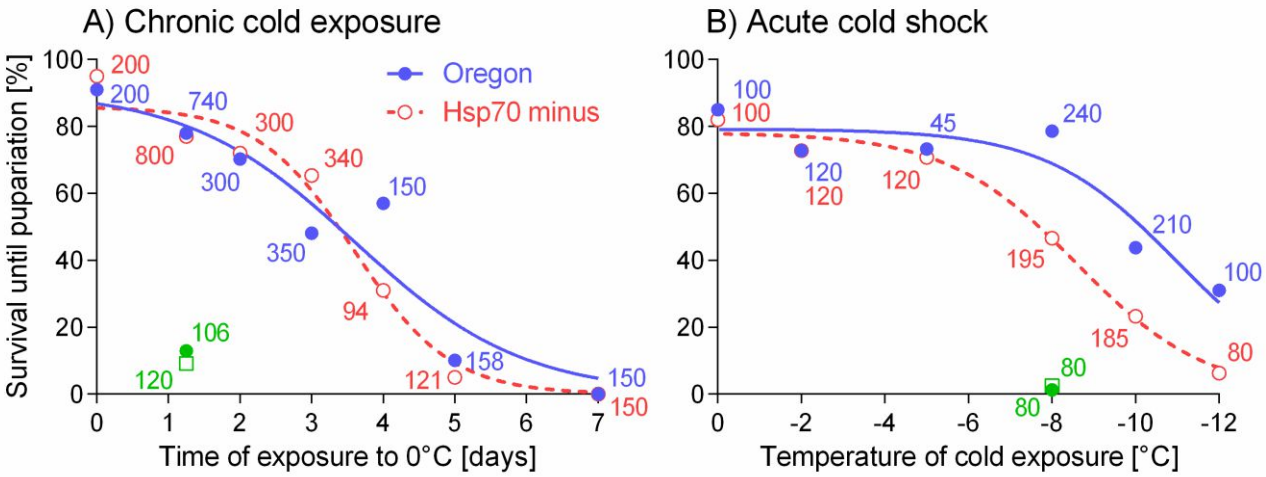
Larvy dvou kmenů, Oregon a Hsp70^{-}, byly vystaveny různým dlouhodobým aklimačním režimům (A, B, C). Černé sloupečky zobrazují poměr jedinců, kteří byli prošli úspěšnou pupariací, šedé sloupečky zobrazují poměr dospělých, životaschopných vylíhnutých jedinců. Počet pokusných larev (*N*) použitých pro každou aklimaci je zobrazen v závorkách.

Obr. 5: Vliv tepelného šoku na přežívání dvou kmenů *D. melanogaster*.



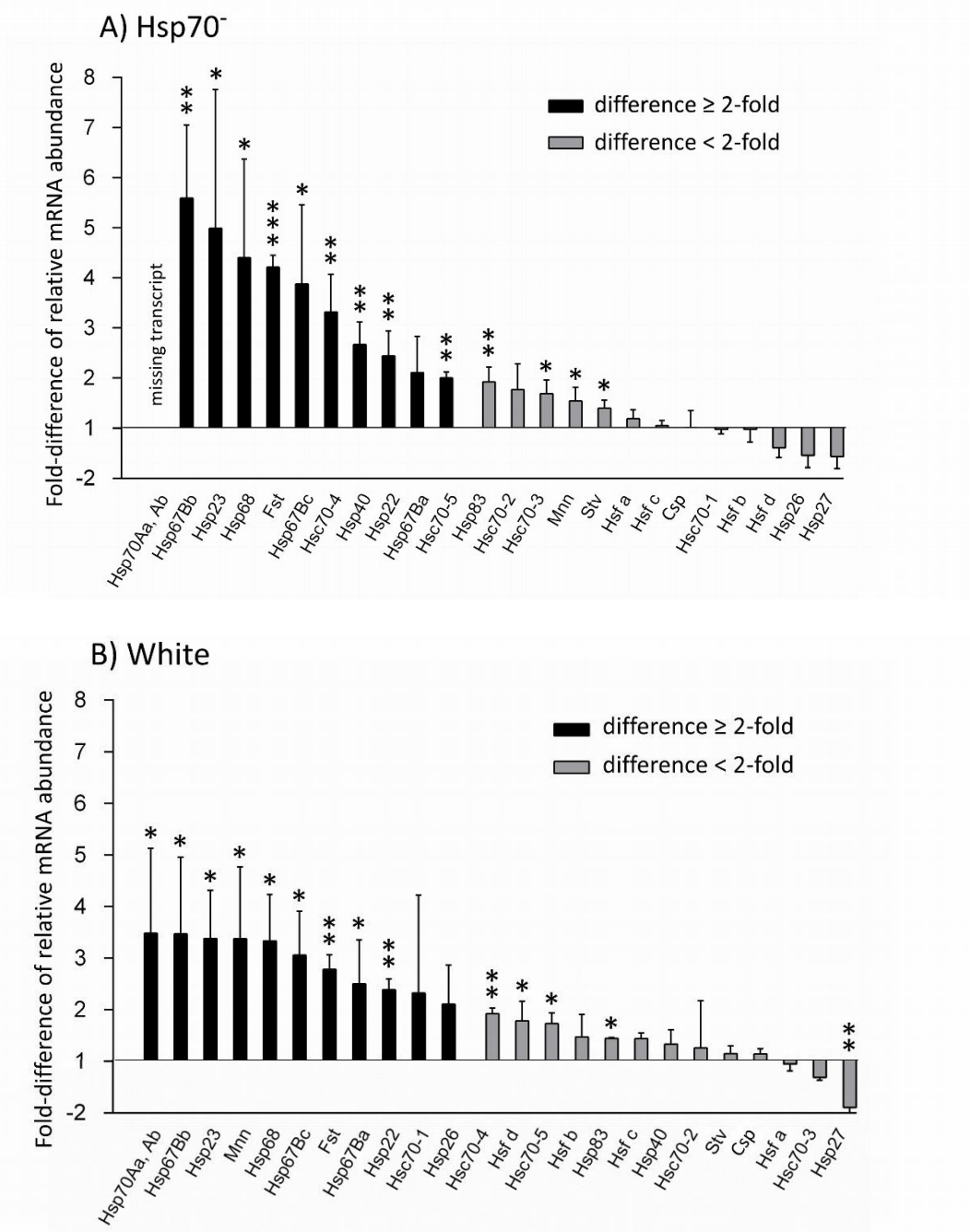
Přežívání dvou kmenů, Oregon (modrá plná kolečka) a Hsp70^{-} (červená prázdná kolečka) aklimovaných při konst. 22°C a poté vystavených 1 h tepelnému šoku různé intenzity v rozmezí 32°C až 38°C. Čísla nad symboly představují počet larev v každém experimentu (*N*). Data byla proložena sigmoidními křivkami (test dobré shody, R^2: 0,9895, Oregon; 0,9983, Hsp70^{-}).

