

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Denní a cirkadiánní rytmicity chování a
fyziologických funkcí u larev mušky**
Chymomyza costata

Bakalářská práce

Petr Hůla

Školitel: prof. Ing. Vladimír Košťál CSc.

České Budějovice 2015

Bakalářská práce

Hůla, P., 2015: Denní a cirkadiánní rytmicita chování a fyziologických funkcí u larev mušky *Chymomyza costata*. [Daily and circadian rhythmicity of behavior and physiological functions in larvae of the fruit fly *Chymomyza costata*. Bc. Thesis, in Czech.] - 59 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim of this study was to help answering the question on whether the larvae of drosophilid fly, *Chymomyza costata* do possess a functional central circadian pacemaker (biological clock) or not. Diurnal and circadian changes in enzymatic activity (glucose-6-P-dehydrogenase) and gene transcription (6 different genes selected based on the pilot RNAseq analysis) were monitored in the photoperiodically sensitive 3rd instar larvae. Results suggest that the larvae are weakly rhythmic under photoperiodic conditions. Endogenous component of putative circadian pacemaker was not observed (enzymatic activity) or remains to be assayed (gene expression).

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

České Budějovice, duben 2015

.....

Petr Hůla

Poděkování:

Rád bych poděkoval především vedoucímu mé bakalářské práce prof. Ing. Vladimíru Košťálovi CSc. za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady při psaní bakalářské práce i experimentální činnosti. Dále bych rád poděkoval Konradu Schöttnerovi i celému týmu prof. Ing. Vladimíra Košťála CSc. za metodickou pomoc při experimentální části práce.

Obsah

Úvod	1
1. Fotoperioda a diapauza	2
2. Struktura a funkce fotoperiodického kalendáře	4
2.1 Receptory světla (neboli fotoreceptory).....	6
2.2 Fotoperiodické hodiny	8
2.3 Fotoperiodické počítadlo (counter).....	10
2.4 Výstupní cesty	11
2.5 Fotoperiodický kalendář- shrnutí.....	12
3. Struktura a funkce cirkadiánních hodin	13
3.1 Molekulární mechanismus hodin.....	14
3.2 Centrální pacemaker a neuronální síť	17
3.3 Periferní pacemakery	17
3.4 Vstupní a výstupní dráhy centrálního cirkadiánního pacemakeru.....	19
3.5 Cirkadiánní hodiny-shrnutí	21
4. Chymomyza costata	22
5. Cíle práce	25
6. Metodika	25
6.1 Měření enzymatické aktivity Glukózo-6-fosfát-dehydrogenázy	26
6.1.1 Enzymatická aktivita G ₆ P-DH	26
6.2 RNA seq analýza (výběr genů).....	27
6.3 Exprese genů	27
6.3.1 Celková izolace RNA pomocí Ribozolu, Amresco	28
6.3.2 Ošetření DNásou-DNase I. treatment, Ambion.....	29
6.3.3 Reverzní transkripce, Promega	30

6.3.4 qRT-PCR, Biorad	31
6.4 Statistické metody.....	31
7. Výsledky.....	32
7.1 Aktivita G ₆ P-DH.....	32
7.2 Exprese genů	32
8. Diskuse.....	36
8.1 Enzymatická aktivita Glukózo-6-fosfát-dehydrogenázy	36
8.2 Exprese genů	36
9. Závěry	39
10. Literatura	40

Úvod

Zástupci třídy hmyzu jsou relativně malé, ektotermní organismy, citlivé na sezónní změny prostředí. Cyklické sezónní změny prostředí je možné zřetelně sledovat téměř ve všech terestrických habitatech. Změny jsou určeny rotací Země kolem Slunce. Sklon zemské osy ($23,5^\circ$) je zodpovědný za cyklické prodlužování nebo zkracování dne/noci, takzvanou fotoperiodu. Mezi délkou fotoperiody a intenzitou sluneční energie (což je životně důležitý faktor pro téměř veškerý život na Zemi) existuje přímý vztah. Jelikož je navíc fotoperiodický signál stabilní v geologickém čase a přitom přesný a spolehlivý, není divu, že fotoperiodická citlivost sehrála klíčovou roli v evoluci sezónnosti. Ačkoliv si lidé byli pravděpodobně dávno vědomi existence fotoperiodismu u rostlin a živočichů, byla její role v řízení sezónnosti rozpoznána teprve před méně než sto lety. První průkopnické fotoperiodické experimenty byly prováděny při pěstování rostlin (Garner a Allard, 1920), následované objevem vlivu fotoperiody na morfologické změny u obojživelníků (Marcowitch, 1923, 1924) a objevem diapauzy u bource morušového a sarančat (Kogure, 1933; Sabrosky et al., 1933). Fotoperiodická regulace životních cyklů je dnes chápána pomalu jako univerzální řešení u různých organismů včetně hmyzu (Wilde, 1962; Tauber et al., 1986; Danks, 1987, 1994; Nelson et al., 2010).

Hmyz se vyrovnává s nepříznivými podmínkami prostředí pozoruhodnou fenotypovou plasticitou. To může zahrnovat změny chování, sezónní morfologické změny, migraci a dormanci (Andrewartha, 1952; Danilevsky, 1965; Wolda, 1988; Danks, 1994; Nijhout, 2003). Změny v chování, zabarvení, velikosti křídel, struktuře kutikuly, atd., mohou sloužit k doladění aktivního životního stylu při zhoršení environmentálních podmínek. Nejdřsnější podmínky nedovolí hmyzu pokračovat v aktivitě, např. během chladné zimy, suchých období léta v mediteránu a subtropích nebo období záplav v tropech. Nehostinným podmínkám se dá vyhnout jak v prostoru tj. migrací, tak v čase tj. dormanci- vstupem do klidového stavu (Southwood, 1962). Migrace u hmyzu na dlouhé vzdálenosti je obecně značně omezená

(nicméně existují výjimky; Dingle, 1972). Nejčastější strategií pro přežití hmyzu přes nepříznivá období je tedy vstup do dormance.

1. Fotoperioda a diapauza

Existují dvě kategorie dormance-kviescence a diapauza (Lees, 1955; Danks, 1987; Košťál, 2006). Kviescence je přímou odpovědí organismu, v jakémkoliv bodě jeho ontogeneze, na nějaký limitující faktor prostředí (přílišný chlad nebo teplo, nedostatek vody, kyslíku, potravy...). Kviescence končí zároveň s ukončením působení limitujícího faktoru. Oproti tomu diapauza je centrálně (hormonálně) zprostředkovaným zastavením vývoje ve zcela určité ontogenetické fázi, které je navozeno specifickým signálem z prostředí (Lees, 1955). Tento signál tedy funguje jako „červená na semaforu“. Nejčastějším specifickým signálem pro vstup do diapauzy je fotoperioda. Fotoperioda poskytuje informaci o nadcházejícím zhoršení přírodních podmínek.

Diapauza se dá dále rozdělit na fakultativní a obligátní. Fakultativní diapauza je závislá na přírodních faktorech a rozhodnutí mezi zastavením vývoje nebo jeho pokračováním je volitelné. Oproti tomu je obligátní diapauza pevně zafixovaná ve vývojovém programu organismu nezávisle na podmínkách okolí. Obligátní diapauza je pravděpodobně méně běžná než fakultativní.

Diapauzu je možné rovněž dělit na dva ekologické typy: hibernaci (přezimování) a estivaci (letní diapauza) (Masaki, 1980). Oba typy diapauzy se projevují podobným sledem zjevných symptomů od ukládání energetických zásob, následovaný migrací nebo alespoň přesunem na vhodné stanoviště, změnou fyziologických a metabolických funkcí a získání relativně vysoké odolnosti vůči nepříznivým podmínkám prostředí. Oba ekologické typy diapauzy jsou nejčastěji navozovány neboli indukovány fotoperiodickým signálem. Jediný rozdíl spočívá v tom, že hibernace je odezvou na krátký den (hibernující druhy jsou aktivní během dlouhých dnů), kdežto estivace je odezvou na dlouhý den (estivační druhy jsou aktivní během krátkých dnů). Mluvíme-li o odezvě na délku dne, je důležité podotknout, že většina druhů hmyzu a dalších organismů (Nelson et al., 2010) ve skutečnosti měří délku

nocí (Saunders, 2002). Fotoperiodický signál není přítomen na rovníku a je značně omezen v rámci tropické zóny. V tropech se tedy musí hmyz řídit jinými signály z prostředí jako je sucho, záplavy, sezónní cykly teploty nebo kvality potravy (Wolda, 1988; Denlinger, 1986).

Čili fotoperiodismus (citlivost na fotoperiodický signál) umožňuje hmyzu zjišťovat kalendářní neboli sezónní čas a přizpůsobit tomu svůj vývojový cyklus a životní styl. Proto jej nazýváme **fotoperiodickým kalendářem** (Nelson et al., 2010). Existuje ovšem ještě jeden biologický časoměrný systém známý jako **biologické cirkadiánní hodiny**. Tento systém měří denní čas. Cirkadiánní hodiny jsou endogenním systémem umožňujícím organismům sledovat a reagovat na denní změny světla/tmy a další přírodní faktory. V posledních dekádách naše znalosti o cirkadiálních hodinách a jejich funkci značně pokročily a to hlavně díky metodám molekulární biologie (Dunlap, 1996; Hall, 2003; Rosato et al., 2006a,b; Wijnen a Young, 2006; Helfrich-Förster, 2009). Na druhou stranu fyziologické mechanismy fotoperiodického kalendáře zůstávají velmi málo prozkoumané (Tauber a Kyriacou, 2001; Saunders, 2002; Saunders et al., 2004; Danks, 2005; Bradshaw a Holzapfel, 2007; Kyriacou et al., 2007; Goto et al., 2010).

V roce 1936 přišel Erwin Bünning s názorem, že fotoperiodismus je založen na cirkadiální funkci. Během času se jeho intuitivní nápad stal základem pro experimentální práci i dlouhotrvající spor, který mezi vědci zabývající se danou problematikou pokračuje až dodnes (Saunders, 2010 a,b; Bradshaw a Holzapfel, 2010). Tento spor je možné rozdělit na dvě etapy. Raná fáze byla zaměřená na dva soupeřící formální modely hmyzího fotoperiodického kalendáře: model cirkadiálního oscilátoru (Bünning, 1936, 1960; Pittendrigh a Minis, 1964) a model přesýpacích hodin (Lees, 1973; Veerman, 2001). Ačkoliv se dodnes debatuje, který ze dvou názorů na věc je správnější, tato fáze sporu byla aktuální hlavně před objevem prvního genetického prvku centrálních cirkadiálních hodin-takzvaného genu *period* u octomilky *Drosophila melanogaster* (Konopka a Benzer, 1971; Bargiello et al., 1984;). Raná fáze vyvrcholila propojením obou názorů do jediného modelutlumeného cirkadiálního oscilátoru (Bünning, 1969; Lewis a Saunders, 1987). Ačkoliv tento nový model urovnal spor mezi oběma teoriemi, otevřel také

novou diskuzi o fyziologické povaze cirkadiánního oscilátoru zavedeného do fotoperiodismu. Za začátek druhé fáze výzkumu můžeme uvažovat vydání první práce o vlivu genu *period* na indukci diapauzy u *D. Melanogaster* (Saunders et al., 1989)

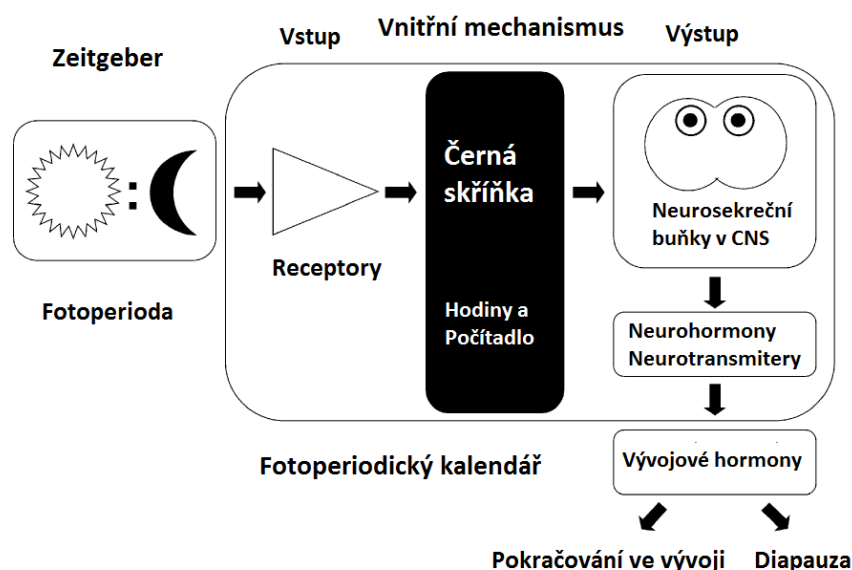
Hlavní otázka však zůstává od začátku stejná: účastní se známé hodinové geny, jako gen *period* nebo *timeless*, měření fotoperiodického času? A jestli ano, tak jakým způsobem?

2. Struktura a funkce fotoperiodického kalendáře

Fotoperioda je poměr mezi délkou noci a dne v rámci jednoho solárního dne. Jinak řečeno, fotoperioda je poměr mezi fotofází (světlá fáze dne) a skotofází (temná fáze dne) v rámci jednoho cyklu. V laboratorních podmínkách se tento poměr označuje jako L:D (z anglického Light:Dark- světlo:tma). Tento poměr lze při experimentu nastavit zcela nezávisle na délce celé fotoperiody. Může se dokonce lišit od 24 hodinového cyklu. Při laboratorních experimentech prováděných na hmyzu bylo zjištěno, že použití různých délek 24 hodinové fotoperiody (Saunders, 2002, pp. 300-304) má vliv na tvar fotoperiodické křivky. Existuje zde interval, ve kterém se četnost jedinců vstupující do diapauzy relativně rychle mění. Tento interval se nazývá *kritická fotoperioda* (anglicky CPP). Jde spíše o tzv. kritickou délku noci, při které polovina populace vstoupí do diapauzy, zatímco druhá polovina pokračuje dál ve vývoji. Zdá se, že většina doposud studovaného hmyzu vstupuje do diapauzy po kvalitativním rozpoznání super-kritické nebo sub- délky noci, bez přesného kvantitativního měření absolutní délky noci (diskuze viz Saunders, 2002, pp. 304-306). Fotoperiodická odpověď může být pozměněna (posunuta) též dalšími přírodními faktory, jako je např. teplota, množství a kvalita potravy nebo různé biotické interakce (diskuze Saunders, 2002; Tauber et al., 1986; Danks, 1987).

Fotoperiodický systém se skládá ze čtyř funkčních jednotek (obrázek 1):

- (A) receptory světla
- (B) fotoperiodické hodiny schopné rozlišit krátkou a dlouhou noc
- (C) počítadlo krátkých nebo dlouhých nocí
- (D) výstupní dráhy propojující celý systém s efektory (Williams a Adkinson, 1964; Saunders, 1981, 2002).



Obr. 1: Schematická struktura fotoperiodického kalendáře. Zatím velmi málo prozkoumané receptory přijímají signály z vnějšku (například fotoperiodický signál). Signál je pak převeden a zpracován vnitřním mechanismem skládajícím se z hodin a počítadla. Fyziologické mechanismy této jednotky zůstávají u hmyzu zatím neobjasněné, proto se tato jednotka někdy označuje jako černá skříňka. Výstupní dráhy pak obsahují neurosekreční buňky, které produkují neurohormony, neurotransmitery a mitogeny, ovlivňující biosyntézu a vylití vývojových hormonů. Přítomnost nebo absence vývojových hormonů určuje osud jedince (buď pokračování ve vývoji, nebo vstup do diapauzy). Detailní vysvětlení dále v textu (překresleno podle Košťál. 2011).

Ačkoliv u hmyzu dosud nebyla přesně popsána a lokalizovaná poloha fotoperiodického systému (ani žádné jeho části) jednoznačnými biochemickými a neurologickými termíny, obecně se věří, že je tento systém lokalizován v mozku (Lees, 1964; Bowen et al., 1984a,b; Hasegawa a Shimizu, 1987). Je tedy zřejmé, že mechanismy, jako např. fotoperiodické hodiny a počítadlo, zůstávají široce neprozkoumané. Díky průkopníkům v oblasti fotoperiodismu, jako byli Erwin Bünning, Anthony D. Lees, Colin

Pittendrigh, a díky jejich následovníkům alespoň známe formální vlastnosti tohoto systému. Jejich původní experimenty byly založené na používání různých systematických variací vstupů do systému (především pak světelné a teplotní podmínky) a pak sledování výstupu (hlavně vstup do dormance nebo různé sezónní morfotypy). Vše mezi vstupem a výstupem zůstávalo v „černé skřínce“.

David S. Saunders významně přispěl k rozvoji znalostí v oboru fotoperiodismu hmyzu (např. Saunders, 1968, 1978, 1992). Také vydal vynikající přehled o studiu časoměrného systému u hmyzu ve formě knihy, *Insect Clock* (Saunders, 2002). V následujících kapitolách budou stručně popsány jednotlivé funkční jednotky fotoperiodického časoměrného systému.

2.1 Receptory světla (neboli fotoreceptory)

Jedním z hlavních předpokladů pro správnou funkci fotoperiodického systému je zjevně přítomnost světločivných buněk a molekul. Na základě experimentů se ale ukázalo, že fotoperioda může být nahrazena denními cykly teplot, tzv. termoperiodou. A to bez jakéhokoliv zdroje světla (Beck, 1962; Saunders, 1973a) nebo dokonce za stálého světla (Masaki a Kikukawa, 1981). Termoperioda tedy může funkčně zastoupit většinu efektů fotoperiody. Zatím ale zůstává neznámé, zdali termoperioda přímo ovlivňuje fotoreceptory, které dále šíří signál, nebo má svou vlastní cestu a ovlivňuje tak organismus přímo.

Van Houten et al. (1987) prováděl experimenty na roztoči *Amblyseius potentillae*, přičemž zjistil, že při podávání potravy bez přítomnosti vitamínu A (karotenoidní prekurzor pro retinalový chromofor), znemožňuje roztoči vnímat a řídit se signálem fotoperiody. Podobný experiment byl posléze proveden na různých druzích roztočů a vždy s podobným efektem. S největší pravděpodobností tedy za fotoperiodickou fotorecepci u roztočů stojí A-vitaminové receptory (Veerman a Helle, 1978; Hasegawa a Shimizu, 1988; Claret a Volkoff, 1992; Goto et al., 2010).

Většina druhů hmyzu je nejvíce fotoperiodicky citlivá v oblasti modro-zelené části světelného spektra (vlnová délka přibližně 400-550 nm). Na druhou stranu nejnižší hodnoty citlivosti vykazuje hmyz na červenou světelnou oblast

spektra (vlnová délka > 600 nm) (Lees, 1966; Saunders, 2002). U některých druhů je ale sensitivní oblast značně rozšířená z modré části spektra až do červené (400-700 nm) (Pittendrigh et al., 1970; Saunders, 1975).

U hmyzu bohužel zatím nebyl nalezen žádný obecný fotoperiodický fotoreceptor ve formě opsinového proteinu. Jediným známým kandidátem je *boceropsin*, opsin, naklonovaný z larválních mozků bource morušového, *Bombyx mori* (Shimizu et al., 2001). Doposud byly fotoperiodické fotoreceptory nalezeny v hlavové oblasti asi u 19 druhů hmyzu (Numata et al., 1997; Goto et al., 2010) Zde uvádím několik druhů hmyzu, u kterých byla nalezena přímá fotorecepce řízená mozkem (ne signály z optických fotoreceptorů nacházejících se ve složeném oku, jednoduchém oku nebo světločivné skvrně); ploštice (Lees, 1964), housenky a kukly motýlů (Williams a Adkinson, 1964; Shimizu, 1982), mandelinka bramborová (Wilde et al., 1959) a zástupci z čeledi bzučivkovití, *Calliphoridae*, např. masařka (Saunders a Cymborowski, 1996). Další zajímavý výzkum proběhl na mšici *Megoura viciae* (Gao et al., 1999). Zjistilo se, že má fotoperiodické fotoreceptory umístěné na přední části protocerebera (přední mozek členovců) v oblasti neuropilu. Identická oblast byla popsána i v dřívějších studiích (Lees, 1964; Steel a Lees, 1977) za použití jiných technik.

Novější studie ukazují, že u určitých druhů hmyzu složené oko rovněž obsahuje fotoperiodické fotoreceptory (Numata, 1985; Shiga a Numata, 1996; Nakamura a Hodková, 1998; Komada 2015). U brouka *Plautia crossota stali*, byla potvrzena kooperace jak mozkových tak retinalových receptorů na fotoperiodickou odezvu. V další práci (Goto a Numata, 2009) bylo zjištěno že, charakteristická spektrální citlivost u masařky *Sacrophaga similis*, indukuje diapauzu. Tato masařka je schopná pravděpodobně využívat nejméně dva různé druhy fotopigmentu během své sensitivní periody v rámci temnostní fáze dne. Více druhů fotopigmentu slouží k vnímání různých vlnových délek. Raná skotofáze má u této masařky své sensitivní maximum kolem vlnových délek 450-470nm zatímco pozdní skotofáze vykazuje rozšíření do vyšších vlnových délek. U mšice *Megoura viciae* bylo objeven podobný systém sensitivity v době skotofáze (Lees, 1981).

2.2 Fotoperiodické hodiny

Hlavní úlohou fotoperiodických hodin je změřit aktuální délku noci a porovnat jí s geneticky kódovanou hodnotou pro kritickou fotoperiodu (viz výše) a na základě toho určit, zdali je noc krátká nebo dlouhá. V průběhu let vnikly dvě hlavní hypotézy, jak tento systém chápat (pro bližší historický vývoj čtěte: Saunders, 2005).

První hypotéza vyplynula z prvních fotoperiodických pokusů na rostlinách a hmyzu. Byla přijímána až do konce padesátých let dvacátého století a šlo o tzv. **model přesýpacích hodin**. Představme si tedy fotoperiodický systém jako přesýpací hodiny. „Písek“ uvnitř hodin byl chápán jako kaskáda biochemických reakcí a světlo silou, která hodiny každý den otočí vzhůru nohama. Když se „písek“ nestihne přesypat za jednu periodu, organismus dostane signál o krátkém dni. Tato hypotéza byla přijímána hlavně v začátcích studia fotoperiodismu při experimentech na roztočích a mšicích (Lees, 1950, 1953, 1955, 1973), později na roztoči *Tetranychus urticae* (Vaz Nunes a Veerman, 1982; Veerman a Vaz Nunes, 1987; Veerman a Veenendaal, 2003) a dalších druzích hmyzu (Skopik a Bowen, 1976; Thiele, 1977; Veerman et al., 1988).

Druhou, v současnosti obecně přijímanější hypotézou pro vysvětlení fotoperiodismu se stal **model cirkadiánního oscilátoru** formulovaný Erwinem Bünningem v roce 1936. Zajímavostí je, že si tímto modelem vysvětloval fotoperiodismus pouze u rostlin. Použit tento model u hmyzu ho napadlo až mnohem později (Bünning, 1960). Také jako vůbec první navrhnul, že fotoperiodické měření času závisí na endogenním, tedy vnitřním, denním rytmu (cirkadiánním rytmu). Colin S. Pittendrigh jeho nápad potvrdil svým modelem *vnější coincidence*, který ukazuje dvě různé role světla ve funkci fotoperiodismu. První funkcí světla je, že umožňuje organismu vnímat a určit denní cyklus. V druhé polovině noci, ve specificky citlivé fázi na světlo (tzv. fotoindukční fáze), nastává druhá klíčová role světla. A to rozpoznání kritické délky noci (Pittendrigh a Minis, 1964; Pittendrigh, 1966). Zkracování nebo prodlužování dne je určeno tím, jestli je v době fotoindukční fáze organismus pod vlivem světla (dlouhý den) nebo tmy (krátký den).

Naproti tomu model *vnitřní coincidence* postuluje existenci tzv. duálního oscilátoru (Pittendrigh a Daan, 1976). Základem pro tento model byl vzájemný vztah mezi dvěma (nebo i více) vnitřními oscilátory, které jsou různě ovlivňovány fotoperiodou. A to přesněji: vzájemný vztah jejich fáze, který vymezuje buď dlouhou, nebo krátkou délku noci. Představme si tedy dva oscilátory. Oba registrují fotoperiodický signál, každý trochu jiným způsobem. Vzájemné přibližování a oddalování fáze těchto oscilátorů měří, zda je noc krátká nebo dlouhá. Během let bylo vymyšleno mnoho důmyslných formálních pokusných protokolů pro rozluštění vztahu mezi cirkadiánními rytmy a fotoperiodou. Zde uvádím pár příkladů; noční vyrušení, Bünsowův protokol, Nanda-Hammerův protokol, T-experimenty. Všechny tyto protokoly slouží pro možné odhalení funkce oscilátorů v časoměrných systémech. Pro více detailů o protokolech a metodách čtěte v literatuře (Saunders, 2002, 2005, 2007, 2009, 2010a,b).

V současnosti u hmyzu převažují experimentální důkazy spíše pro model cirkadiánního oscilátoru. Na druhou stranu existují druhy hmyzu, u kterých tento model nebyl potvrzen jako např. u mšice *Myzus persicae* (Lees, 1973). Je ale zřejmé, že také silně záleží na typu a konkrétním provedení experimentu (Veerman a Vaz Nunes, 1980; Vaz Nunes a Veerman, 1984), na teplotě (Saunders, 1973b), na potravě (Dumortier a Brunnarius, 1989) nebo na geografické populaci (Thiele, 1977).

Díky nahromadění různých poznatků se postupně začalo ukazovat, že modely přesýpacích hodin a cirkadiánního oscilátoru mohou být pouze dvě různá vysvětlení pro jeden stejný mechanismus. Tak vznikl poslední, a obecně asi nejvíce přijímaný model: **tlumeného cirkadiánního oscilátoru**. Jako první ho navrhnul Erwin Bünning (1969) a později jej potvrdili Lewis a Saunders (1987, 1978 a, b). Pomocí matematických modelů a zhodnocení předchozích výsledků David S. Saunders vcelku přesvědčivě vysvětlil rozpor mezi dvěma dřívějšími modely. A to tak, že silně tlumený cirkadiánní oscilátor se navenek chová tak, jako by byl přesýpacími hodinami (Saunders, 2005, 2008, 2009, 2010a,b).

2.3 Fotoperiodické počítadlo (counter)

Hmyz potřebuje zpravidla několik dní ke kladné fotoperiodické odezvě (např. k indukci diapauzy) během své citlivé periody. Tato perioda zůstává fixní v ontogenetickém vývoji. Je závislá na jedinci, druhu, předchozí generaci, různých fázích embryonálního, larválního nebo pupariálního vývoje (Košťál, 2006). Existuje představa, že počítadlo slouží k hromadění fotoperiod, které by měly indukovat fotoperiodickou odezvu. Když se překročí určitý práh na počítadle, nastane odezva ve formě změny aktivity výstupních cest. Tento práh se nazývá buď kritický počet dní (Tyshchenko et al. 1972) nebo doporučený počet dní (Saunders, 1971). Právě souhra kritické fotoperiody a překročení prahu na počítadle řídí pokračování ve vývoji nebo vstup do diapauzy.

Působením teploty nebo potravy je možné kompenzovat práh počítadla, nikoliv ale délku kritické fotoperiody (Denlinger, 1972; Hardie, 1990). Tyto procesy zpomalující vývoj (jako působení nízké teploty, nevhodná potrava) mají vlastně za následek prodloužení citlivé periody. To umožňuje nahromadit dostatečné množství induktivních fotoperiod, které pak zvýší výskyt diapauzy (Saunders, 2002).

Ačkoliv je zřejmé, že počítadlo funkčně spolupracuje s hodinami, jeho fyziologická povaha zůstává prozatím zcela nepoznaná. Je tedy možné, že jsou hodiny a počítadlo součástí stejného systému. Hodiny udávají jednoduchý kvalitativní signál (0 nebo 1) např. krátká nebo dlouhá noc, zatímco počítadlo dodává kvantitativní informaci „kolik“ (Vaz Nunes, 1990). Gibbs (1975) přišel s nápadem tzv. „diapauzního titru“ - tedy kritické koncentrace určité látky, jejíž překročení rozhodne o přepnutí mezi přímým a diapauzním vývojem. Je to ale jen další hypotetický popis počítadla, žádný konkrétní diapauzní titr nebyl doposud nalezen. V další kapitole stručně popíši výstupní cesty systému kalendáře.

2.4 Výstupní cesty

Princip přenosu fotoperiodické informace ještě není úplně přesně známý, je ale známé, kde jeho cesta končí. Nejpravděpodobnější destinací signálů jsou neurosekreční buňky v přední části hmyzího protocerebera. První mozkové transplantace na můře *Antheraea pernyi* byly provedeny Williamsem (1969) a později zopakovány na dalších druzích hmyzu (Bowen et al., 1984a,b; Shimizu et al., 1997; Shiga et al., 2003; Hamanaka et al., 2004). Tyto experimenty ukázaly, že existují neurony *pars intercerebralis* (PI) a *pars lateralis* (PL), jež jsou nezbytné pro převod fotoperiodického signálu na hormonální signál. Kontrola a funkce endokrinních buněk a orgánů je řízena vypouštěním neuropeptidů (lokálně nebo do oběhu) právě z těchto neuronů. Některé PI nebo PL jsou přímo spojené s endokrinními buňkami v neurohemálních orgánech *corpora cardiaca* (CC) a *corpora allata* (CA). CC a CA jsou hlavní centra vypouštění hmyzích hormonů (Shiga a Numata, 2007). Hormonální regulace vstupu do diapauzy se ale liší u různých druhů hmyzu v závislosti na tom, ve které fázi svého vývoje do diapauzy vstupují. Vstup do diapauzy nebo pokračování ve vývoji je nicméně řízeno biosyntézou/degradací nebo vypouštěním hlavních vývojových hormonů - juvenilních hormonů (JH) a ekdysteroidů (Denlinger, 2000, 2002; Denlinger et al., 2004; MacRae, 2010).

Diapauza je v dospělém stádiu ontogeneze charakteristická potlačením syntézy juvenilních hormonů a vypouštěním hormonu z CA. Toto potlačení je řízeno PI a PL neurony přes přímé spojení s CA (Khan et al., 1983; Poras et al., 1983; Hodková, 1976; Hodková et al., 1996; Morita a Numata, 1997; Shiga a Numata, 2000). U dvoukřídlých se na kontrole diapauzy v dospělém stavu podílejí také ekdysteroidy (Brown et al., 1998; Richard et al., 1998), ačkoliv ty se spíše považují za hlavní faktory v regulaci larvální a pupariální diapauzy. Ekdysteroidy jsou syntetizovány a vypouštěny prothorakální žlázou, která je řízena hormonem PTTH (prothoracikotropní neuro-hormon). Tento hormon je syntetizován PL buňkami a je vypouštěn do hemolymfy z oblasti CA (Agui et al., 1979; Shiga et al., 2003; Siegmund a Korge, 2001).

Jedním z příkladů hormonální regulace je embryonální diapauza u bource morušového. Diapauzní hormon (DH), produkovaný subesofageálním gangliem (SOG), je dále transportován po axonech do CC, odkud je následně vyléván do hemolymfy (Sato et al., 1994). Tento hormon indukuje diapauzu v rané fázi embrya další generace (Yamashita, 1996). Za aktivitou neuronů SOG stojí inhibiční kontrola protocerebera (Schimitzu et al., 1997).

Další z možných příčin indukce diapauzy je potlačení signálu přenášeného insulinem (Tatar et al., 2001; Williams et al., 2006, 2010; Sim a Denlinger, 2008). Tato signální insulinová dráha přitom hraje jednu z hlavních rolí v hmyzím růstu a vývoji. Její přerušení zastaví růst a vývoj. Stručně je možné tuto dráhu popsat jako PI3-kinázovou kaskádu reakcí, která dále fosforyluje transkripční faktor FOXO, zastavující aktivitu (Jünger et al., 2003; Wu a Brown, 2006; Baumeister et al., 2006; Fielenbach a Antebi, 2008). Ve studii prováděné na komáru *Culex pipiens* (Sim a Denlinger, 2008) bylo zjištěno, že se insulinová dráha inaktivuje během dlouhých nocí (včetně larvální diapauzy). Inaktivace zastaví syntézu JH za současného uvolňování transkripčního faktoru FOXO. Dále dojde ke stimulaci transkripce genů jež jsou zodpovědné za přípravu organismu před vstupem do diapauzy (ukládání tuků, zvýšení stresové tolerance atd.). Změnou transkripce genů a následnou změnou proteinů vzniká velmi hluboká sezónní fenotypová proměna nazývaná souhrnně jako „syndrom diapauzy“ (Flannagan et al., 1998; Robich et al., 2007; Košťál et al., 2008, 2009a; Cheng et al., 2009; Reynolds a Hand, 2009; Yocum et al., 2009; Emerson et al., 2010; MacRae, 2010).

2.5 Fotoperiodický kalendář- shrnutí

Hlavními komponentami fotoperiodického kalendáře jsou fotoperiodické hodiny a počítadlo. Struktura počítadla v mozku zůstává zcela neznámá.

Do systému kalendáře přichází mnoho vstupních signálů přes velmi málo prozkoumané fotoreceptory nacházející se jak v mozku, tak ve složených očích. Neznámá také zůstává povaha fotoreceptivních molekul. V posledních letech se ale ukazuje, že by funkci těchto molekul mohly mít retinalové chromofory, přesněji rodopsin. Fotoperiodické hodiny pravděpodobně fungují na principu tlumeného cirkadiálního oscilátoru, který je řízen denní periodou,

měřením skotofáze. Někteří vědci ale preferují model přesýpacích hodin. Výstup fotoperiodických hodin je neznámý, nicméně se dá popsat jako určitá hladina na hypotetickém počítadle diapauzních signálů. Informace se pak dále přenáší do neurosekrečních buněk v laterálním (PL) a dorsálním (PI) protocereberu, které vylučuje neuropeptidy (např. PTTH, allatotropiny, peptidy na insulinové bázi atd.). Tyto neuropeptidy dále ovlivňují (společně s neurosekrečními buňkami přímým axonálním spojením) aktivitu neurohemálních orgánů (CC a CA) a činnost endokrinní žlázy (protorakální žláza). Celý řetězec je zakončený vylitím důležitých hormonů jako jsou JH a ekdysteroidy.

3. Struktura a funkce cirkadiálních hodin

K předjímání denních změn světla, teploty a dalších přírodních faktorů slouží endogenní časoměrný systém, takzvané cirkadiální hodiny. Různé projevy chování organismů (pohyb, hledání potravy, námluvy, páření, kladení vajec, líhnutí...) jsou řízeny souhrou vnějších faktorů a oscilujících vnitřních hodin (Saunders, 2002). Mimo jiné se ukazuje, že cirkadiální hodiny přímo ovládají a regulují časovou strukturu organismu, např. syntézu a vylití hormonů, biosyntézu feromonů (Raina a Menn, 1987), buněčné dělení (Matsuo et al., 2003; Reddy et al., 2005) nebo metabolické cykly (Wijnen a Young, 2006). Zde uvádím základní a všeobecně přijímané charakteristické vlastnosti cirkadiálních hodin.

- (A) po vyřazení přírodního signálu sloužícího k synchronizaci (Zeitgeber), hodiny stále tikají;
- (B) vnitřní perioda oscilátoru je cca 24 h;
- (C) vnitřní perioda je nezávislá na teplotě (ve smysluplném ekofyziologickém rozsahu);
- (D) hodiny mají schopnost se fázově srovnat s přírodními Zeitgebery (entrainment).