Obr. 6: Vliv CCE a ACS na přežívání dvou kmenů *D. melanogaster*.



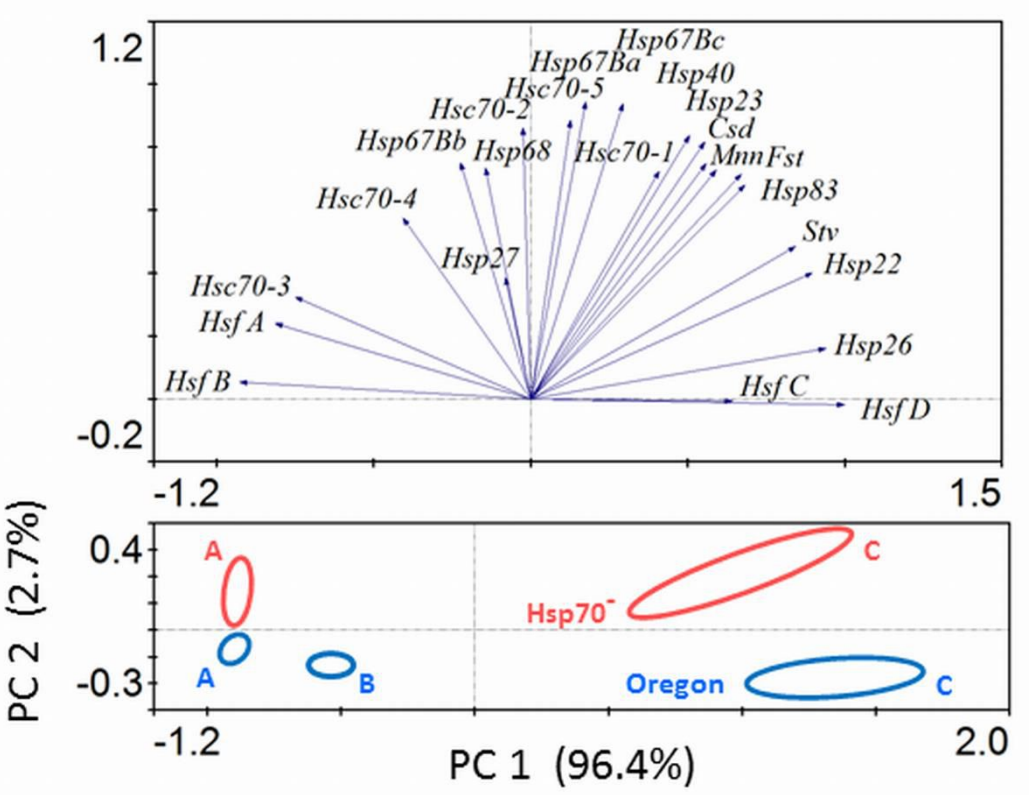
Přežívání larev *D. melanogaster* dvou kmenů, Oregon (modrá plná kolečka) a Hsp70$^-$ (červená prázdná kolečka) aklimovaných v režimu C (15°C následováno 6°C/2 d) a poté vystavených buď CCE (A) při 0°C po různou dobu (0 – 7 dní) nebo ACS (B) po dobu 1h chladovému šoku různé intenzity (0°C až -12°C). Čísla nad symboly představují počet larev v každém experimentu (*N*). Data byla proložena sigmoidními křivkami [test dobré shody, R^2: (A) 0,9124, Oregon; 0,9743, Hsp70$^-$ (B) 0,8881, Oregon; 0,9916, Hsp70$^-$]. Zelené symboly zobrazují analogní data získaná z larev, které byly aklimovány v režimu B (pouze 15°C).

Obr. 7: Konstitutivní úrovně exprese mRNA cílových genů.



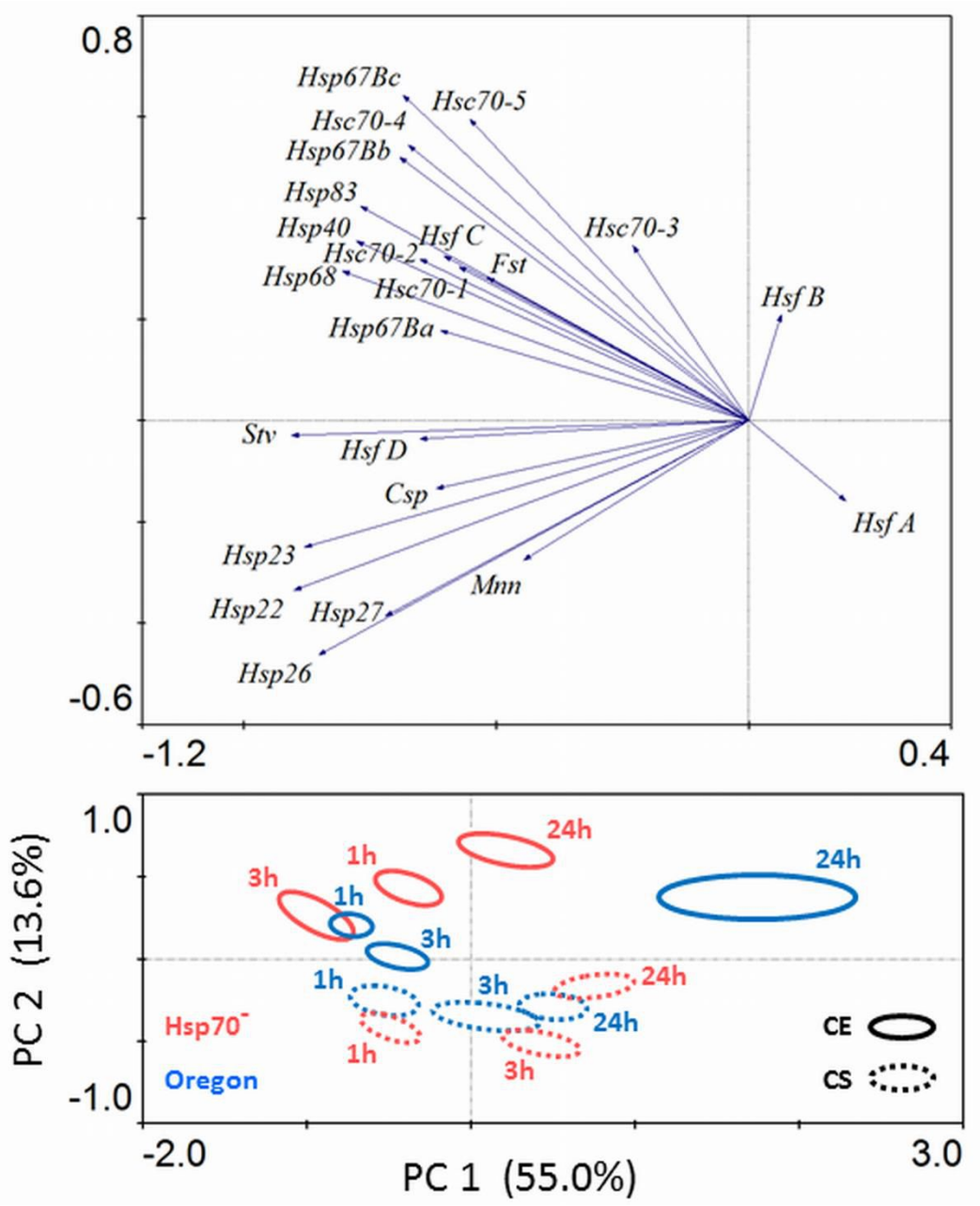
Sloupce zobrazují násobné rozdíly relativní četnosti transkriptů mRNA cílových genů (osa *x*) mezi kmeny Hsp70$^-$ (A) a White (B) relativně ke kmenu Oregon (úrovně byly normalizovány na úroveň hodnoty 1 u kmene Oregon), u larev, které byly aklimovány při konst. 25°C. Statisticky významné rozdíly byly vypočteny za pomoci Studentova nepárového dvouvýběrového t-testu (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Obr. 8: PCA analýza exprese cílových genů v odpovědi na aklimační režimy.