Díky octomilce *Drosophila melanogaster* máme velké množství informací o genetickém mechanismu cirkadiálních hodin (Dunlap, 1999; Saunders, 2002; Hall, 2003; Roennenberg et al., 2003; Rosato et al., 2006a,b; Wijnen a Young, 2006; Helfrich-Förster, 2009) a hlavních hodinových genech (Rosato et al., 2006a,b).

3.1 Molekulární mechanismus hodin

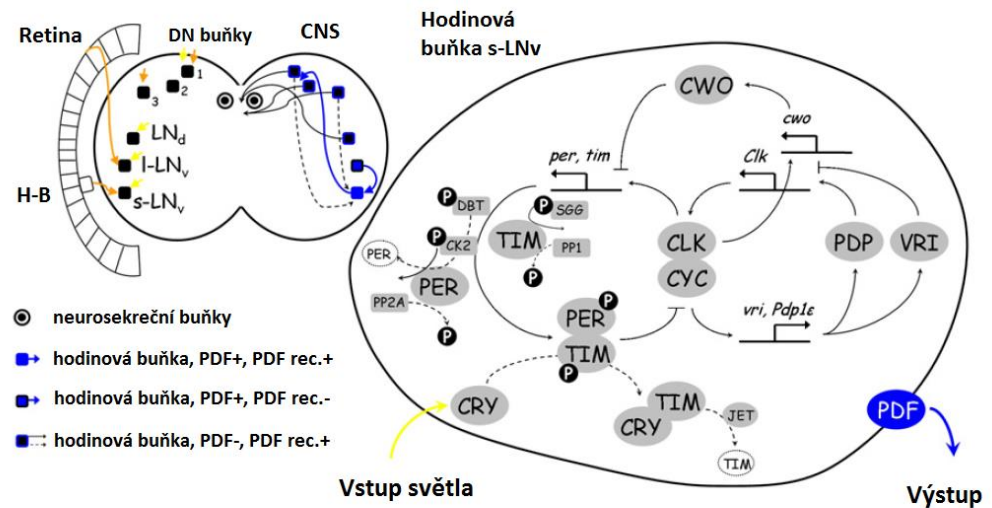
Za základ molekulárního mechanismu hodin se považuje exprese hodinových genů ve zcela specifických oblastech mozku poháněná transkripčně-translační zpětnou vazbou jejich produktů (Hall, 2003). Tento systém pak řídí denní rytmy chování a fyziologických funkcí, jak je znázorněno na obrázku 2. Jak již bylo zmíněno, první hodinové geny se podařilo získat u *D. melanogaster*. Úplně první byl gen *period* (*per*), naklonovaný a chemicky analyzovaný právě u *D. melanogaster* v roce 1984 (Bargiello et al., 1984; Zehring et al., 1984). Druhý hodinový gen, *timeless* (*tim*), byl analyzován až více než 10 let později, také u *D. melanogaster* (Sehgal et al., 1994; Myers et al., 1995). V tu dobu se také přišlo na to, že produkty těchto dvou genů mohou tvořit dimer přes tzv. PAS domény (Gekakis et al., 1995). Stojí za to také zmínit, že vůbec první hodinový gen u savců *Clock* (*Clk*), byl nalezen u myši až po objevech učiněných na hmyzu (Vitaterna et al., 1994; Antoch et al., 1997).

První funkční modely cirkadiálních hodin u hmyzu se začaly koncipovat již krátce po objevení prvních dvou již zmíněných genů. Za podmínek konstantní tmy byly nalezeny v mozku much oscilující hodinové proteiny a mRNA s endogenní periodou blízkou 24 h. Nejvyšší hladina mRNA byla pozorována během časně (subjektivní) noci, zatímco hladina proteinů byla nejvyšší až během pozdní noci. Tento fakt ukazuje prodlevu mezi transkripcí a translací (Hardin et al., 1990; Edery et al., 1994). Okolo půlnoci proniká dimer PERIOD-TIMELESS (PER-TIM) do jádra. Při nástupu ranního světla jen TIM velmi rychle degradován. To uvolní PER, který má funkci přímého inhibitoru (negativní element) dalších dvou jaderných hodinových proteinů, CLOCK-CYCLE (CLK-CYC) (Curtin et al., 1995; Saez a Young, 1996). Krátce po objevu *Clk* u savců byl tento homolog nalezen také u hmyzu (Allada et al., 1998), téměř ve stejnou dobu jako CYCLE (Rutila et al., 1998).

Dimer CLK-CYC (pozitivní element) funguje jako aktivátor transkripce. Indukuje tím rytmickou expresi cílových genů obsahujících vhodnou doménu, jako jsou například E-boxy (CACGTG), v oblasti jejich promotoru (Allada et al., 1998; Darlington et al., 1998).

Takto lze pomocí zpětné vazby potlačit transkripci hodinových genů *per* a *tim* proteinem PER, jelikož promotory genů *per* a *tim* také obsahují E-boxy (Lee et al., 1999). Tento model je ale velmi zjednodušený. Modulační kinázy (DBT, SGG, CK2) a fosfatázy (PP1, PP2A) regulují hromadění proteinů PER a TIM v cytoplasmě, jadernou translokaci a degradaci těchto proteinů (Kloss et al., 1998; Martinek et al., 2001; Lin et al., 2002; Sathyanarayanan et al., 2004). Druhá zpětná vazba je také aktivována dimerem CLK-CYC prostřednictvím E-boxů. Transkripce *Clk* je pak regulována dvěma transkripčními faktory, VRI (represor) a PDP1 ϵ (aktivátor) (Cyran et al., 2003). Dle teoretického matematického modelu (Kuczenski et al., 2007) bylo pro úplné vysvětlení experimentálních pozorování a pro stabilizaci hodinového mechanismu potřebné přidat ještě třetí zpětnou vazbu. Tato třetí zpětnovazebná smyčka byla nakonec skutečně nalezena ve formě proteinu CWO (Lim et al., 2007). Transkripce *cwo* je aktivována CLK. CWO pak plní funkci transkripčního represoru pro cílové geny jako např. CLK (Richier et al., 2008).

Je třeba podotknout, že většina informací o cirkadiálních hodinách pochází z pokusů na *D. melanogaster*. Ačkoliv dostupná data poukazují na to, že se různé druhy hmyzu mohou lišit v detailech, základní princip zpětné vazby zůstává stejný (Sauman a Reppert, 1996a; Rubin et al., 2006; Codd et al., 2007). Schéma molekulárních hodin je znázorněno na dalším listu, obrázek 2.



Obr. 2: Obecně uznávaná schematická struktura cirkadiálních hodin u *D. melanogaster*. Na levé straně obrázku se nachází celá neuronální síť centrálního cirkadiálního pacemakeru. Na pravé straně vidíme znázorněnou jedinou samostatnou hodinovou buňku. V levé hemisféře se nachází tři skupiny buněk laterálních neuronů (LN) a tři dorsálních neuronů (DN). Tyto buňky plní hlavní úlohu receptoru světla. Krátké žluté šipky značí přímý vstup světla do systému, který dopadá na flavinové fotoreceptory. Dlouhé oranžové šipky značí vizuální fotorecepci skrz retinalové fotoreceptory ve složeném oku a Hofbauer-Buchnerových očkách (H-B). Krátké oranžové šipky označují retinalové fotoreceptory; tyto receptory jsou ale velmi málo prozkoumané. V oblasti pravé hemisféry jsou naznačeny hlavní axonální dráhy. Modré šipky značí axonální výběžky hodinových buněk s expresí proteinu PDF. Černé šipky naznačují výběžky hodinových neuronů. Ty směřují do oblasti meduly (přerušovaná čára) a dorsálního protocerebera (plná čára). V oblasti dorsálního protocerebera je možné sledovat překryv různých axonálních výběžků a je zde také pravděpodobný kontakt s neurosekrečními buňkami. Povaha molekulárních hodin v jednom hodinovém neuronu je založena na systému zpětných vazeb transkripce-translace. Tato odezva se odehrává mezi pozitivním prvkem CLK-CYC a negativním prvkem PER-TIM. Další hodinové proteiny tvoří zbylé zpětné vazby. Díky molekulám fotoreceptoru CRY je celý systém citlivý na světlo. Produktem exprese některých hodinových genů je neurotransmitter PDF, který slouží jako pravděpodobný výstupní signál (překresleno podle Košťál. 2011).

3.2 Centrální pacemaker a neuronální síť

Centrální pacemaker je vlastně neuronální sítí specializovaných hodinových buněk v mozku (obrázek 2). Tato síť je složená ze simultánně pracujících, ale jinak zcela autonomních neuronů (oscilátorů). Z tohoto důvodu vypadá centrální pacemaker jako multioscilátorový systém. Jak už bylo výše zmíněno, skládá se ze tří skupin laterálních neuronů a tří skupin dorsálních neuronů v každé hemisféře mozku octomilky (Kaneko a Hall, 2000; Blanchardon et al., 2001). Octomilky vykazují typický bimodální rytmus v aktivitě s vrcholy vyskytujícími se zároveň se svítáním a stmíváním. Tato aktivita je řízena duálním oscilátorem složeným z večerního E-oscilátoru (z anglického evening) a ranního M-oscilátoru (z anglického morning) (Helfrich-Förster, 2001). O pár let později přišly dvě skupiny vědců s nápadem, že se M a E oscilátory nachází ve specifických skupinách hodinových neuronů (Grima et al., 2004; Stoleru et al., 2004). M oscilátor se nachází v malých ventrálních laterálních skupinách buněk (s-LN_v) zatímco E oscilátor v dorsálních laterálních skupinách buněk (LN_d). Oba oscilátory mohou fungovat autonomně, ale jsou funkčně propojeny pomocí neurotransmiteru PDF (pigment-disperzní faktor). Současné studie do systému M-E oscilátorů přidaly mnoho vylepšení. Některé M a E neurony byly popsány mnohem přesněji (Rieger et al., 2009). Ukázalo se, že se celý systém chová velmi pružně na základě přírodních vlivů (Stoleru et al., 2005; Picot et al., 2007; Dubruille a Emery, 2008; Helfrich-Förster, 2009). Takto byla vlastně experimentálně podpořena možnost platnosti dřívějšího formálního modelu duálního oscilátoru s vnitřní koincidencí (Pittendrigh a Daan, 1976).

3.3 Periferní pacemakery

Exprese hodinových genů neprobíhá pouze v mozku, ale také ve většině periferních tkání. Například buňky ve složeném a jednoduchém oku octomilky vykazují robustní cirkadiánní oscilace PER a TIM (Siwicki et al., 1988; Zerr et al. 1990). Použitím transgenních octomilek bylo zjištěno, že cirkadiánní oscilátory v těchto vizuálních fotoreceptorech mohou fungovat zcela autonomně, nezávisle na centrálním pacemakeru v mozku (Cheng a

Hardin, 1998). Tyto autonomní hodiny jsou pravděpodobně zapojené do regulace denních rytmů světelné citlivosti vizuálního systému (Giebultowicz, 2000). Přítomnost autonomních cirkadiánních pacemakerů byla později zjištěna také v nohou, křídlech a tykadlech octomilky pomocí experimentů sledujících cyklickou expresi *per* za použití *luciferázy* (Plautz et al., 1997). Periferní pacemakery jsou rovněž spojené s chemoreceptory, kde pravděpodobně modulují jejich míru citlivosti během dne (Krishnan et al., 1999; Tanoue et al., 2004).

Je velmi pravděpodobné, že také syntéza a vypouštění hormonů jsou u hmyzu pod silnou cirkadiánní kontrolou (Jackson et al., 2001; Zhao a Zera, 2004; Vafopoulou a Steel, 2009; Vafopoulou et al., 2010). Zatím tomu nasvědčuje většina důkazů. Je pravděpodobné, že hodinové neurony přímo ovlivňují aktivitu buněk PTTH (Sauman and Reppert, 1996b). Například hladina PTTH v buňkách laterálního protocerebera u plošnice *Rhodnius prolixus* je řízena výběžky hodinových neuronů (Vafopoulou et al., 2007, 2010). U této plošnice je možné pozorovat jasnou cirkadiánní rytmicitu koncentrace PTTH (Vafopoulou a Steel, 1996). PTTH pak dále působí na protorakální žlázu a uvnitř ní indukuje syntézu ekdysteroidů (Vafopoulou a Steel, 1999). Kolísající hladina ekdysteroidů v hemolymfě následně poskytuje časový signál všem cílovým tkáním. Ekdysteroidový signál je zachycen příslušnými receptory. Aktivita receptorů rovněž vykazuje zřetelný denní rytmus, který je synchronní s vypouštěním hormonů (Vafopoulou et al., 2005). Příklad plošnice *R. prolixus* tak ukazuje na velmi silné spojení cirkadiánního a hormonálního systému. Je možné, že se podobné propojení vyskytuje u většiny druhů hmyzu.

Je nutné zmínit, že exprese genu *per* byla zaznamenána u octomilky v nejrůznějších orgánech: ve slinných žlázách, střevním epitelu, Malpigických trubicích, v samčích a samičích rozmnožovacích orgánech (Giebultowicz, 1999, 2000, 2001; Vansteensel et al., 2008). Ve většině případů oscilace genu *per* v různých orgánech probíhaly relativně autonomně bez přispění mozku (Hardin, 1994). Díky tomuto zjištění se zdá, že hmyz nemá přísně hierarchické uspořádání časoměrných systémů (nadřazený centrální pacemaker v mozku a podřízené oscilátory v perifériích), nýbrž funguje spíše

jako mnoho nezávisle (autonomně) na sobě tikajících hodinových strojků. Toto uspořádání může fungovat velmi dobře, jelikož je tělo hmyzu většinou propustné pro světlo. Proto hmyz možná tolik nepotřebuje centralizovaný systém a systém rozvodu centrálního signálu po těle. Světlo se jednoduše dostane ke většině buněk přímo. V periferních tkáních se nachází molekula receptoru citlivá na modré světlo (CRY). Role CRY bude probrána v další kapitole.

3.4 Vstupní a výstupní dráhy centrálního cirkadiálního pacemakeru

Centrální pacemaker přijímá vstupní signály mnoha různými cestami, podobně jako fotoperiodické hodiny (Hall, 2000; Helfrich-Förster, 2002, 2005). Klasická fotorecepce se částečně podílí na entrainmentu (synchronizace vnitřního rytmu s vnějším cyklem) v neuronech centrálního pacemakeru (Helfrich-Förster et al., 2001). A to díky nervovým drahám vstupujícím do pacemakeru od orgánů jako jsou: složené oko, jednoduché hmyzí oko (ocelli), H-B očka (pouze u dospělců) a Bolwigův orgán (pouze u larev). Mnoho samotných hodinových neuronů přímo exprimuje protein CRY, který je v současnosti považován za jeden z hlavních fotoreceptorů centrálního pacemakeru (Emery et al., 1998, 2000; Stanewsky et al., 1998). Jak již bylo zmíněno, CRY vykazuje maximální citlivost na modré světlo (400-500nm). Funkci receptoru plní chromofor flavinu na bázi vitamínu B2. Jakmile je CRY vystaven světlu, naváže se na hodinový protein TIM, urychluje jeho ubikvinaci a následně dochází k proteosomální degradaci TIMu (Ceriani et al., 1999). Tato reakce je hlavním mechanismem, který synchronizuje centrální pacemaker s denním cyklem (Lee et al., 1996). Degradace proteinu TIM je zprostředkována pomocí F-box proteinu JETLAG (JET) (Koh et al., 2006; Peschel et al., 2009). Při nedostatku CRY je částečně kompenzována světelná citlivost pacemakeru rodopsinem ve vizuálních fotoreceptorech. Toto je možné díky neuronálnímu propojení H-B oček s buňkami s-LN_v a buněk l-LN_v se složeným okem (Helfrich-Förster et al., 2001; Collins et al., 2005). Přenos světelného signálu je možný snad i díky dalším fotopigmentům exprimovaným v jiných částech pacemakeru. Expres

těchto pigmentů pak posílá informaci přímo do centrálního pacemakeru. Například buňky DN₁ exprimují neznámý rodopsinový pigment; buňky DN₃ mohou obsahovat ještě další, dosud zcela neznámý fotoreceptor (Veleri et al., 2003; Klarsfeld et al., 2004).

O výstupních drahách centrálního pacemakeru bylo dosud nashromážděno relativně málo informací. PDF je hlavním doposud popsaným neurotransmiterem, který pravděpodobně zprostředkovává výstupní signál hodin. Jedná se o hmyzí homolog pigment-disperzního hormonu desetinožců (Homberg et al., 1991). Kódující gen *Pdf* byl poprvé izolován a naklonován u *D. melanogaster* (Park a Hall 1998). Ve všech hodinových neuronech byl také nalezen G-proteinový receptor PDF (Hyun et al., 2005; Lear et al., 2005; Mertens et al., 2005; Shafer et al., 2008). Věří se, že PDF hraje klíčovou roli jakožto signální molekula, která synchronizuje jednotlivé neurony tvořící neuronální síť pacemakeru. Je také pravděpodobné, že molekula PDF funguje jako hlavní výstupní signál centrálního pacemakeru k podřízeným neuronům (Renn et al., 1999; Peng et al., 2003; Lin et al., 2004; Yoshii et al., 2009). Ačkoliv většina informací pochází z pokusů na *D. melanogaster*, zdá se, že PDF hraje stejnou roli i u ostatních druhů hmyzu (Petri and Stengl, 2001; Schneider a Stengl, 2005). U mozkových neuronů (s-LN_v a l-LN_v) dospělého *D. melanogaster* byly zmapovány axonální dráhy exprese PDF (Shafer et al., 2008; Yoshii et al., 2009) s rytmickým vypouštěním PDF do dorsálního protocerebra (Park et al., 2000; Yoshii et al., 2009). V oblasti dorsálního protocerebra je PDF nezbytný pro správné nastavení oscilace dorsálních hodinových neuronů (perioda, fáze a amplituda). Další funkcí PDF je synchronizace E a M oscilátorů (Yoshii et al., 2009). Bez PDF přestávají E a M oscilátory vzájemně komunikovat a octomilka tak ztrácí schopnost modulovat své lokomoční chování s měnící se délkou dne (Yoshii et al., 2009).