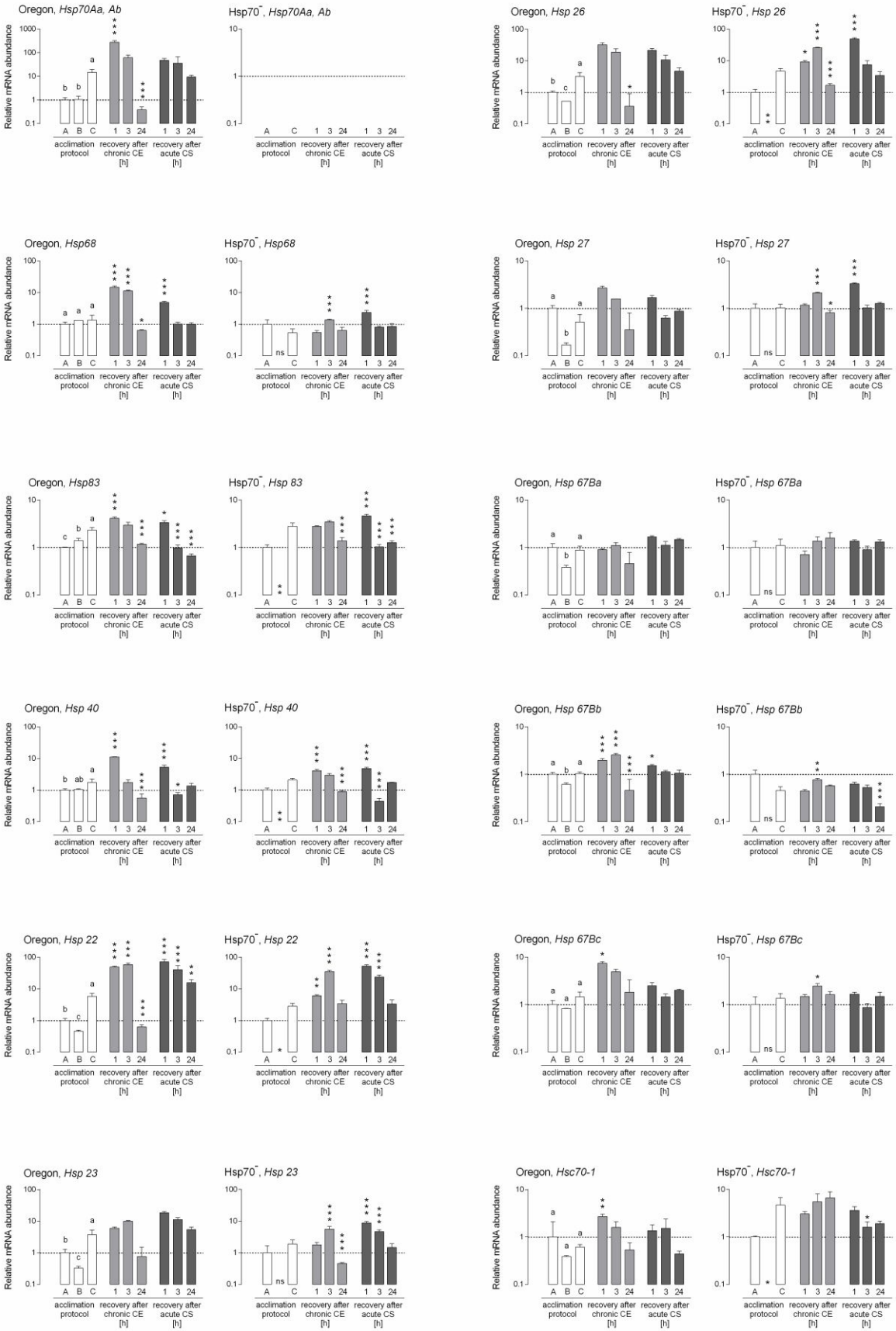
Transkripční odpověď cílových genů v odpovědi na jednotlivé dlouhodobé aklimační režimy (A, B, C) byla zpracována statistickou analýzou hlavních komponent (PCA) u larev *D. melanogaster* dvou kmenů: Oregon (modrá) a Hsp70^{-} (červená). Zlogaritmované (Log2) násobné rozdíly relativní úrovně mRNA (zobrazené na **Obr. 10**) byly použity pro model PCA, zde je zobrazen diagram hlavních komponent PC1 a PC2. Elipsy ve spodní části diagramu označují oblasti shluku tří biologických replikátů v každé aklimační variantě (A, B, C u Oregon; A, C u Hsp70^{-}). Vlastní vektory v horní části diagramu znázorňují jednotlivé úrovně mRNA cílových genů.