V oblasti dorsálního protocerebra se navíc nacházejí důležité neurosekreční buňky. Tyto buňky ovlivňují biosyntézu a vypouštění vývojových hormonů. Například s-LN_v neurony u *D. melanogaster* se překrývají s pěti peptidergickými neurony, které přímo inervují prorakální žlázu nebo buňky CA. Tyto peptidergické neurony pravděpodobně regulují vypouštění

ekdysteroidů a JH a tím řídí správné načasování vývojového cyklu (Siegmund a Korge, 2001). Většina neuroanatomických studií tedy naznačuje přímé funkční spojení cirkadiánního a hormonálního systému.

3.5 Cirkadiánní hodiny-shrnutí

Napříč celým tělem hmyzu jsou rozptýlené buňky, obsahující cirkadiánní oscilátory. Tyto periferní pacemakery pracují především nezávisle na centrálním pacemakeru a řídí lokální fyziologii. Centrální pacemaker je složen ze sítě hodinových neuronů v mozku, které spolu úzce spolupracují a řídí především denní rytmicitu chování a humorální systém. Světelný signál přichází do centrálního pacemakeru různými cestami. Je přijímán hlavně fotoreceptivní molekulou CRY, která obsahuje flavinový chromofor. Existují však i hodinové neurony, které přijímají světelný signál zprostředkovaně, pomocí vizuální fotorecepce přes retinalové fotoreceptory. Funkce jednotlivých hodinových neuronů je založena na principu zpětné vazby transkripce-translace mezi pozitivním prvkem CLK-CYC a prvkem negativním PER-TIM. Jednotlivé neurony se biochemicky i funkčně liší. Neuropeptid PDF vzájemně propojuje jednotlivé hodinové neurony. Hodinové neurony komunikují pomocí PDF s oblastmi dorsálního a laterálního protocerebera, kde se nacházejí důležité neurosekreční buňky. Díky tomu se hodinové neurony pravděpodobně podílí na rytmickém vylévání neuropeptidů a přenosu informace dalším neuronům.

4. Chymomyza costata

C. costata patří stejně jako *D. melanogaster* do čeledi *Drosophilidae*. Na rozdíl od *Drosophily* se nejedná o octomilku tropickou, ale holarktickou. Jedná se tedy o octomilku silně sezónní, s jednou či více generacemi za rok, jejichž počet je závislý na lokálním klimatu (Hackman et al., 1970). Všechna stádia larválního vývoje u divokého kmene (*wt*) této octomilky jsou citlivá na fotoperiodu. Při vystavení podmínkám krátkého dne všechny larvy třetího instaru zastaví svůj vývoj a vstoupí do fakultativní diapauzy. Za podmínek dlouhého dne larvy pokračují ve vývoji, a tedy se zakuklí (Riihimaa a Kimura, 1989; Košťál et al., 2000a). Existuje mutovaný, nefotoperiodicky-diapauzní kmen *Chymomyzy* (NPD), který byl izolovaný selekcí spontánní mutace z divokého kmene (Riihimaa a Kimura, 1988). Larvy NPD kmene pokračují ve vývoji nezávisle na délce dne (nereagují na fotoperiodu). Bylo zjištěno, že za nefotoperiodismu u larev může mutace jediného lokusu neznámého autosomálního genu (*npd*) (Riihimaa a Kimura, 1989; Lankinen a Riihimaa, 1997). Díky analýze fotoperiodického kalendáře byl nalezen prvek cirkadiánně oscilační povahy, který se účastní i fotoperiodického měření času (Yoshida a Kimura, 1995; Košťál et al., 2000b). Homolog *per* u *C. costata* byl osekvenován v roce 1999 lokalizován na chromozom X (Shimada, 1999). U divokého kmene byly naměřeny zřetelné cirkadiánní oscilace *per* mRNA, zatímco u mutovaného *npd* kmene chyběly (Košťál a Shimada, 2001; Kobelková et al., 2010). Tyto výsledky tedy naznačují, že za ztrátu fotoperiodismu u larev, za poruchu cirkadiánního časoměrného systému a nedostatek rytmicity u dospělců může mutace jediného genového lokusu *npd*. Později bylo zjištěno, že také gen *tim*, resp. jeho mRNA, vykazuje u divokého kmene normální denní oscilace, zatímco u *npd* jen velmi slabou expresi a žádné denní oscilace (Pavelka et al., 2003; Kobelková et al., 2010). Po sekvenaci genu *tim* se ukázalo, že existují významné strukturální rozdíly mezi divokým a mutovaným kmenem, zejména v oblasti promotoru. Genetické analýzy ukázaly, že při zpětném křížení *wt* a *npd* se přenáší nefotoperiodický fenotyp na potomstvo F2 generace spolu s mutantní alelou genu *tim*. Tento objev vedl k myšlence, že u *C. costata* *npd* lokus kóduje gen *timeless* a jeho produkt možná bude molekulárním spojením mezi systémem cirkadiánních

hodin a fotoperiodického kalendáře. Tato myšlenka vedla k analýze exprese genu *tim* u larev třetího instaru, kdy larvy vykazují nejvyšší fotoperiodickou citlivost (Košťál, 2011). Během podmínek nastavených na krátký den bylo možné u *wt* sledovat jasné denní oscilace transkripce *tim*, zatímco za dlouhého dne převládalo postupné zvyšování hladiny *tim* mRNA s pokračujícím vývojem. Exprese *tim* se změnila během pěti dnů po přemístění larev z LD do SD podmínek, zároveň s přepnutím vývojové dráhy směrem od přímého vývoje k diapauze. Protein TIM byl nalezen pouze ve dvou neuronech (v každé hemisféře) u 4 dny starých *wt* larev třetího instaru - tedy u fotoperiodicky citlivých larev. Zároveň bylo zjištěno, že hladina proteinu TIM je pod fotoperiodickou kontrolou. Oproti tomu se u čtyřdenních *npd* larev třetího instaru nevyskytovaly žádné neurony, obsahující TIM, a hladiny *tim* mRNA byly celkově velmi nízké až úplně arytmičné (Stehlík et al., 2008). Zjistilo se, že alela *tim^{npd}* nese delecí (1855 bazí) v oblasti 5'-UTR, která odstraňuje začátek *tim* mRNA transkripce a zároveň důležité promotory jako např. E-box nebo TER-box (Stehlík et al., 2008). V roce 2010 proběhla *in vitro* detailní analýza *tim* promotorů u *wt* i *npd* (Kobelková et al., 2010). Delece kanonických E-boxů, TER-boxů a dvou nekompletních sekvencí E-boxu negativně ovlivňovaly transkripci genu *tim* řízenou pozitivním elementem CLK v *in vitro* systému. Tato studie také dokázala, že delece 1855 bazí je přímo zodpovědná za inaktivaci exprese genu *tim* u *npd* jedinců (Kobelková et al., 2010). Studie prováděné na *C. costata* tak ukazují, že mutací *tim* promotoru u *npd* jedinců dojde k narušení regulace exprese proteinu TIM. To následně zapříčiní arytmičné chování u dospělců a ztrátu fotoperiodismu u larev. Protein TIM tedy musí být zapojen do obou časoměrných systémů - cirkadiánních hodin i fotoperiodického kalendáře. Nicméně ještě není dostatek důkazů pro to, jakým způsobem spolu tyto dva systémy spolupracují. Larvální stadium 3. instaru *C. costata* je celkově velmi arytmičné. Rytmicita se dá sledovat na několika různých úrovních (změny lokomočního chování, změny rychlosti metabolismu (respirace), změny hladiny hormonů a aktivity enzymů, změny exprese genů atd.). Na mnoha zmíněných úrovních *C. costata* ve stádiu 3. instaru nevykazovala žádnou nebo téměř neměřitelnou rytmicitu (nepublikované výsledky Košťál, Schöttner).

V této práci byly sledovány denní změny v aktivitě vybraného enzymu a dále v expresi 6 - ti vybraných kandidátních genů. Geny byly zvoleny na základě výsledků předběžné RNAseq analýzy exprese transkriptomu ve dvou denních časech (Zt1 a Zt13). Z celkového počtu cca 23 tisíc analyzovaných transkriptů jich pouze 357 vykazalo rozdíly ve dvou denních časech a z nich pouze 23 bylo společných pro LD a SD podmínky. Z nich bylo vybráno pouze 5 pro podrobnou analýzu v této práci: *sosie*, *vrille*, *cuticular protein 8a*, *cuticular protein 8b* a *CG34227*. Navíc byl vybrán gen *G₆P-DH*. Jedná se o gen kódující stejnojmenný protein, glukózo-6-P dehydrogenázu. Tento protein je klíčovým enzymem pentózového cyklu. Na jedné straně katalyzuje produkci pentózy (ribóza je součástí nukleových kyselin) a na straně druhé produkuje redukující ekvivalenty NADPH, jež jsou potřebné pro biosyntézy a detoxifikační reakce (Luzzatto a Battistuzzi, 1985). Glukózo-6-P dehydrogenáza tak představuje klíčový lokus, jež umožňuje přepínat mezi dvěma základními stavy metabolismu: převažující rozkladný metabolismus za převážně oxidačních podmínek při nižší aktivitě enzymu oproti převažujícímu anabolickému metabolismu za převážně redukujících podmínek při vyšší aktivitě enzymu. U mnoha organismů od bakterií až po mnohobuněčné živočichy jsou katabolické a anabolické procesy navzájem odděleny v čase, právě proto že vyžadují rozdílný redoxní stav prostředí (oxidační vs. redukující). Pravděpodobně proto vykazuje exprese genu i enzymatická aktivita *G₆P-DH* silnou denní a zároveň cirkadiánní rytmicitu (Peret a Pascal, 1976).

V této práci bude sledována aktivita enzymu a exprese genů v denních časech Zt1, Zt5, Zt9, Zt13, Zt17, Zt21. Tak bude možné pozorovat jejich případnou cykličnost poháněnou fotoperiodou. Dále bude pozorována aktivita enzymu a exprese genů následující den ale již podmínek stálé tmy. Pokud bude některý z genů cyklovat i po zhasnutí, musí být poháněný endogenními hodinami.

5. Cíle práce

Hlavním cílem práce bylo zjistit, zda muška *C. costata* má ve vývojovém stádiu časného 3. larválního instaru již vyvinuté funkční cirkadiánní hodiny. Funkčnost hodin byla posuzována na základě přítomnosti či nepřítomnosti jejich vnějších projevů:

- (1) Rytmičkových denních změn v aktivitě vybraného enzymu;
- (2) Změn v expresi 6 - ti vybraných genů.

Kromě denní rytmičnosti (za podmínek střídání světla a tmy) bylo kritickým testem funkčnosti hodin posouzení toho, zdali tyto rytmy nadále (endogenně) pokračují i za cirkadiánních podmínek (stále tmy a konstantní teploty). Informace o funkčnosti či nefunkčnosti cirkadiánních hodin je klíčová pro posouzení role hodin ve fotoperiodické indukci diapauzy. Časný 3. larvální instar je totiž maximálně citlivý k fotoperiodickému signálu.

6. Metodika

Pro experiment byly použity tři dny staré larvy třetího instaru octomilky *Chymomyza costata*, divoký kmen (*wt*). Toto vývojové stádium je maximálně citlivé k fotoperiodickému signálu a má tedy plně funkční fotoperiodický kalendář. Odchov larev proběhl z dospělých octomilek chovaných za podmínek: LD (16L:8D), 18°C. Vylíhlé larvy pak byly přeneseny do podmínek SD (12L:12D), (indukce diapauzy), 18°C. Larvy byly krmeny dietou složenou z ječného sladu, kukuřičného šrotu, sušených kvasinek, agaru, vody a parabenu (methyl-4-hydroxybenzoát). Před samotným experimentem proběhla synchronizace stáří (3. instar) a velikosti larev (cca 1 g). Po synchronizaci bylo nutné nechat larvy ještě tři dny stárnout až do jejich max. fotosensitivního stádia. Připravené synchronizované larvy byly samplovány (odběr vzorku) v různých denních i nočních časech. Nejdříve byly larvy samplovány za normálního dne a noci (Zt časy). Tak můžeme sledovat rytmy poháněné vnějšími faktory tzv. Zeitgebery. Dále byl larvám nastolen subjektivní den i noc a to tím, že byl odpojen signál Zeitgeberu, v tomto případě světelný signál (Ct časy). Tak můžeme sledovat rytmy endogenní.

6.1 Měření enzymatické aktivity Glukózo-6-fosfát-dehydrogenázy

Larvy byly samplovány do tekutého dusíku v časech Zt2, Zt8, Zt14, Zt20 (Zeitgeber časy) a Ct2, Ct8, Ct14, Ct20 (cirkadiánní časy) po 8 jedincích ve třech opakováních. Po odpaření dusíku byly uloženy do -80°C.

Měření aktivity bylo provedeno dle následujícího protokolu:

6.1.1 Enzymatická aktivita G₆P-DH

Chemikálie:

Homogenizační pufr (HP): 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 (0,265 g Tris + 0,44 g Tris HCl ve 100 ml H₂O) + 200 mM sacharóza (m.w. 342,30; 6,846 g ve 100 ml H₂O)

Reakční směs (RS): 20 mM imidazol-HCl (0,170 g ve 100 ml H₂O) + 6,25 mM MgSO₄ (0,154 g ve 100 ml H₂O) + nastavit pH na 7,2 pomocí 1N HCl + 30 mM NADP (m.w. 765,4 → 23,1 mg/1 ml) + 25 mM glukózo-6-fosfát (m.w. 282,12 → 70,5 mg/10 ml, 14,1 mg/2 ml)

- 1) odeber 8 larev do tekutého dusíku do 1,5 ml zkumavky
- 2) po odpaření dusíku ulož do -80°C
- 3) rozpust na ledu, přidej 600 µl ledově nachlazeného HP a homogenizuj pomocí DISPO
- 4) vlož do centrifugy, 22 000 g/20 min/20°C
- 5) odeber 400 µl infranatantu (zdroj glykolytických enzymů)
- 6) odeber 5 µl infranatantu pro změření celkového množství proteinů BCA analýzou
- 7) udělej aliquoty 2 x 25 µl + zbytek a ulož do -80°C

Měření

- 1) postupně přidej do kyvety (0,5 ml)
 - 400 µl RS
 - 10 µl 30 mM NADP
 - 30 µl HP
 - 40 µl vzorku
- 2) změř aktivitu pozadí
- 3) přidej 20 µl 25 mM glukózo-6-fosfát
- 4) změř aktivitu G₆P-DH

6.2 RNA seq analýza (výběr genů)

RNA seq analýza je samostatná, nezávislá a zároveň globální studie transkriptomu. U *C. costata* je prozatím osekvenováno cca 21 000 transkriptů. Z této studie vyplývá, že existují stovky různých genů, které vykazují mírný rozdíl v hladině mRNA mezi dnem (Zt1) a nocí (Zt17). Jde respektive o čas hodinu po rozsvícení a hodinu po zhasnutí světla (závislost na délce fotoperiody). Konkrétní rozdíl je o rozdíl 270 transkriptů za dlouhého dne (Zt17) a 110 transkriptů za krátkého dne (Zt13). U larev *C. costata* bylo nalezeno pouze 23 transkriptů společných pro krátký i dlouhý den. Z těchto 23 bylo vybráno pouze 5, které vykazovaly nejvyšší rozdíl. U vybraných genů bylo ověřeno, zdali existuje rytmus v jejich transkripci nebo ne. A to:

- (1) za podmínek střídání dne a noci (rytmus exogenně poháněný Zeitgebery);
- (2) za podmínek stálé tmy (rytmus poháněný endogenně).

6.3 Exprese genů

Larvy byly samplovány do RibozoluTM v časech Zt1, Zt5, Zt9, Zt13, Zt17, Zt21 (Zeitgeber časy) a Ct1, Ct5, Ct9, Ct13, Ct17, Ct21 (cirkadiánní časy) po 5 jedincích ve třech opakováních. Pak uloženo do -80°C.