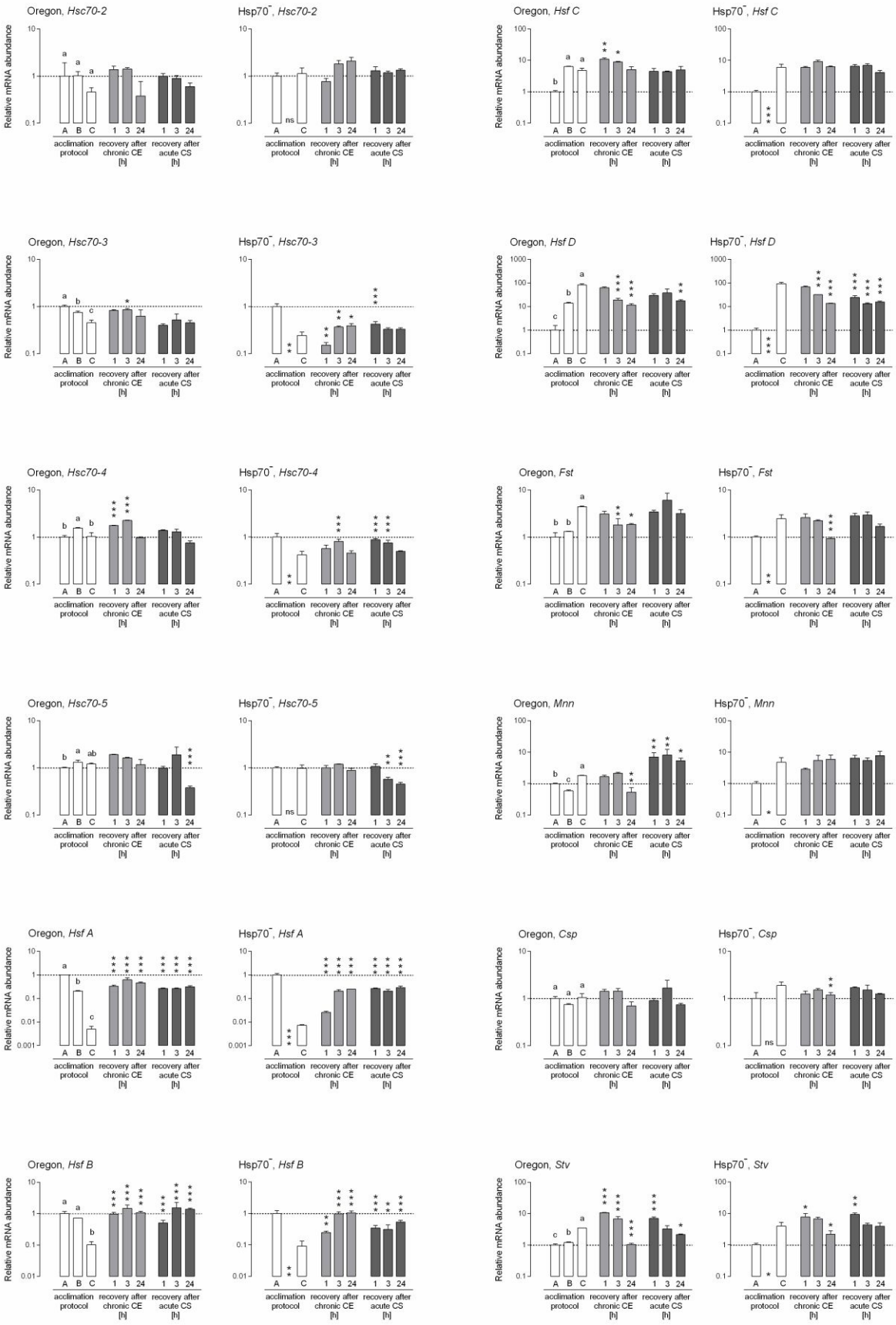
Obr. 9: PCA analýza exprese cílových genů v odpovědi navystavení CCE a ACS.



Transkripční odpověď cílových genů v odpovědi na vystavení CCE (plné čáry) nebo ACS (přerušované čáry) byla zpracována statistickou analýzou hlavních komponent (PCA) u larev *D. melanogaster* dvou kmenů: Oregon (modrá) a Hsp70^{-} (červená). Zlogaritmované (Log2) násobné rozdíly relativní úrovně mRNA (zobrazené na **Obr. 10**) byly použity pro model PCA, zde je zobrazen diagram hlavních komponent PC1 a PC2. Elipsy ve spodní části diagramu označují oblasti shluku tří biologických replikátů. Vzorky byly odebírány ve třech různých časech (1h, 3h, 24h) při zotavování při teplotě 18°C. Vlastní vektory v horní části diagramu znázorňují jednotlivé úrovně mRNA cílových genů.

Obr. 10: Vzory exprese cílových genů v odpovědi na aklimace a vystavení ACS a CCE.