Sledování exprese genů proběhlo dle těchto protokolů:

6.3.1 Celková izolace RNA pomocí Ribozolu, Amresco

Chemikálie: Ribozol, chloroform, isopropanol, DEPC H₂O, 75% EtOH v DEPC H₂O

- 1) odeber 5 larev do 400 µl ledově chladného Ribozolu
- 2) ulož do -80°C
- 3) vše vyčisti, připrav si box s ledem, nachlad' centrifugu, používej pouze RNA pipety a zkumavky
- 4) rozpust vzorky na ledu, řádně homogenizuj pomocí sterilní paličky baterií poháněným homogenizátorem (mezi každým vzorkem vyměň homogenizační paličku)
- 5) přidej 600 µl Ribozolu, promíchej pomocí vortexu, stoč
- 6) po dobu 5 min nech při pokojové teplotě, každou 1-2 vortex
- 7) přidej 200 µl chloroformu, silně protřepej po dobu 15 s, pak vortex
- 8) po dobu 5 min nech při pokojové teplotě, dvě fáze se jasně rozdělí
- 9) připrav si 1,5 ml zkumavku s 400 µl isopropanolu, dej na led
- 10) po rozdělení dvou fází a interfáze dej do centrifugy na 12 000g/15 min/4°C
- 11) odeber přesně 2 x 200 µl horní bezbarvé vodné fáze do připravených zkumavek s isopropanolem (neporuš interfázi- obsahuje genomickou DNA)
- 12) nech srážet na ledu po dobu 30 min
- 13) dej do centrifugy 22 000g/20 min/4°C, pak vylíj všechn isopropanol
- 14) promyj vzniklou peletu 500 µl 75% EtOH v DEPC H₂O (-20°C) a jemně promíchej obracením
- 15) dej do centrifugy 22 000g/5 min/4°C, odstraň všechnu tekutinu (použij nejdřív 1000 µl pipetu, dej na led, stoč 2 zkumavky najednou a odstraň zbytek tekutiny 20 µl pipetou)
- 16) usuš peletu (5-6 min) na čisté Petriho misce
- 17) rozpust peletu v 15 µl DEPC H₂O, poklepej na zkumavku, stoč 2 x, zahřej na 70°C/5 min, dej na led, poklepej, stoč 2 x
- 18) změř celkovou koncentraci RNA a nařed' na koncentraci 1 µg/ 1 µl

6.3.2 Ošetření DNásou-DNase I. traitement, Ambion

Chemikálie: DEPC H₂O, 10 x DNase pufr, RDNása I, DNase inaktivační reaktant, isopropanol, glykogen, 75% EtOH v DEPC H₂O

- 1) vezmi 5 µl (5 µg) celkové RNA a přidej:
45 µl DEPC H₂O
5,5 µl 10x DNase pufr
1 µl RDNása I
- 2) jemně promíchej a dej inkubovat na 30 min/37°C
- 3) přidej 5,5 µl čerstvě vortexovaného DNase inaktivačního reaktantu, pak vortex
- 4) nech 2 min při pokojové teplotě, 3-4 x vortex v průběhu
- 5) dej do centrifugy 10 000g/2 min/pokojová teplota
- 6) odeber 50 µl supernatantu (RNA) do nové 1,5 ml zkumavky, dej na led, odebrat pouze vodnou fázi → bílé kuličky obsahují gDNA!!!
- 7) přidej 50 µl isopropanolu k RNA
- 8) přidej 1 µl glykogenu a nech srážet na ledu 30 min
- 9) dej do centrifugy 22 000/20 min/4°C, odstraň isopropanol
- 10) promyj vzniklou peletu 500 µl 75% EtOH v DEPC H₂O (-20°C) a jemně promíchej obracením
- 11) dej do centrifugy 22 000g/5 min/4°C, odstraň všechnu tekutinu (použij nejdřív 1000 µl pipetu, dej na led, stoč 2 zkumavky najednou a odstraň zbytek tekutiny 20 µl pipetou)
- 12) usuš peletu (5-6 min) na čisté Petriho misce
- 13) rozpust peletu v 5 µl DEPC H₂O, poklepej na zkumavku, stoč 2 x, zahřej na 70°C/5 min, dej na led, poklepej, stoč 2 x
- 14) použij celý obsah na reverzní transkripci

6.3.3 Reverzní transkripce, Promega

Chemikálie: MgCl₂, 10 x pufr, dNTP mix, RNasin, AMV RT, Oligo (dT)₁₅, DEPC H₂O

- 1) nastav termocyklér (T3000, Biometra) na 70°C
- 2) přenes vzorky ze 1,5 ml zkumavky do PCR zkumavky a zahřej na 5 min/70°C, dej na led, stoč
- 3) připrav si master mix (MM) dle tabulky 1

Tab. 1: Příprava master mixu.

Chemikálie	1 x MM pro jednu reakci (μl)
MgCl ₂	4
10 x pufr	2
dNTP mix	2
RNasin	0,5
AMV RT	0,8
Oligo (dT) ₁₅	1
DEPC H ₂ O	4,7
vzorek	5
celkem	20

- 4) přidej 15 μl MM ke svým vzorkům
- 5) nastav program na cykléru na 45 min/42°C (RT), 5 min/95°C
- 6) dej na led na 5 min, stoč
- 7) nařed' 25 x sterilní H₂O (480 μl do 20 μl vzorku) pro qPCR
- 8) udělej 3 aliquoty po 45 μl + zbytek
- 9) ulož do -80°C

6.3.4 qRT-PCR, Biorad

Chemikálie: iQ SYBR Green Supermix, PCR H₂O, primery

- 1) rozpust aliquoty vzniklé reverzní transkripcí (cDNA) a příprav si iQ mix, primery, vodu
- 2) příprav si master mix dle tabulky 2

Tab. 2: Příprava master mixu pro qPCR reakci.

Chemikálie	1 x MM pro jednu reakci (μl)
iQ SYBR Green Supermix	10
PCR H ₂ O	4,2
primer +	0,4
primer -	0,4
celkem	15

- 3) napipetuj do 96- ti jamkové destičky 5 μl vzorku + 15 μl MM
- 4) přidej fólii (slouží proti odpaření vzorku) a dej do PCR termocykléru (BioRad, CFX96 Thermal Light Cycler)

6.4 Statistické metody

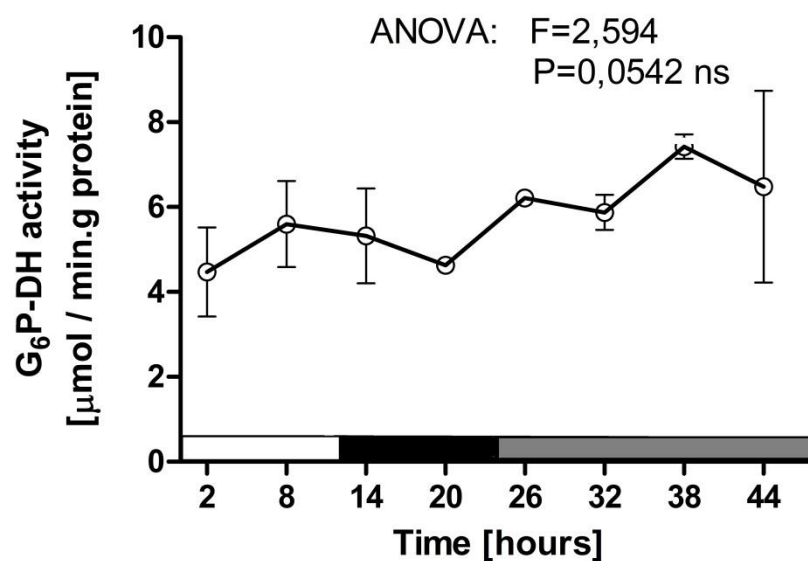
Enzymatická aktivita glukózo-6-fosfát-dehydrogenázy (G₆P-DH) byla vyjádřena v μmolech na mg celkového proteinu (stanovení pomocí BCA metody). Vliv denního a cirkadiánního času byl posuzován pomocí jednocestné ANOVA analýzy a rozdíly mezi jednotlivými časy odběrů byly testovány pomocí následné Bonnferoniho analýzy.

Četnosti mRNA transkriptů šesti cílových genů byly vyjádřeny relativně vůči četnostem mRNA transkriptů dvou různých referenčních genů (*Rp49*, *beta-tubulin*) pomocí Pfafflovy metody (Pfaffl, 2001). Expresse byla normalizována k výchozímu bodu (Zt1, exprese = 1) a násobky exprese v dalších časech byly vyneseny do grafů. Pro statistickou analýzu dat byly násobky exprese transformovány na přirozené logaritmy (log₂). Vliv denního času byl posuzován pomocí jednocestné ANOVA analýzy a rozdíly mezi jednotlivými časy odběrů byly testovány pomocí následné Bonnferoniho analýzy. Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí softwaru GraphPad Prism 5.

7. Výsledky

7.1 Aktivita G₆P-DH

Nebyly zaznamenány žádné statisticky významné rozdíly v aktivitě G₆P-DH v závislosti na denním nebo cirkadiánním čase (Obr. 3).

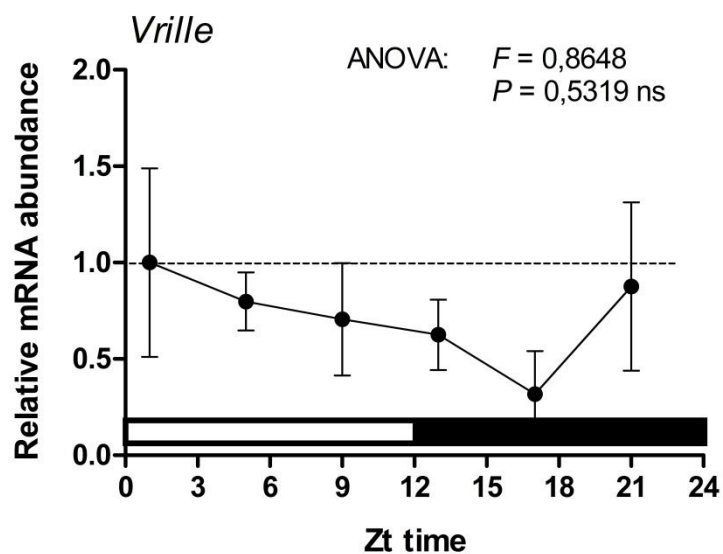


Obr. 3: Aktivita enzymu G₆P-DH v závislosti na denním a cirkadiánním čase. Bílá barva v liště značí světlo, černá tma (teplota 18°C) a šedá barva značí konstantní podmínky (stálá tma a 18°C).

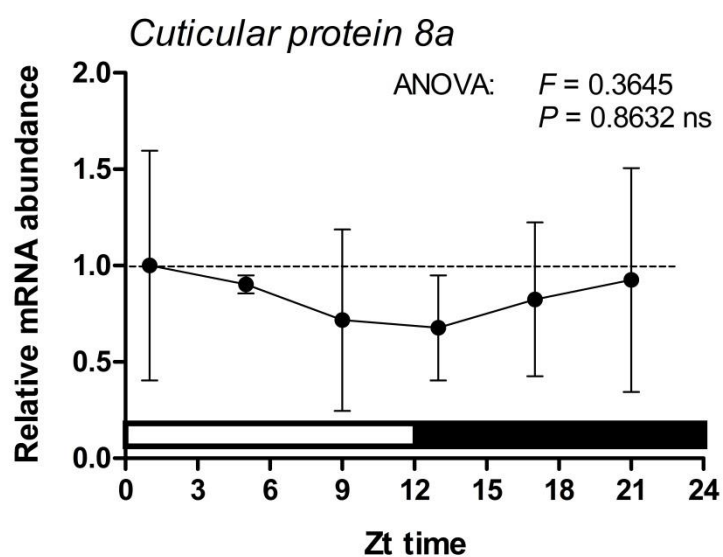
7.2 Exprese genů

Prozatím byly zpracovány pouze vzorky odebrané v Zt (Zeitgeber) časech. Vzorky odebrané v cirkadiánních časech (stálá tma) byly odebrány podle plánu a jsou připraveny k analýze.

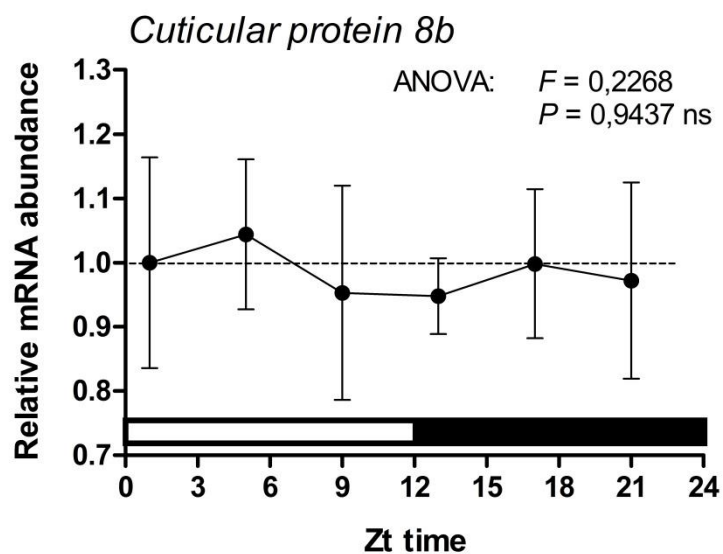
Byly sledovány denní změny v expresi těchto šesti genů: *vriIIe* (obrázek 4), *cuticular protein 8a* (obrázek 5), *cuticular protein 8b* (obrázek 6), *G₆P-DH* (obrázek 7), *CG 34227* (obrázek 8) a *sosie* (obrázek 9).



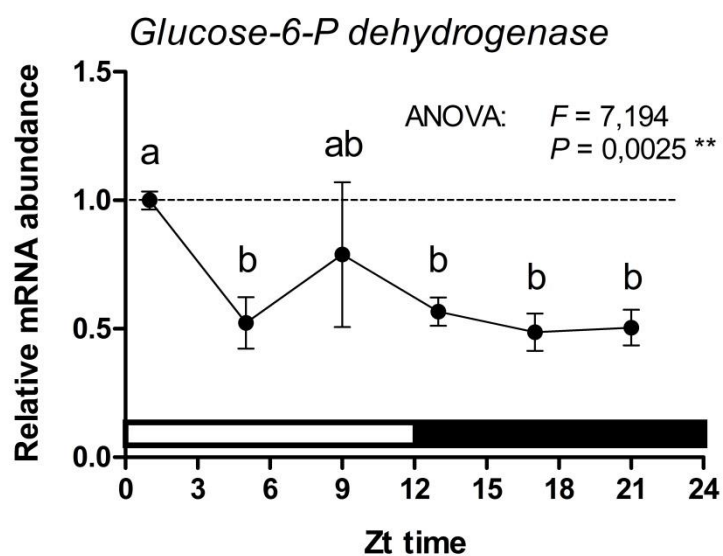
Obr. 4: Závislost relativní četnosti mRNA transkriptů genu *vrille* na vnějším denním fotoperiodickém čase určovaném fotoperiodickým Zeitgeberem. Expresce genu byla měřena v časech Zt1, Zt5, Zt9, Zt13, Zt17 a Zt21. Bílá část lišty značí světlo, černá tmou.



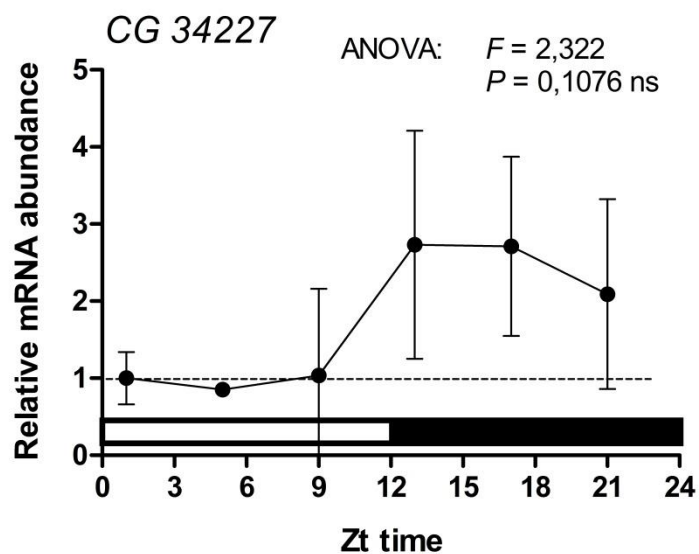
Obr. 5: Závislost relativní četnosti mRNA transkriptů genu *cuticular protein 8a* na vnějším denním fotoperiodickém čase určovaném fotoperiodickým Zeitgeberem. Expresce genu byla měřena v časech Zt1, Zt5, Zt9, Zt13, Zt17 a Zt21. Bílá část lišty značí světlo, černá tmou.



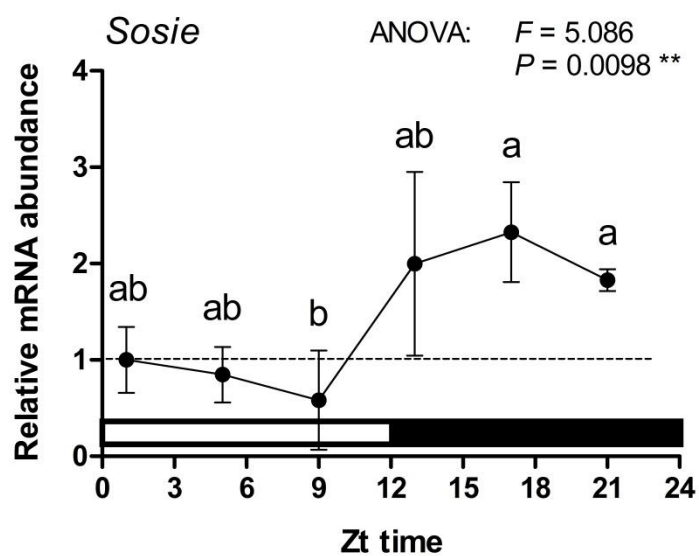
Obr. 6: Závislost relativní četnosti mRNA transkriptů genu *cuticular protein 8b* na vnějším denním fotoperiodickém čase určovaném fotoperiodickým Zeitgeberem. Expres genu byla měřena v časech Zt1, Zt5, Zt9, Zt13, Zt17 a Zt21. Bílá část lišty značí světlo, černá tmou.



Obr. 7: Závislost relativní četnosti mRNA transkriptů genu *G₆P-DH* na vnějším denním fotoperiodickém čase určovaném fotoperiodickým Zeitgeberem. Expres genu byla měřena v časech Zt1, Zt5, Zt9, Zt13, Zt17 a Zt21. Bílá část lišty značí světlo, černá tmou.



Obr. 8: Závislost relativní četnosti mRNA transkriptů genu *CG34227* na vnějším denním fotoperiodickém čase určovaném fotoperiodickým Zeitgeberem. Expresce genu byla měřena v časech Zt1, Zt5, Zt9, Zt13, Zt17 a Zt21. Bílá část lišty značí světlo, černá tmou.



Obr. 9: Závislost relativní četnosti mRNA transkriptů genu *sosie* na vnějším denním fotoperiodickém čase určovaném fotoperiodickým Zeitgeberem. Expresce genu byla měřena v časech Zt1, Zt5, Zt9, Zt13, Zt17 a Zt21. Bílá část lišty značí světlo, černá tmou.

8. Diskuse

8.1 Enzymatická aktivita Glukózo-6-fosfát-dehydrogenázy

Měření aktivity G₆P-DH bylo zvoleno proto, že se jedná o klíčový enzym pentózového cyklu (biosyntéza NADPH, konverze cukrů, biosyntéza ribózy) (Luzzatto a Battistuzzi, 1985). Tento enzym se vyznačuje cirkadiánní aktivitou u mnoha jiných druhů živočichů: jmenovitě například v tukovém tělesu příbuzné octomilky *D. melanogaster* (Xu, K., Zheng, X., & Sehgal, A., 2008), v játrech krysa (Soler et al., 1987) nebo v červených krvinkách člověka (Brok-Simoni, Frida et al., 1976). Dalším důvodem pro zvolení měření aktivity G₆P-DH je fakt, že jde o metodu robustní, rychlou a vcelku nenáročnou na provedení. Přesto, variabilita námi naměřených hodnot (směrodatná odchylka) byla u různých opakování dosti proměnlivá, což negativně ovlivnilo průkaznost našich výsledků. Přesto se dá z výsledků odhadnout, že pokud vůbec u larev existuje nějaká cyklická denní změna v aktivitě G₆P-DH, je jen velmi slabá. Endogenní cyklus aktivity za konstantních podmínek nebyl naznačen vůbec. Tento výsledek naznačuje, že aktivita G₆P-DH není pod kontrolou funkčních cirkadiánních hodin.

8.2 Exprese genů

Dle předběžných výsledků byl pozorován zřetelný denní rytmus v expresi genu *sosie* a velmi podobný rytmus (ovšem statisticky neprůkazný) byl zjištěn rovněž u genu *CG34227*. Oba geny vykazovaly maximum exprese v temné fázi dne a úroveň exprese byla relativně nízká za světla. Ostatní analyzované geny nevykazovaly žádný zřetelný denní rytmus v expresi. Ovšem, posuzujeme naše dosavadní výsledky s určitou rezervou, neboť jsme zjistili, že použitá reverzní transkriptáza AMV (Promega) způsobuje značnou variabilitu v expresních datech. Naše předběžné testy ukázaly, že při použití jiné reverzní transkriptázy, SuperScript III. (Invitrogen) je tato variabilita výrazně potlačena. Proto budou v nejbližší době zopakovány všechny analýzy exprese vybraných genů na vzorcích celkové RNA, která bude přepsána na cDNA pomocí již zmíněné transkriptázy SS III. Zároveň budou také zanalyzovány případné endogenní (cirkadiánní) rytmy za podmínek stálé tmy.

Teprve tyto výsledky nám umožní uzavřít celou práci odpovědí na otázkou položenou v cílech práce.

Geny *sosie* a *CG34227* se jeví jako vhodní kandidáti pro testování vlivu endogenního komponentu biologických hodin larev za podmínek stálé tmy. Budou se tedy dát použít jako vhodné markery funkčních biologických hodin. Gen *CG34227* kóduje neznámý protein a dle získaných informací patří do skupiny sekrečních peptidů (Liu et al., 2006). Gen *sosie* je též velmi málo prozkoumaným genem. Z dosavadních informací je jeho molekulární funkce neznámá, ale je nejspíše zapojen do biologického procesu vývoje sluchového ústrojí u *D. melanogaster* (Senthilan et al., 2012). Další ze sledovaných genů byl gen *vrille*, který patří mezi hodinové geny u *D. melanogaster* (Blau a Young, 1999). Rovněž u tohoto genu je naznačeno (Obr. 4) snížení relativní četnosti mRNA transkriptů genu v čase Zt17. Výsledek sice není statisticky významný, ale i tento gen by mohl být jedním z markerů funkčních cirkadiálních hodin.

Výsledky této práce, ačkoli dosud předběžné, zapadají do celkově slabé povahy rytmičnosti u larvy *C. costata*, tak, jak jí popisují naše dřívější nebo nepublikované výsledky. Například, hodinové geny centrálního pacemakeru v mozku larev vykazují pouze velmi slabé (*tim*, *per*, *cry*) nebo žádné (dalších 14 genů) denní rytmy v expresi (Pavelka et al., 2003; Stehlík et al., 2008; Košťál a Schöttner, nepublikované výsledky). Ani slabě rytmický hodinový gen *tim* nevykazuje žádnou endogenní rytmicitu za stálých podmínek (Stehlík et al., 2008). Přitom rytmičnost těchto kanonicky hodinových genů by měla teoreticky podmiňovat jakékoli další podřízené rytmické projevy. V souladu s tím, ani pozorování těchto podřízených projevů nepřineslo dosud žádný jasný důkaz o funkčnosti cirkadiálních hodin u larev *C. costata*. Například, v CNS larev není pozorovatelný žádný denní rytmus v buněčném cyklu (Košťál et al., 2009). Nebyla nalezena žádná nebo jen téměř neměřitelně slabá denní rytmicita v lokomoční aktivitě či denní rytmicitě rychlosti metabolismu (respiraci) (Schöttner, nepublikované výsledky). Všechny tyto poznatky dohromady naznačují, že fotoperiodicky citlivé larvy *C. costata* (neboli larvy s plně funkčním sezónním kalendářem) **nemají** funkční cirkadiální hodiny. Tento fakt si vysvětlujeme tak, že larvy žijí v poměrně konstantním prostředí,

nejpravděpodobněji pod kůrou padlých lesních stromů, kde se žíví odumřelým lýkem a houbovými hyfami na něm rostoucím. Nejsou tedy vystaveny dramatickým výkyvům světelných a tepelných podmínek. Naproti tomu dospělá stádia *C. costata* již žijí v otevřeném prostoru. Žíví se patrně na květech, jsou vystaveny denním cyklům počasí a **mají** již plně vyvinuté cirkadiánní hodiny (Lankinen and Riihimaa, 1997; Košťál, nepublikovaná data). Dospělci ovšem nevykazují žádnou citlivost vůči fotoperiodickému signálu. Dá se tedy předpokládat, že se funkční centrální pacemaker postupně vyvíjí během ontogeneze. V larválním stádiu jsou již sice exprimovány v mozku larev "hodinové geny", jako je *tim* a další, ale tyto ještě nezakládají funkční hodinový mechanismus, nýbrž zajišťují funkci sezónního kalendáře.

Naše výsledky tedy mohou významně přispět k debatě o funkční provázanosti centrálního cirkadiánního pacemakeru a sezónního fotoperiodického kalendáře u hmyzu. Zdá se, že pro fungování fotoperiodického kalendáře může být klíčově potřebná regulovaná exprese genu *tim* a jeho produktu TIM ve specializovaných neuronech (Stehlík et al., 2008), ale není požadována funkčnost hodinového mechanismu jako takového. Tento funkční mechanismus se může objevovat až později v ontogenezi spolu s rostoucí komplexitou neuronální sítě a se změnami v její organizaci.

9. Závěry

- Cíle práce se podařilo splnit pouze částečně, všechny vzorky byly odebrány a zpracovány podle plánu, ale analýzy exprese vybraných genů budou zopakovány po reverzní transkripci s novou transkriptázou SuperScript III.
- Aktivita enzymu glukóza-6-P dehydrogenázy nevykazuje žádnou statisticky významnou denní nebo cirkadiánní rytmicitu.
- Dva z vybraných genů, *sosie* a *CG34227*, vykazují poměrně zřetelné rozdíly v expresi mezi dnem a nocí. Další 4 geny takové rozdíly nevykazují. Endogenní rytmicita kandidátních genů bude analyzována v nejbližších dnech.

10. Literatura

Agui, N., Granger, N. A., Gilbert, L. I., & Bollenbacher, W. E. (1979). Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormone: in vitro assay of a single neurosecretory cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(11), 5694-5698.

Allada, R., White, N. E., So, W. V., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1998). A mutant *Drosophila* homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless. *Cell*, 93(5), 791-804.

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

Antoch, M. P., Song, E. J., Chang, A. M., Vitaterna, M. H., Zhao, Y., Wilsbacher, L. D., ... & Takahashi, J. S. (1997). Functional Identification of the Mouse Circadian Clock Gene by Transgenic BAC Rescue. *Cell*, 89(4), 655-667.

Bargiello, T. A., Jackson, F. R., & Young, M. W. (1984). Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in *Drosophila*.

Blanchardon, E., Grima, B., Klarsfeld, A., Chélot, E., Hardin, P. E., Prémat, T., & Rouyer, F. (2001). Defining the role of *Drosophila* lateral neurons in the control of circadian rhythms in motor activity and eclosion by targeted genetic ablation and PERIOD protein overexpression. *European Journal of Neuroscience*, 13(5), 871-888.

Baumeister, R., Schaffitzel, E., & Hertweck, M. (2006). Endocrine signaling in *Caenorhabditis elegans* controls stress response and longevity. *Journal of endocrinology*, 190(2), 191-202.

Beck, S. D. (1962). Temperature effects on insects: relation to periodism. In *Proceedings of the North Central Branch, Entomological Society of America* (Vol. 17, pp. 18-19).

Blau, J., & Young, M. W. (1999). Cycling *vrille* expression is required for a functional *Drosophila* clock. *Cell*, 99(6), 661-671.

Bowen, M. F., Bollenbacher, W. E., & Gilbert, L. I. (1984). In vitro studies on the role of the brain and prothoracic glands in the pupal diapause of *Manduca sexta*. *Journal of experimental biology*, 108(1), 9-24.

Bradshaw, W., & Holzapfel, C. (2007). Tantalizing timeless. *Science*, 316(5833), 1851-1852.

Bradshaw, W. E., & Holzapfel, C. M. (2010). What season is it anyway? Circadian tracking vs. photoperiodic anticipation in insects. *Journal of Biological Rhythms*, 25(3), 155-165.

- Bradshaw, W. E., Holzapfel, C. M., & Davison, T. E. (1998). Hourglass and rhythmic components of photoperiodic time measurement in the pitcher plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *Oecologia*, *117*(4), 486-495.
- Brok-Simoni, F., Ashkenazi, Y. E., Ramot, B., & Holtzman, F. (1976). The diurnal rhythm of enzymes in human red cells. *British journal of haematology*, *32*(4), 601-608.
- Brown, M. R., Graf, R., Swiderek, K. M., Fendley, D., Stracker, T. H., Champagne, D. E., & Lea, A. O. (1998). Identification of a steroidogenic neurohormone in female mosquitoes. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(7), 3967-3971.
- Bünning, E. (1936). Die endogene Tagesrhythmik als Grundlage der photoperiodischen Reaktion. *Ber. dtsch. Botan. Ges.*, *54*, 590-607.
- Bünning, E. (1960). Circadian rhythms and time measurement in photoperiodism. *Co/d. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, *25*, 249-256.
- Bünning, E., (1969). Common features of photoperiodism in plants and animals. *Photochemistry and Photobiology* *9*, 219–228.
- Ceriani, M. F., Darlington, T. K., Staknis, D., Más, P., Petti, A. A., Weitz, C. J., & Kay, S. A. (1999). Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science*, *285*(5427), 553-556.
- Cheng, W. N., Li, X. L., Yu, F. E. N. G., Li, Y. P., Li, J. J., & Wu, J. X. (2009). Proteomic analysis of pre-diapause, diapause and post-diapause larvae of the wheat blossom midge, *Sitodiplosis mosellana* (Diptera: Cecidomyiidae). *Eur J Entomol*, *106*, 29-35.
- Cheng, Y., & Hardin, P. E. (1998). *Drosophila* photoreceptors contain an autonomous circadian oscillator that can function without period mRNA cycling. *The Journal of neuroscience*, *18*(2), 741-750.
- Claret, J., & Volkoff, N. (1992). Vitamin A is essential for two processes involved in the photoperiodic reaction in *Pieris brassicae*. *Journal of insect physiology*, *38*(8), 569-574.
- Codd, V., Dolezel, D., Stehlik, J., Piccin, A., Garner, K. J., Racey, S. N., ... & Rosato, E. (2007). Circadian rhythm gene regulation in the housefly *Musca domestica*. *Genetics*, *177*(3), 1539-1551.
- Collins, B. H., Dissel, S., Gaten, E., Rosato, E., & Kyriacou, C. P. (2005). Disruption of Cryptochrome partially restores circadian rhythmicity to the arrhythmic period mutant of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(52), 19021-19026.

- Curtin, K. D., Huang, Z. J., & Rosbash, M. (1995). Temporally regulated nuclear entry of the *Drosophila* period protein contributes to the circadian clock. *Neuron*, *14*(2), 365-372.
- Cyran, S. A., Buchsbaum, A. M., Reddy, K. L., Lin, M. C., Glossop, N. R., Hardin, P. E., ... & Blau, J. (2003). vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, *112*(3), 329-341.
- Danilevskii, A. S. (1965). Photoperiodism and seasonal development of insects. *Photoperiodism and seasonal development of insects*.
- Danks, H. V. (1987). *Insect dormancy: an ecological perspective* (Vol. 1, pp. 439-439). Biological Survey of Canada (Terrestrial Artropods).
- Danks, H. V. (Ed.). (1994). *Insect life-cycle polymorphism: theory, evolution and ecological consequences for seasonality and diapause control* (Vol. 52). Springer Science & Business Media.
- Danks, H. V. (2005). How similar are daily and seasonal biological clocks?. *Journal of insect physiology*, *51*(6), 609-619.
- Darlington, T. K., Wager-Smith, K., Ceriani, M. F., Staknis, D., Gekakis, N., Steeves, T. D., ... & Kay, S. A. (1998). Closing the circadian loop: CLOCK-induced transcription of its own inhibitors per and tim. *Science*, *280*(5369), 1599-1603.
- Denlinger, D. L. (1972). Induction and termination of pupal diapause in *Sarcophaga* (Diptera: Sarcophagidae). *The Biological Bulletin*, *142*(1), 11-24.
- Denlinger, D. L. (1986). Dormancy in tropical insects. *Annual review of entomology*, *31*(1), 239-264.
- Denlinger, D. L. (2000). Molecular regulation of insect diapause. *Environmental Stressors and Gene Responses*, 259-275.
- Denlinger, D. L. (2002). Regulation of diapause. *Annual review of entomology*, *47*(1), 93-122.
- Denlinger, D. L., Yocum, G. D., & Rinehart, J. P. (2004). Hormonal control of diapause. *Comprehensive Insect Molecular Science*, *3*, 615-650.
- Dingle, H. (1972). Migration strategies of insects. *Science*, *175*(4028), 1327-1335.
- Dubruille, R., & Emery, P. (2008). A plastic clock: how circadian rhythms respond to environmental cues in *Drosophila*. *Molecular neurobiology*, *38*(2), 129-145.
- Dumortier, B., & Brunnarius, J. (1989). Diet-dependent switch from circadian to hourglass-like operation of an insect photoperiodic clock. *Journal of biological rhythms*, *4*(4), 481-490.

- Dunlap, J. C. (1996). Genetic and molecular analysis of circadian rhythms. *Annual review of genetics*, 30(1), 579-601.
- Dunlap, J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2), 271-290.
- Ederly, I., Zwiebel, L. J., Dembinska, M. E., & Rosbash, M. (1994). Temporal phosphorylation of the *Drosophila* period protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(6), 2260-2264.
- Emerson, K. J., Bradshaw, W. E., & Holzapfel, C. M. (2010). Microarrays reveal early transcriptional events during the termination of larval diapause in natural populations of the mosquito, *Wyeomyia smithii*. *PLoS One*, 5(3), e9574.
- Emery, P., So, W. V., Kaneko, M., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1998). CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell*, 95(5), 669-679.
- Emery, P., Stanewsky, R., Helfrich-Förster, C., Emery-Le, M., Hall, J. C., & Rosbash, M. (2000). *Drosophila* CRY is a deep brain circadian photoreceptor. *Neuron*, 26(2), 493-504.
- Fielenbach, N., & Antebi, A. (2008). *C. elegans* dauer formation and the molecular basis of plasticity. *Genes & development*, 22(16), 2149-2165.
- Flanagan, R. D., Tammariello, S. P., Joplin, K. H., Cikra-Ireland, R. A., Yocum, G. D., & Denlinger, D. L. (1998). Diapause-specific gene expression in pupae of the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(10), 5616-5620.
- Gao, N., von Schantz, M., Foster, R. G., & Hardie, J. (1999). The putative brain photoperiodic photoreceptors in the vetch aphid, *Megoura viciae*. *Journal of insect physiology*, 45(11), 1011-1019.
- Garner, W. W., & Allard, H. A. (1920). Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants.
- Gekakis, N., Saez, L., Delahaye-Brown, A. M., Myers, M. P., Sehgal, A., Young, M. W., & Weitz, C. J. (1995). Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL. *Science*, 270(5237), 811-815.
- Gibbs, D. (1975). Reversal of pupal diapause in *Sarcophaga argyrostoma* by temperature shifts after puparium formation. *Journal of insect physiology*, 21(6), 1179-1186.
- Giebultowicz, J. M. (1999). Insect circadian clocks: is it all in their heads?. *Journal of insect physiology*, 45(9), 791-800.

- Giebultowicz, J. M. (2000). Molecular mechanism and cellular distribution of insect circadian clocks. *Annual review of entomology*, 45(1), 769-793.
- Giebultowicz, J. M. (2001). Peripheral clocks and their role in circadian timing: insights from insects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 356(1415), 1791-1799.
- Goto, S. G., & Numata, H. (2009). Possible involvement of distinct photoreceptors in the photoperiodic induction of diapause in the flesh fly *Sarcophaga similis*. *Journal of insect physiology*, 55(5), 401-407.
- Goto, S. G., Shiga, S., & Numata, H. (2010). Photoperiodism in insects: perception of light and the role of clock genes. *Photoperiodism: The Biological Calendar*, 258-286.
- Grima, B., Chélot, E., Xia, R., & Rouyer, F. (2004). Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the *Drosophila* brain. *Nature*, 431(7010), 869-873.
- Hackman, W., Lakovaara, S., Saura, A., Sorsa, M., & Vepsäläinen, K. (1970). On the biology and karyology of *Chymomyza costata* Zetterstedt, with reference to the taxonomy and distribution of various species of *Chymomyza* (Diptera, Drosophilidae). *Suom Hyonteistieteellinen Aikak Ann Entomol Fenn*.
- Hall, J. C. (2000). Cryptochromes: sensory reception, transduction, and clock functions subserving circadian systems. *Current opinion in neurobiology*, 10(4), 456-466.
- Hall, J. C. (2003). Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila* and other insects. *Advances in genetics*, 48, 1-280.
- Hardie, J. (1990). The photoperiodic counter, quantitative day-length effects and scotophase timing in the vetch aphid *Megoura viciae*. *Journal of Insect Physiology*, 36(12), 939-949.
- Hardin, P. E., Hall, J. C., & Rosbash, M. (1990). Feedback of the *Drosophila* period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*, 343(6258), 536-540.
- Hardin, P. E. (1994). Analysis of period mRNA cycling in *Drosophila* head and body tissues indicates that body oscillators behave differently from head oscillators. *Molecular and cellular biology*, 14(11), 7211-7218.
- Hamanaka, Y., Numata, H., & Shiga, S. (2004). Morphology and electrophysiological properties of neurons projecting to the retrocerebral complex in the blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Cell and tissue research*, 318(2), 403-418.
- Hasegawa, K., & Shimizu, I. (1987). In vivo and in vitro photoperiodic induction of diapause using isolated brain-suboesophageal ganglion complexes of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of insect physiology*, 33(12), 959-966.