Oregon, Hsc70-2
Hsp70-, Hsc70-2
Oregon, Hsf C
Hsp70-, Hsf C
Oregon, Hsc70-3
Hsp70-, Hsc70-3
Oregon, Hsf D
Hsp70-, Hsf D
Oregon, Hsc70-4
Hsp70-, Hsc70-4
Oregon, Fst
Hsp70-, Fst
Oregon, Hsc70-5
Hsp70-, Hsc70-5
Oregon, Mnn
Hsp70-, Mnn
Oregon, Hsf A
Hsp70-, Hsf A
Oregon, Csp
Hsp70-, Csp
Oregon, Hsf B
Hsp70-, Hsf B
Oregon, Stv
Hsp70-, Stv
Relative mRNA abundance
A B C 1 3 24 1 3 24
acclimation protocol
recovery after chronic CE [h]
recovery after acute CS [h]

Sloupce zobrazují četnosti transkriptů mRNA cílových genů relativně vztažených k četnosti transkriptů dvou referenčních genů (*Rpl32* a *β-tubulin*). Každý sloupec zobrazuje průměr ±SD qRT-PCR analýzy tří biologických replikátů. Hodnoty (násobné rozdíly) četnosti jsou normalizovány k hodnotě 1 = průměrná relativní úroveň transriptu u larev aklimovaných při 25°C (aklimační režim A). Výsledky pro dva kmeny, Oregon a Hsp70^{-}, jsou prezentovány vedle sebe pro každý gen.

Statistická analýza byla provedena pro zlogaritmované (Log2) hodnoty. Byly provedeny tři nezávislé jednocestné ANOVA následované Bonferroniho post-hoc testem: (1) k ověření vlivu aklimace na genovou expresi (sloupce označené různými písmeny sestatisticky významně liší); (2) ke zhodnocení genové exprese během zotavování z CCE; a (3) ke zhodnocení genové exprese během zotavování z ACS. V případech (2) a (3) byly testovány rozdíly mezi výchozí hodnotou (aklimační režim C) a jednotlivými časy při zotavování (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Bílé sloupce znázorňují tři aklimační režimy:

(A) konstantních 25°C;
(B) konstantních 15°C (tento režim nebyl proveden pro larvy kmene Hsp70^{-})
(C) konstantních 15°C následováno 2 dny při 6°C

Šedé sloupce znázorňují tři časy (1, 3 a 24 h) ve kterých byly larvy vzorkovány během zotavování (18°C) po CCE 0°C/1,25 d.

Černé sloupce znázorňují tři časy (1, 3 a 24 h) ve kterých byly larvy vzorkovány během zotavování (18°C) po ACS -4°C/1 h.

Tab. I: Seznam cílových genů, genově specifických oligonukleotidových primerů použitých pro qRT-PCR a výsledků blastn sekvenovaných produktů.

(A) Inducibilní Hsps

Gen			Směr primeru	Sekvence (5' → 3')	Délka produktu (bp)	PCR produkt blastn 1st hit *			PCR produkt blastn 2nd hit *		
Název	FlyBase ID	Zkratka				Zkr.	Skore	E value	Zkr.	Skore	E value
Heat shock proteins 70Aa, Ab	FBgn0013275 FBgn0013276	*Hsp70Aa, Ab*	Fwd	ggcatatctgggcgagagcatc	346	Hsp70Aa, Ab, Ba, Bb, Bbb, Bc	420.752 – 446.523	4.496e-117 – 7.854e-125	Hsp68	163.046	1.6985e-39
			Rev	cttgaactcgtccgccagatgag							
Heat shock protein 68	FBgn0001230	*Hsp68*	Fwd	atcgccgcccgcaatcaactgg	169	Hsp68	222.517	9.8358e-58	Hsp70Bc	65.9106	1.3674e-10
			Rev	actcgtactcctccttctcggcggtgg							
Heat shock protein 83	FBgn0001233	*Hsp83*	Fwd	gcacgccagccgcatctacc	111	Hsp83	107.54	2.4893e-23	CG13868	34.1929	0.299065
			Rev	tcaaccagcgaggggcgcatct							
Heat shock gene 67Ba	FBgn0001227	*Hsp67Ba*	Fwd	cagccgccaaagccgtcagaggtag	111	Hsp67Ba	63.9282	2.4195e-10	Ubi-p5E	32.2105	0.854472
			Rev	ggcgagagtgagcgagagcgaagg							
Heat shock gene 67Bb	FBgn0001228	*Hsp67Bb*	Fwd	tgaactggacaaggctctaaatctgg	163	Hsp67Bb-RA/B/C/D Hsp22-RA	184.852	1.9389e-46	Mrp4-RB	30.2282	6.82187
			Rev	caccacattgctgtatcccgtgacttttg							
Heat shock gene 67Bc	FBgn0001229	*Hsp67Bc* #	Fwd	agccgcggtggagcctcaaataag	142	Hsp67Bc	125.381	1.0111e-28	Hsp27	40.14	0.0046238
			Rev	gatcgtcctcgcgctcctcgtgtt							
Heat shock protein 22	FBgn0001223	*Hsp22* #	Fwd	ctctcctcgccctttcacgccttcttc	145	Hsp22-RA/B Hsp67Bb-RB	143.222	4.5841e-34	IntS10	34.1929	0.303666
			Rev	gggtgagtttgtagccatccctgttga							
Heat shock protein 23	FBgn0001224	*Hsp23*	Fwd	tgcgccagctggagaaaca	238	Hsp23	341.458	2.3782e-93	Hsp27	77.8047	5.5429e-14
			Rev	tcataaccgggtggcagagc							
Heat shock protein 26	FBgn0001225	*Hsp26*	Fwd	ccaggagcccgcagcccccatctac	172	Hsp26	214.587	2.5804e-55	salm	32.2105	2.05357
			Rev	catctcgcgccgcaaagccaaaacc							
Heat shock protein 27	FBgn0001226	*Hsp27*	Fwd	atttgctggaggatgacttcggttttg	132	Hsp27	117.452	2.1469e-26	CG1358	32.2105	0.981733
			Rev	ggtggccatggctcctctcgta							
DnaJ-like-1/ Hsp40	FBgn0263106	*Hsp40*	Fwd	gcagggcagcaggatacaggtgaa	199	DnaJ-1	295.864	1.0916e-79	chm	34.1929	0.64389
			Rev	ctagttgggcgagcagctcggacag							