- Hasegawa, K., & Shimizu, I. (1988). Occurrence of retinal and 3-hydroxyretinal in a possible photoreceptor of the silkworm brain involved in photoperiodism. *Experientia*, 44(1), 74-76.
- Helfrich-Förster, C. (2001). The locomotor activity rhythm of *Drosophila melanogaster* is controlled by a dual oscillator system. *Journal of Insect Physiology*, 47(8), 877-887.
- Helfrich-Förster, C. (2002). The circadian system of *Drosophila melanogaster* and its light input pathways. *Zoology*, 105(4), 297-312.
- Helfrich-Förster, C. (2005). Neurobiology of the fruit fly's circadian clock. *Genes, Brain and Behavior*, 4(2), 65-76.
- Helfrich-Förster, C. (2009). Does the morning and evening oscillator model fit better for flies or mice?. *Journal of biological rhythms*, 24(4), 259-270.
- Helfrich-Förster, C., Winter, C., Hofbauer, A., Hall, J. C., & Stanewsky, R. (2001). The circadian clock of fruit flies is blind after elimination of all known photoreceptors. *Neuron*, 30(1), 249-261.
- Hodková, M. (1976). Nervous inhibition of corpora allata by photoperiod in *Pyrrhocoris apterus*.
- Hodková, M., Okuda, T., & Wagner, R. (1996). Stimulation of corpora allata by extract from neuroendocrine complex; comparison of reproducing and diapausing *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *European Journal of Entomology*, 93, 535-544.
- Homberg, U., Würden, S., Dirksen, H., & Rao, K. R. (1991). Comparative anatomy of pigment-dispersing hormone-immunoreactive neurons in the brain of orthopteroïd insects. *Cell and Tissue Research*, 266(2), 343-357.
- Hyun, S., Lee, Y., Hong, S. T., Bang, S., Paik, D., Kang, J., ... & Kim, J. (2005). *Drosophila* GPCR Han is a receptor for the circadian clock neuropeptide PDF. *Neuron*, 48(2), 267-278.
- Jackson, F. R., Schroeder, A. J., Roberts, M. A., McNeil, G. P., Kume, K., & Akten, B. (2001). Cellular and molecular mechanisms of circadian control in insects. *Journal of Insect Physiology*, 47(8), 833-842.
- Jünger, M. A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J. D., Végh, M., Radimerski, T., ... & Hafen, E. (2003). The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *Journal of Biology*, 2(3), 20.
- Kaneko, M., & Hall, J. C. (2000). Neuroanatomy of cells expressing clock genes in *Drosophila*: transgenic manipulation of the period and timeless genes to mark the perikarya of circadian pacemaker neurons and their projections. *Journal of Comparative Neurology*, 422(1), 66-94.

- Khan, M. A., Koopmanschap, A. B., & De Kort, C. A. D. (1983). The relative importance of nervous and humoral pathways for control of corpus allatum activity in the adult Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *General and comparative endocrinology*, 52(2), 214-221.
- Klarsfeld, A., Malpel, S., Michard-Vanhée, C., Picot, M., Chélot, E., & Rouyer, F. (2004). Novel features of cryptochrome-mediated photoreception in the brain circadian clock of *Drosophila*. *The Journal of neuroscience*, 24(6), 1468-1477.
- Kloss, B., Price, J. L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A., Wesley, C. S., & Young, M. W. (1998). The *Drosophila* clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase Iε. *Cell*, 94(1), 97-107.
- Kobelková, A., Bajgar, A., & Doležel, D. (2010). Functional molecular analysis of a circadian clock gene timeless promoter from the Drosophilid fly *Chymomyza costata*. *Journal of biological rhythms*, 25(6), 399-409.
- Kogure, M., (1933). The influence of light and temperature on certain characters of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of the Department of Agriculture, Kyushu Imperial University*, 4(1), 1-93.
- Koh, K., Zheng, X., & Sehgal, A. (2006). JETLAG resets the *Drosophila* circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science*, 312(5781), 1809-1812.
- Komada, S., Kamae, Y., Koyanagi, M., Tatewaki, K., Hassaneen, E., Saifullah, A. S. M., ... & Tomioka, K. (2015). Green-sensitive opsin is the photoreceptor for photic entrainment of an insect circadian clock. *Zoological Letters*, 1(1), 11.
- Konopka, R. J., & Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68(9), 2112-2116.
- Koštál, V., Noguchi, H., Shimada, K., & Hayakawa, Y. (2000). Circadian component influences the photoperiodic induction of diapause in a drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal of insect physiology*, 46(6), 887-896.
- Koštál, V., & Shimada, K. (2001). Malfunction of circadian clock in the non-photoperiodic-diapause mutants of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology*, 47(11), 1269-1274.
- Koštál, V. (2006). Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology*, 52(2), 113-127.
- Koštál, V., Tollarová, M., & Doležel, D. (2008). Dynamism in physiology and gene transcription during reproductive diapause in a heteropteran bug, *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of insect physiology*, 54(1), 77-88.

- Koštál, V., Šimůnková, P., Kobelková, A., & Shimada, K. (2009). Cell cycle arrest as a hallmark of insect diapause: Changes in gene transcription during diapause induction in the drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Insect biochemistry and molecular biology*, *39*(12), 875-883.
- Koštál, V. (2011). Insect photoperiodic calendar and circadian clock: independence, cooperation, or unity?. *Journal of Insect Physiology*, *57*(5), 538-556.
- Krishnan, B., Dryer, S. E., & Hardin, P. E. (1999). Circadian rhythms in olfactory responses of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, *400*(6742), 375-378.
- Kyriacou, C. P., Peixoto, A. A., Sandrelli, F., Costa, R., & Tauber, E. (2008). Clines in clock genes: fine-tuning circadian rhythms to the environment. *Trends in Genetics*, *24*(3), 124-132.
- Lankinen, P., & Riihimaa, A. (1997). Effects of temperature on weak circadian eclosion rhythmicity in *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae). *Journal of insect physiology*, *43*(3), 251-260.
- Lear, B. C., Merrill, C. E., Lin, J. M., Schroeder, A., Zhang, L., & Allada, R. (2005). AG protein-coupled receptor, groom-of-PDF, is required for PDF neuron action in circadian behavior. *Neuron*, *48*(2), 221-227.
- Lee, C., Parikh, V., Itsukaichi, T., Bae, K., & Edery, I. (1996). Resetting the *Drosophila* clock by photic regulation of PER and a PER-TIM complex. *Science*, *271*(5256), 1740-1744.
- Lee, C., Bae, K., & Edery, I. (1999). PER and TIM Inhibit the DNA Binding Activity of a *Drosophila* CLOCK-CYC/DBMAL1 Heterodimer without Disrupting Formation of the Heterodimer: a Basis for Circadian Transcription. *Molecular and cellular biology*, *19*(8), 5316-5325.
- Lees, A. D. (1950). Diapause and photoperiodism in the fruit tree red spider mite (*Metatetranychus ulmi* Koch).
- Lees, A. D. (1955). *The Physiology of Diapause in Arthropods*. Cambridge Monographs Experimental Biology.
- Lees, A. D. (1964). The location of the photoperiodic receptors in the aphid *Megoura viciae* Buckton. *Journal of Experimental Biology*, *41*(1), 119-133.
- Lees, A. D. (1966). The control of polymorphism in aphids. *Advances in Insect Physiology*, *3*, 207-277.
- Lees, A. D. (1973). Photoperiodic time measurement in the aphid *Megoura viciae*. *Journal of Insect Physiology*, *19*(12), 2279-2316.

- Lees, A. D. (1981). Action spectra for the photoperiodic control of polymorphism in the aphid *Megoura viciae*. *Journal of Insect Physiology*, 27(11), 761-771.
- Lewis, R. D., & Saunders, D. S. (1987). A damped circadian oscillator model of an insect photoperiodic clock. I. Description of the model based on a feedback control system. *Journal of theoretical biology*, 128(1), 47-59.
- Lim, C., Chung, B. Y., Pitman, J. L., McGill, J. J., Pradhan, S., Lee, J., ... & Allada, R. (2007). Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in *Drosophila*. *Current Biology*, 17(12), 1082-1089.
- Lin, J. M., Kilman, V. L., Keegan, K., Paddock, B., Emery-Le, M., Rosbash, M., & Allada, R. (2002). A role for casein kinase 2 α in the *Drosophila* circadian clock. *Nature*, 420(6917), 816-820.
- Lin, Y., Stormo, G. D., & Taghert, P. H. (2004). The neuropeptide pigment-dispersing factor coordinates pacemaker interactions in the *Drosophila* circadian system. *The Journal of neuroscience*, 24(36), 7951-7957.
- Liu, F., Baggerman, G., D'hertog, W., Verleyen, P., Schoofs, L., & Wets, G. (2006). In silico identification of new secretory peptide genes in *Drosophila melanogaster*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(3), 510-522.
- Luzzatto, L., & Battistuzzi, G. (1985). Glucose-6-phosphate dehydrogenase. In *Advances in Human Genetics 14* (pp. 217-329). Springer US.
- MacRae, T. H. (2010). Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(14), 2405-2424.
- Marcovitch, S. (1923). Plant lice and light exposure. *Science (New York, NY)*, 58(1513), 537.
- Marcovitch, S. (1924). The migration of the Aphididae and the appearance of the sexual forms as affected by the relative length of daily light exposure. *J. agric. Res*, 27(5), 13-522.
- Martinek, S., Inonog, S., Manoukian, A. S., & Young, M. W. (2001). A role for the segment polarity gene shaggy/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. *Cell*, 105(6), 769-779.
- Masaki, S. (1980). Summer diapause. *Annual Review of Entomology*, 25(1), 1-25.
- Masaki, S., & Kikukawa, S. (1981). The diapause clock in a moth: response to temperature signals. *Biological clocks in seasonal reproductive cycles*, 101-112.
- Matsuo, T., Yamaguchi, S., Mitsui, S., Emi, A., Shimoda, F., & Okamura, H. (2003). Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo. *Science*, 302(5643), 255-259.

- Mertens, I., Vandingenen, A., Johnson, E. C., Shafer, O. T., Li, W., Trigg, J. S., ... & Taghert, P. H. (2005). PDF receptor signaling in *Drosophila* contributes to both circadian and geotactic behaviors. *Neuron*, *48*(2), 213-219.
- Morita, A., & Numata, H. (1997). Role of the neuroendocrine complex in the control of adult diapause in the bean bug, *Riptortus clavatus*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, *35*(3), 347-355.
- Myers, M. P., Wager-Smith, K., Wesley, C. S., Young, M. W., & Sehgal, A. (1995). Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, timeless. *Science*, *270*(5237), 805-808.
- Nelson, R. J., Denlinger, D. L., & Somers, D. E. (Eds.). (2009). *Photoperiodism: the biological calendar*. Oxford University Press.
- Nijhout, H. F. (2003). Development and evolution of adaptive polyphenisms. *Evolution & development*, *5*(1), 9-18.
- Numata, H. (1985). Photoperiodic control of adult diapause in the bean bug, *Riptortus clavatus*. *Memoirs of the Faculty of Science, Kyoto University, Series of Biology*, *10*, 29-48.
- Numata, H., Shiga, S., & Morita, A. (1997). Photoperiodic receptors in arthropods. *Zoological science*, *14*(2), 187-197.
- Park, J. H., & Hall, J. C. (1998). Isolation and chronobiological analysis of a neuropeptide pigment-dispersing factor gene in *Drosophila melanogaster*. *Journal of biological rhythms*, *13*(3), 219-228.
- Park, J. H., Helfrich-Förster, C., Lee, G., Liu, L., Rosbash, M., & Hall, J. C. (2000). Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(7), 3608-3613.
- Pavelka, J., Shimada, K., & Košťál, V. (2003). TIMELESS: a link between fly's circadian and photoperiodic clocks?. *European Journal of Entomology*, *100*(2), 255-266.
- Peng, Y., Stoleru, D., Levine, J. D., Hall, J. C., & Rosbash, M. (2003). *Drosophila* free-running rhythms require intercellular communication. *PLoS biology*, *1*(1), e13.
- Peret, J., Chanez, M., & Pascal, G. (1976). Schedule of protein ingestion and circadian rhythm of certain hepatic enzyme activities involved in glucose metabolism in the rat. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *20*(2), 143-157.
- Peschel, N., Chen, K. F., Szabo, G., & Stanewsky, R. (2009). Light-dependent interactions between the *Drosophila* circadian clock factors cryptochrome, jetlag, and timeless. *Current Biology*, *19*(3), 241-247.

- Petri, B., & Stengl, M. (2001). Phase response curves of a molecular model oscillator: implications for mutual coupling of paired oscillators. *Journal of biological rhythms*, 16(2), 125-141.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45-e45.
- Picot, M., Cusumano, P., Klarsfeld, A., Ueda, R., & Rouyer, F. (2007). Light activates output from evening neurons and inhibits output from morning neurons in the *Drosophila* circadian clock. *PLoS biology*, 5(11), e315.
- Pittendrigh, C. S., & Minis, D. H. (1964). The entrainment of circadian oscillations by light and their role as photoperiodic clocks. *American Naturalist*, 261-294.
- Pittendrigh, C.S. (1966). Circadian oscillation in *Drosophila pseudoobscura* pupae-a model for photoperiodic clock. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 54(4), 275.
- Pittendrigh, C. S., Eichhorn, J. H., Minis, D. H., & Bruce, V. G. (1970). Circadian systems, VI. Photoperiodic time measurement in *Pectinophora gossypiella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 66(3), 758-764.
- Pittendrigh, C. S. (1972). Circadian surfaces and the diversity of possible roles of circadian organization in photoperiodic induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(9), 2734-2737.
- Pittendrigh, C. S., & Daan, S. (1976). A functional analysis of circadian pacemakers in nocturnal rodents. *Journal of Comparative Physiology*, 106(3), 223-252.
- Plautz, J. D., Kaneko, M., Hall, J. C., & Kay, S. A. (1997). Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science*, 278(5343), 1632-1635.
- Poras, M., Baehr, J. C., & Cassier, P. (1983). Control of corpus allatum activity during the imaginal diapause in females of *Locusta migratoria* L. *International journal of invertebrate reproduction*, 6(2), 111-122.
- Raina, A. K., & Menn, J. J. (1987). Endocrine regulation of pheromone production in Lepidoptera. In *Pheromone Biochemistry* (pp. 159-174). Academic Press Orlando, Fla.
- Reddy, A. B., Wong, G. K., O'Neill, J., Maywood, E. S., & Hastings, M. H. (2005). Circadian clocks: neural and peripheral pacemakers that impact upon the cell division cycle. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 574(1), 76-91.

- Renn, S. C., Park, J. H., Rosbash, M., Hall, J. C., & Taghert, P. H. (1999). A pdf neuropeptide gene mutation and ablation of PDF neurons each cause severe abnormalities of behavioral circadian rhythms in *Drosophila*. *Cell*, *99*(7), 791-802.
- Reynolds, J. A., & Hand, S. C. (2009). Embryonic diapause highlighted by differential expression of mRNAs for ecdysteroidogenesis, transcription and lipid sparing in the cricket *Allonemobius socius*. *Journal of Experimental Biology*, *212*(13), 2075-2084.
- Richard, D. S., Watkins, N. L., Serafin, R. B., & Gilbert, L. I. (1998). Ecdysteroids regulate yolk protein uptake by *Drosophila melanogaster* oocytes. *Journal of Insect Physiology*, *44*(7), 637-644.
- Richier, B., Michard-Vanhée, C., Lamouroux, A., Papin, C., & Rouyer, F. (2008). The clockwork orange *Drosophila* protein functions as both an activator and a repressor of clock gene expression. *Journal of biological rhythms*, *23*(2), 103-116.
- Rieger, D., Wülbeck, C., Rouyer, F., & Helfrich-Förster, C. (2009). Period gene expression in four neurons is sufficient for rhythmic activity of *Drosophila melanogaster* under dim light conditions. *Journal of biological rhythms*, *24*(4), 271-282.
- Riihimaa, A.J., Kimura, M.T. (1988). A mutant strain of *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae) insensitive to diapause-inducing action of photoperiod. *Physiological entomology*, *13*(4), 441-445.
- Riihimaa, A.J., Kimura, M.T. (1989). Genetics of the photoperiodic larval diapause in *Chymomyza costata* (Diptera; Drosophilidae). *Hereditas*, *110*(3), 193-200.
- Robich, R. M., Rinehart, J. P., Kitchen, L. J., & Denlinger, D. L. (2007). Diapause-specific gene expression in the northern house mosquito, *Culex pipiens* L., identified by suppressive subtractive hybridization. *Journal of insect physiology*, *53*(3), 235-245.
- Roenneberg, T., Daan, S., & Mrosovsky, M. (2003). The art of entrainment. *Journal of Biological Rhythms*, *18*(3), 183-194.
- Rosato, E., Peixoto, A. A., Costa, R., & Kyriacou, C. P. (1997). Linkage disequilibrium, mutational analysis and natural selection in the repetitive region of the clock gene, period, in *Drosophila melanogaster*. *Genetical research*, *69*(02), 89-99.
- Rosato, E., Tauber, E., & Kyriacou, C. P. (2006). Molecular genetics of the fruit-fly circadian clock. *European journal of human genetics*, *14*(6), 729-738.
- Rubin, E. B., Shemesh, Y., Cohen, M., Elgavish, S., Robertson, H. M., & Bloch, G. (2006). Molecular and phylogenetic analyses reveal mammalian-like clockwork in the honey bee (*Apis mellifera*) and shed new light on the molecular evolution of the circadian clock. *Genome Research*, *16*(11), 1352-1365.