(B) Hscs

Gen			Směr primeru	Sekvence (5‘ → 3‘)	Délka produktu (bp)	PCR produkt blastn 1st hit *			PCR produkt blastn 2nd hit *		
Název	FlyBase ID	Zkratka				Zkr.	Skore	E value	Zkr.	Skore	E value
Heat shock cognate 1	FBgn0001216	*Hsc70-1*	Fwd	gagataacaacagcctggctaag	749	Hsc70-1	995.635	0	Hsc70-4	77.8047	1.6861e-13
			Rev	ctcaatgttggacccgag							
Heat shock cognate 2	FBgn0001217	*Hsc70-2*	Fwd	tccgaaaccgaacgctccaagg	113	Hsc70-2	91.6812	9.7865e-19	Hsp70Aa, Ab, Ba, Bb, Bbb, Bc	34.1929	0.197843
			Rev	tggcactctttcaggtgactc							
Heat shock cognate 3	FBgn0001218	*Hsc70-3*	Fwd	accagaaccgcctgacgccc	254	Hsc70-3	339.475	1.0847e-92	CG14515	42.1223	0.00352804
			Rev	gggatcggcatcgggattctgt							
Heat shock cognate 4	FBgn0266599	*Hsc70-4*	Fwd	tgccctgagcgttcgaccaa	419	Hsc70-4	186.834	6.1982e-47	Dscam4	38.1576	0.0353483
			Rev	gcatacctccgggaccgcc							
Heat shock cognate 5	FBgn0001220	*Hsc70-5*	Fwd	ataagcttctcggctcctttaca	285	Hsc70-5	438.593	1.864e-122	Hsc70-4	42.1223	0.0041695
			Rev	tatcgtggactatgctctcgccc							

(C) Sestřihové varianty Hsf

Gen			Směr primeru	Sekvence (5‘ → 3‘)	Délka produktu (bp)	PCR produkt blastn 1st hit *			PCR produkt blastn 2nd hit *		
Název	FlyBase ID	Zkratka				Zkr.	Skore	E value	Zkr.	Skore	E value
Heat shock factor	FBgn0001222	*Hsf A*	Fwd	ctcctcaggatggcctcagttgacg	153	Hsf-RA/B	139.258	9.973e-33	Hsf-RC/D	99.6106	8.5859e-21
			Rev	gtccattagatcagagtcgttaaacagaccca							
		Hsf B	Fwd	ccataatcaagcggctaattcttactgttgcag	166	Hsf-RA/B	190.799	3.0104e-48	Hsf-RC/D	135.293	1.5401e-31
			Rev	gtccattagatcagagtcgttaaacagaccca							
		Hsf C	Fwd	gtccattagatcagagtcgttaaacagaccca	148	Hsf-RC/D	155.117	1.2226e-37	Hsf-RA/B	111.505	1.6434e-24
			Rev	aattgggcgtcctgctaagcgcacc							
		Hsf D	Fwd	ccataatcaagcggctaattcttactgttgcag	161	Hsf-RC/D	170.975	2.4249e-42	Hsf-RA/B	127.364	3.2595e-29
			Rev	aattgggcgtcctgctaagcgcacc							

(D) Ostatní geny

Gen			Směr primeru	Sekvence (5' → 3')	Délka produktu (bp)	PCR produkt blastn 1st hit *			PCR produkt blastn 2nd hit *		
Název	FlyBase ID	Zkratka				Zkr.	Skore	E value	Zkr.	Skore	E value
Frost	FBgn0037724	*Fst*	Fwd	cgactctgaggatggtagcggttctga	223	Fst	119.434	1.2069e-26	NFAT	36.1753	0.139674
			Rev	ggattcttcgggagcctcggtcgtc							
Menin 1	FBgn0031885	*Mnn*	Fwd	gcttcggcgttgctctggctgtggtg	171	Mnn1	184.852	1.8980e-46	CG3106	34.1929	0.427727
			Rev	tatcctgcccccgcttatcctcgcttcctt							
Starvin	FBgn0086708	*Stv*	Fwd	cggtcgctcgaggttgattgtgc	135	Stv	143.222	4.5841e-34	CG34398	34.1929	0.303666
			Rev	tctggcggaggggcggagtgg							
CG9705	FBgn0036661	-	Fwd	gctcctcgcccgctaagtaaag	258	CG9705	119.434	7.0434e-27	CG45072	36.1753	0.0815083
			Rev	ggcaggcctgttgttccattctatt							