- Rutila, J. E., Suri, V., Le, M., So, W. V., Rosbash, M., & Hall, J. C. (1998). CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell*, *93*(5), 805-814.
- Sabrosky, C. W., Larson, I., & Nabours, R. K. (1933). Experiments with light upon reproduction, growth and diapause in grouse locusts (Acrididae, Tetriginae). *Transactions of the Kansas Academy of Science (1903)*, 298-300.
- Saez, L., & Young, M. W. (1996). Regulation of nuclear entry of the *Drosophila* clock proteins period and timeless. *Neuron*, *17*(5), 911-920.
- Sathyanarayanan, S., Zheng, X., Xiao, R., & Sehgal, A. (2004). Posttranslational regulation of *Drosophila* PERIOD protein by protein phosphatase 2A. *Cell*, *116*(4), 603-615.
- Sato, Y., Ikeda, M., & Yamashita, O. (1994). Neurosecretory cells expressing the gene for common precursor for diapause hormone and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in the suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*. *General and comparative endocrinology*, *96*(1), 27-36.
- Sauman, I., & Reppert, S. M. (1996). Circadian clock neurons in the silkworm *Antheraea pernyi*: novel mechanisms of period protein regulation. *Neuron*, *17*(5), 889-900.
- Sauman, I., & Reppert, S. M. (1996). Molecular characterization of prothoracicotropic hormone (PTTH) from the giant silkworm *Antheraea pernyi*: developmental appearance of PTTH-expressing cells and relationship to circadian clock cells in central brain. *Developmental biology*, *178*(2), 418-429.
- Saunders, D. S. (1968). Photoperiodism and time measurement in the parasitic wasp, *Nasonia vitripennis*. *Journal of Insect Physiology*, *14*(4), 433-450.
- Saunders, D. S. (1971). The temperature-compensated photoperiodic clock 'programming' development and pupal diapause in the flesh-fly, *Sarcophaga argyrostoma*. *Journal of insect Physiology*, *17*(5), 801-812.
- Saunders, D. S. (1973). Thermoperiodic control of diapause in an insect: theory of internal coincidence. *Science*, *181*(4097), 358-360.
- Saunders, D. S. (1973). The photoperiodic clock in the flesh-fly, *Sarcophaga argyrostoma*. *Journal of Insect Physiology*, *19*(10), 1941-1954.
- Saunders, D. S. (1975). Spectral sensitivity and intensity thresholds in *Nasonia* photoperiodic clock. *Nature* *233*, 732-734.
- Saunders, D. S. (1978). An experimental and theoretical analysis of photoperiodic induction in the flesh-fly, *Sarcophaga argyrostoma*. *Journal of comparative physiology*, *124*(1), 75-95.

- Saunders, D. S. (1981). Insect photoperiodism—the clock and the counter: a review. *Physiological Entomology*, 6(1), 99-116.
- Saunders, D. S. (1992). The photoperiodic clock and “counter” in *Sarcophaga argyrostoma*: experimental evidence consistent with “external coincidence” in insect photoperiodism. *Journal of Comparative Physiology A*, 170(1), 121-127.
- Saunders, D. S. (2002). *Insect clocks*, 3rd ed. Elsevier.p. 560
- Saunders, D. S. (2005). Erwin Bünning and Tony Lees, two giants of chronobiology, and the problem of time measurement in insect photoperiodism. *Journal of insect physiology*, 51(6), 599-608.
- Saunders, D. (2008). Photoperiodism in insects and other animals. In *Photobiology* (pp. 389-416). Springer New York.
- Saunders, D. S. (2009). Circadian rhythms and the evolution of photoperiodic timing in insects. *Physiological Entomology*, 34(4), 301-308.
- Saunders, D. S. (2010). Photoperiodism in insects: migration and diapause responses. *Photoperiodism: the biological calendar*, 218-257.
- Saunders, D. S. (2010). Controversial aspects of photoperiodism in insects and mites. *Journal of insect physiology*, 56(11), 1491-1502.
- Saunders, D. S., & Cymborowski, B. (1996). Removal of optic lobes of adult blow flies (*Calliphora vicina*) leaves photoperiodic induction of larval diapause intact. *Journal of insect physiology*, 42(8), 807-811.
- Saunders, D. S., Henrich, V. C., & Gilbert, L. I. (1989). Induction of diapause in *Drosophila melanogaster*: photoperiodic regulation and the impact of arrhythmic clock mutations on time measurement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(10), 3748-3752.
- Saunders, D. S., & Lewis, R. D. (1987a). A damped circadian oscillator model of an insect photoperiodic clock: II. Simulations of the shapes of the photoperiodic response curves. *Journal of theoretical biology*, 128(1), 61-71.
- Saunders, D. S., & Lewis, R. D. (1987b). A damped circadian oscillator model of an insect photoperiodic clock: III. Circadian and “hourglass” responses. *Journal of Theoretical Biology*, 128(1), 73-85.
- Saunders, D. S., Lewis, R. D., & Warman, G. R. (2004). Photoperiodic induction of diapause: opening the black box. *Physiological Entomology*, 29(1), 1-15.

- Senthilan, P. R., Piepenbrock, D., Ovezmyradov, G., Nadrowski, B., Bechstedt, S., Pauls, S., ... & Göpfert, M. C. (2012). *Drosophila* auditory organ genes and genetic hearing defects. *Cell*, *150*(5), 1042-1054.
- Schneider, N. L., & Stengl, M. (2005). Pigment-dispersing factor and GABA synchronize cells of the isolated circadian clock of the cockroach *Leucophaea maderae*. *The Journal of neuroscience*, *25*(21), 5138-5147.
- Shafer, O. T., Kim, D. J., Dunbar-Yaffe, R., Nikolaev, V. O., Lohse, M. J., & Taghert, P. H. (2008). Widespread receptivity to neuropeptide PDF throughout the neuronal circadian clock network of *Drosophila* revealed by real-time cyclic AMP imaging. *Neuron*, *58*(2), 223-237.
- Shiga, S., Davis, N. T., & Hildebrand, J. G. (2003). Role of neurosecretory cells in the photoperiodic induction of pupal diapause of the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Journal of Comparative Neurology*, *462*(3), 275-285.
- Shiga, S., & Numata, H. (1996). Effects of compound eye-removal on the photoperiodic response of the band-legged ground cricket, *Pteronemobius nigrofasciatus*. *Journal of Comparative Physiology A*, *179*(5), 625-633.
- Shiga, S., & Numata, H. (2000). The role of neurosecretory neurons in the pars intercerebralis and pars lateralis in reproductive diapause of the blowfly, *Protophormia terraenovae*. *Naturwissenschaften*, *87*(3), 125-128.
- Shiga, S., & Numata, H. (2007). Neuroanatomical approaches to the study of insect photoperiodism†. *Photochemistry and photobiology*, *83*(1), 76-86.
- Shimada, K. (1999). Genetic linkage analysis of photoperiodic clock genes in *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae). *Entomological science*, *2*(4), 575-578.
- Shimizu, I. (1982). Photoperiodic induction in the silkworm, *Bombyx mori*, reared on artificial diet: evidence for extraretinal photoreception. *Journal of Insect Physiology*, *28*(10), 841-846.
- Shimizu, I., Aoki, S., & Ichikawa, T. (1997). Neuroendocrine control of diapause hormone secretion in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of insect physiology*, *43*(12), 1101-1109.
- Shimizu, I., Yamakawa, Y., Shimazaki, Y., & Iwasa, T. (2001). Molecular cloning of *Bombyx* cerebral opsin (Boceropsin) and cellular localization of its expression in the silkworm brain. *Biochemical and biophysical research communications*, *287*(1), 27-34.
- Siegmund, T., & Korge, G. (2001). Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Neurology*, *431*(4), 481-491.

- Sim, C., & Denlinger, D. L. (2008). Insulin signaling and FOXO regulate the overwintering diapause of the mosquito *Culex pipiens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(18), 6777-6781.
- Siwicki, K. K., Eastman, C., Petersen, G., Rosbash, M., & Hall, J. C. (1988). Antibodies to the period gene product of *Drosophila* reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron*, *1*(2), 141-150.
- Skopik, S. D., & Bowen, M. F. (1976). Insect photoperiodism: an hourglass measures photoperiodic time in *Ostrinia nubilalis*. *Journal of comparative physiology*, *111*(3), 249-259.
- Soler, G., Bautista, J. M., Madrid, J. A., & Salido, G. M. (1987). Circadian rhythms in enzymatic activity of rat liver arginase and glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Chronobiologia*, *15*(3), 205-212.
- Southwood, T. R. E. (1962). Migration of terrestrial arthropods in relation to habitat. *Biological reviews*, *37*(2), 171-211.
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wager-Smith, K., Kay, S. A., ... & Hall, J. C. (1998). The cry^b mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell*, *95*(5), 681-692.
- Steel, C. G., & Lees, A. D. (1977). The role of neurosecretion in the photoperiodic control of polymorphism in the aphid *Megoura viciae*. *The Journal of experimental biology*, *67*(1), 117-135.
- Stehlík, J., Závodská, R., Shimada, K., Šauman, I., & Košťál, V. (2008). Photoperiodic induction of diapause requires regulated transcription of timeless in the larval brain of *Chymomyza costata*. *Journal of Biological Rhythms*, *23*(2), 129-139..
- Stoleru, D., Peng, Y., Agosto, J., & Rosbash, M. (2004). Coupled oscillators control morning and evening locomotor behaviour of *Drosophila*. *Nature*, *431*(7010), 862-868.
- Stoleru, D., Peng, Y., Nawathean, P., & Rosbash, M. (2005). A resetting signal between *Drosophila* pacemakers synchronizes morning and evening activity. *Nature*, *438*(7065), 238-242.
- Tanoue, S., Krishnan, P., Krishnan, B., Dryer, S. E., & Hardin, P. E. (2004). Circadian clocks in antennal neurons are necessary and sufficient for olfaction rhythms in *Drosophila*. *Current biology*, *14*(8), 638-649.
- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M. P., Yin, C. M., & Garofalo, R. S. (2001). A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*, *292*(5514), 107-110.

- Tauber, E., & Kyriacou, B. P. (2001). Insect photoperiodism and circadian clocks: models and mechanisms. *Journal of Biological Rhythms*, 16(4), 381-390.
- Tauber, M. J., Tauber, C. A., & Masaki, S. (1986). *Seasonal adaptations of insects*. Oxford University Press.
- Thiele, H. U. (1977). Differences in measurement of day-length and photoperiodism in two stocks from subarctic and temperate climates in the Carabid beetle *Pterostichus nigrita* F. *Oecologia*, 30(4), 349-365.
- Tyshchenko, V. P., Goryshin, N. I., & Azarian, A. G. (1972). Role of circadian processes in insect photoperiodism. *Zhur Obshch Biol*.
- Vafopoulou, X., & Steel, C. G. (1996). The insect neuropeptide prothoracicotropic hormone is released with a daily rhythm: re-evaluation of its role in development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(8), 3368-3372.
- Vafopoulou, X., & Steel, C. G. (1999). Daily rhythm of responsiveness to prothoracicotropic hormone in prothoracic glands of *Rhodnius prolixus*. *Archives of insect biochemistry and physiology*, 41(3), 117-123.
- Vafopoulou, X., & Steel, C. G. (2009). Circadian organization of the endocrine system. *Insect Development. Elsevier, Oxford*, 395-458.
- Vafopoulou, X., Steel, C. G., & Terry, K. L. (2005). Ecdysteroid receptor (EcR) shows marked differences in temporal patterns between tissues during larval-adult development in *Rhodnius prolixus*: correlations with haemolymph ecdysteroid titres. *Journal of insect physiology*, 51(1), 27-38.
- Vafopoulou, X., Steel, C. G., & Terry, K. L. (2007). Neuroanatomical relations of prothoracicotropic hormone neurons with the circadian timekeeping system in the brain of larval and adult *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Journal of Comparative Neurology*, 503(4), 511-524.
- Vafopoulou, X., Terry, K. L., & Steel, C. G. (2010). The circadian timing system in the brain of the fifth larval instar of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Journal of Comparative Neurology*, 518(8), 1264-1282.
- Van Houten, Y. M., Overmeer, W. P. J., & Veerman, A. (1987). Thermoperiodically induced diapause in a mite in constant darkness is vitamin A dependent. *Experientia*, 43(8), 933-935.
- Vansteensel, M. J., Michel, S., & Meijer, J. H. (2008). Organization of cell and tissue circadian pacemakers: a comparison among species. *Brain Research Reviews*, 58(1), 18-47.

- Nunes, M. V. (1990). The effect of temperature on photoperiodic induction of diapause in insects and mites: a model for the photoperiodic "counter". *Journal of theoretical biology*, 146(3), 369-378.
- Nunes, M. V., & Veerman, A. (1982). Photoperiodic time measurement in the spider mite *Tetranychus urticae*: a novel concept. *Journal of Insect Physiology*, 28(12), 1041-1053.
- Nunes, M. V., & Veerman, A. (1984). Light-break experiments and photoperiodic time measurement in the spider mite *Tetranychus urticae*. *Journal of insect physiology*, 30(11), 891-897.
- Veleri, S., Brandes, C., Helfrich-Förster, C., Hall, J. C., & Stanewsky, R. (2003). A self-sustaining, light-entrainable circadian oscillator in the *Drosophila* brain. *Current biology*, 13(20), 1758-1767.
- Veerman, A. (2001). Photoperiodic time measurement in insects and mites: a critical evaluation of the oscillator-clock hypothesis. *Journal of Insect Physiology*, 47(10), 1097-1109.
- Veerman, A., & Helle, W. (1978). Evidence for the functional involvement of carotenoids in the photoperiodic reaction of spider mites.
- Veerman, A., Beekman, M., & Veenendaal, R. L. (1988). Photoperiodic induction of diapause in the large white butterfly, *Pieris brassicae*: evidence for hourglass time measurement. *Journal of insect physiology*, 34(11), 1063-1069.
- Veerman, A., & Nunes, M. V. (1980). Circadian rhythmicity participates in the photoperiodic determination of diapause in spider mites.
- Veerman, A., & Nunes, M. V. (1987). Analysis of the operation of the photoperiodic counter provides evidence for hourglass time measurement in the spider mite *Tetranychus urticae*. *Journal of Comparative Physiology A*, 160(4), 421-430.
- Veerman, A., & Veenendaal, R. L. (2003). Experimental evidence for a non-clock role of the circadian system in spider mite photoperiodism. *Journal of insect physiology*, 49(8), 727-732.
- Vitaterna, M. H., King, D. P., Chang, A. M., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., McDonald, J. D., ... & Takahashi, J. S. (1994). Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science*, 264(5159), 719-725.
- Wijnen, H., & Young, M. W. (2006). Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. *Annu. Rev. Genet.*, 40, 409-448.
- Wilde, J. D. (1962). Photoperiodism in insects and mites. *Annual review of entomology*, 7(1), 1-26.

- Wilde, J., Duintjer, C. S., & Mook, L. (1959). Physiology of diapause in the adult Colorado beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say)—I The photoperiod as a controlling factor. *Journal of Insect Physiology*, 3(2), 75-85.
- Williams, C. M. (1968, December). Photoperiodism and the endocrine aspects of insect diapause. In *Symposia of the Society for Experimental Biology* (Vol. 23, pp. 285-300).
- Williams, C. M., & Adkisson, P. L. (1964). Physiology of insect diapause. XIV. An endocrine mechanism for the photoperiodic control of pupal diapause in the oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Biological Bulletin*, 511-525.
- Williams, K. D., Busto, M., Suster, M. L., So, A. K. C., Ben-Shahar, Y., Leever, S. J., & Sokolowski, M. B. (2006). Natural variation in *Drosophila melanogaster* diapause due to the insulin-regulated PI3-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(43), 15911-15915.
- Williams, K. D., Schmidt, P. S., & Sokolowski, M. B. (2010). Photoperiodism in insects: molecular basis and consequences of diapause. *Photoperiodism: The Biological Calendar*, 287-317.
- Wolda, H. (1988). Insect seasonality: why?. *Annual review of ecology and systematics*, 1-18.
- Wu, Q., & Brown, M. R. (2006). Signaling and function of insulin-like peptides in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 51, 1-24.
- Xu, K., Zheng, X., & Sehgal, A. (2008). Regulation of feeding and metabolism by neuronal and peripheral clocks in *Drosophila*. *Cell metabolism*, 8(4), 289-300
- Yamashita, O. (1996). Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, gene expression and function. *Journal of Insect Physiology*, 42(7), 669-679.
- Yocum, G. D., Rinehart, J. P., Chirumamilla-Chapara, A., & Larson, M. L. (2009). Characterization of gene expression patterns during the initiation and maintenance phases of diapause in the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Journal of insect physiology*, 55(1), 32-39.
- Yoshida, T., & Kimura, M. T. (1995). The photoperiodic clock in *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology*, 41(3), 217-222.
- Yoshii, T., Wülbeck, C., Sehadova, H., Veleri, S., Bichler, D., Stanewsky, R., & Helfrich-Förster, C. (2009). The neuropeptide pigment-dispersing factor adjusts period and phase of *Drosophila*'s clock. *The Journal of Neuroscience*, 29(8), 2597-2610.

Zehring, W. A., Wheeler, D. A., Reddy, P., Konopka, R. J., Kyriacou, C. P., Rosbash, M., & Hall, J. C. (1984). P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell*,*39*(2), 369-376.

Zhao, Z., & Zera, A. J. (2004). The hemolymph JH titer exhibits a large-amplitude, morph-dependent, diurnal cycle in the wing-polymorphic cricket, *Gryllus firmus*. *Journal of Insect Physiology*, *50*(1), 93-102.

Zerr, D. M., Hall, J. C., Rosbash, M., & Siwicki, K. K. (1990). Circadian fluctuations of period protein immunoreactivity in the CNS and the visual system of *Drosophila*. *The Journal of Neuroscience*, *10*(8), 2749-2762.