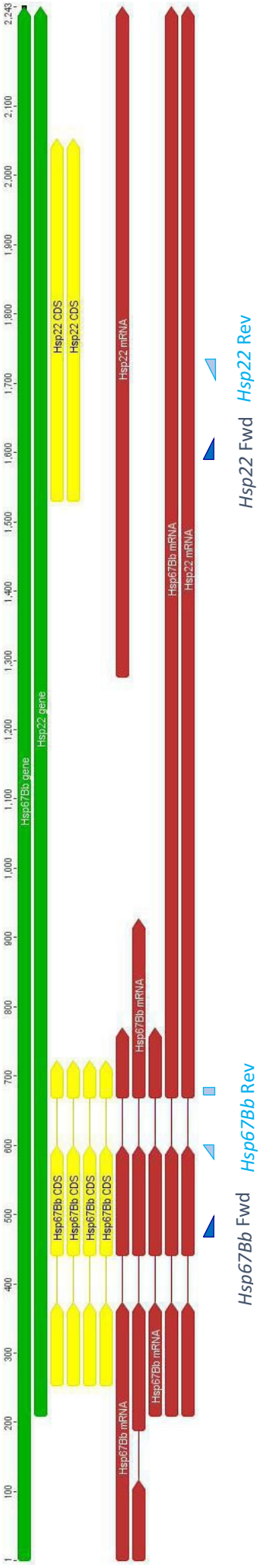
(E) Referenční geny

Gen			Směr primeru	Sekvence (5' → 3')	Délka produktu (bp)
Název	FlyBase ID	Zkratka			
β-Tubulin at 56D	FBgn0003887	*βTub*	Fwd	acatcccgccccgtgtctgaa	257
			Rev	ctgctcctcctcgaactcggcgtc	
Ribosomal protein L32	FBgn0002626	*RpL32*	Fwd	atgctaagctgtcggtga	202
			Rev	gaatccggtgggcagcat	

* Specificita primerů byla testována sekvenováním jejich příslušných PCR produktů. Identita každého PCR produktu byla ověřena analýzou nucleotide blast (blastn; NCBI)

** Sekvence primerů byly navrženy podle: Fujikake N, Nagai Y, Popiel HA, Kano H, Yamaguchi M, Toda T (2005) Alternative splicing regulates the transcriptional activity of Drosophila heat shock transcription factor in response to heat/cold stress. FEBS Letters 579: 3842-3848.

Geny *Hsp67Bb* a *Hsp22* jsou přepisovány ze stejného lokusu gDNA (zelené čáry) a některé jejich alternativní mRNA sestřihy se překrývají (červené čáry). Navrhli jsme primery uvnitř kódujících sekvencí (CDS, žluté čáry) obou příslušných genů, abychom zaručili amplifikaci PCR produktů nejvíce relevantních transkriptů mRNA. Nicméně, páry primerů nebyly dokonale specifické pro příslušné geny a pravděpodobně vytvářely PCR produkty z méně četných transkriptů mRNA druhého genu.



Tabulka II:

A) Vliv chladových PT na přežití larev *D. melanogaster* po vystavení CCE 0°C/5 d.

Kmen	PT [1]	(*N*)	Počet pupariovaných larev	Počet mrtvých larev	P [2]	Relatiní riziko smrti [3] [%]
Oregon	žádný	(158)	16	142		
	akutní	(60)	2	58	0,1657 ns	92,97
	chronický	(110)	4	106	0,0584 ns	93,26
Hsp70$^-$	žádný	(121)	6	115		
	akutní	(60)	0	60	0,1802 ns	95,04
	chronický	(60)	0	60	0,1802 ns	95,04

B) Vliv chladových PT na přežití larev *D. melanogaster* po vystavení ACS -12°C/1 h.

Kmen	PT [1]	(*N*)	Počet pupariovaných larev	Počet mrtvých larev	P [2]	Relatiní riziko smrti [3] [%]
Oregon	žádný	(100)	31	69		
	akutní	(100)	10	90	**0,0004** ***	76,67
	chronický	(65)	7	58	**0,0025** **	77,33
Hsp70$^-$	žádný	(80)	5	75		
	akutní	(100)	2	98	0,2442 ns	95,66
	chronický	(50)	4	46	0,7325 ns	100,02

[1] Akutní PT: -4°C/1 h; chronický PT 1,25 dní/0°C. Oba PT byly následovány zotavením v 18°C/2 h.
[2] Statistická průkaznost rozdílu mezi kontrolou (žádný PT) larvami ošetřenými PT byla testována za použití Fischerova exaktního testu. Statisticky významné rozdíly jsou zobrazeny tučně: *, P<0,05; ns, není signifikantní.
[3] Relativní riziko smrti vyjadřuje relativní šanci smrti u kontrolních larev (neoštetřených PT) ve srovnání s larvami ošetřenými PT.