

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

# **Bakalářská práce**

**2019**

**Tereza Nováková**

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**

**Metabolické dráhy kryoprotektivních látek  
hmyzu: transkriptomická analýza pomocí  
RT-qPCR**

Bakalářská práce

**Tereza Nováková**

Školitel: Prof. Ing. Vladimír Košťál, CSc.

České Budějovice 2019

## Bakalářská práce:

Nováková Tereza (2019) : Metabolické dráhy kryoprotektivních látek hmyzu: transkriptomická analýza pomocí RT-qPCR (Metabolic pathways cryoprotective agents of insect: RT-qPCR transcriptional analysis. Bc.Thesis, in Czech)- 42p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

## Anotace:

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

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

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

České Budějovice, duben 2019

.....

Tereza Nováková

## **Poděkování:**

Děkuji především svému školiteli Prof. Ing. Vladimíru Košťálovi, CSc. za odborné vedení, cenné rady, podporu a trpělivost po celou dobu naší spolupráce. Také děkuji ostatním kolegům Entomologického ústavu, kteří mi byli nápomocni při experimentální činnosti. V neposlední řadě mé poděkování samozřejmě patří i rodině, příteli a kamarádům, kteří mě po celou dobu podporovali.

## **Obsah:**

1. Úvod.....	3
1.2 Diapauza a chladová odolnost hmyzu .....	4
1.2.1 Diapauza .....	4
1.2.2 Chladová odolnost .....	5
1.2.3 Modelový druh - <i>Chymomyza costata</i> .....	10
2. Cíle práce.....	11
3. Materiál a metodiky .....	12
3.1 Metabolomická analýza .....	12
3.2 Laboratorní aklimace larev .....	15
3.3 Odhad relativní četnosti mRNA transkriptů .....	17
3.3.1 Izolace celkové RNA z larev (Total RNA isolation) .....	17
3.3.2 Ošetření DNÁsou (DNA treatment) .....	18
3.3.3 Reverzní transkripce (Reverse transcription) .....	19
3.3.4 qPCR metoda .....	20
4. Výsledky.....	22
5. Diskuze.....	35
6. Závěr .....	37
7. Literatura (Podle abecedy!, bez číslování a odrážek).....	38

## 1. Úvod

Příroda i celý Vesmír přirozeně fungují v periodicky opakujících se rytmech, jako jsou například obíhání Země kolem Slunce, nebo její oběh okolo své osy. Sklon zemské osy je zodpovědný za cyklické prodlužování nebo zkracování dne/noci, takzvanou fotoperiodu- poměr mezi světelnou a temnostní fází dne, která je zodpovědná za regulaci životních cyklů u různých organismů včetně hmyzu. Různé druhy organismů reagují na tyto cyklické změny odlišně (Wilde, 1962; Danks, 2003; Nelson et al., 2010; Smolík, 2008; Beck, 1964).

Živé organismy se částečně adaptují na cykličnost podmínek prostředí pomocí fyziologických funkcí nebo svých životních cyklů. Každý živý organismus prochází několika rozdílnými cykly, které jsou součástí přirozených, pravidelně se opakujících biorytmů (Berger, 1995). Jedná se o cykly roční (cirkanuální), denní (cirkadiánní), lunární a další. Pro život jsou však nejvýznamnější cirkadiánní cykly, tedy denní (*circa*= okolo, *die*=den), které jsou zodpovědné za činnost fyziologických, behaviorálních a vývojových procesů, mezi které se řadí pohybová aktivita, migrace, budování zásob, příjem potravy, reprodukční aktivita, organizování změny v buněčné membráně, ovlivňují metabolismus, obranné mechanismy, aktivitu žláz, uvolňování enzymů, hormonů a de/aktivace genů (Giebbultowicz, 1999; Grambal 2014; Berger, 1995; Lee, 1991; Nelson, 2009; Beck, 1980; Saunders, 1982; Danks, 2003; Tauber, 1986).

Živý organismus se musí v průběhu života přizpůsobovat řadě vnějších podmínek, v našich zeměpisných šířkách se jedná zejména o překonávání zimy, tedy zejména nedostatek potravy a překonávání nízkých teplot. O tom, jak se organismus s vnějším prostředím vyrovnává, rozhoduje intenzita a délka působení vlivu vnějšího prostředí, a schopnost organismu se těmto podmínkám přizpůsobit (Grambal, 2014; Danks, 2003; Wilde, 1959; Lee, 1991; Tauber, 1986). Hmyz těmto vnějším cyklům přizpůsobuje svůj vlastní životní cyklus, tedy střídá generace, překonává nepříznivé období ve specifickém vývojovém stádiu a stavu tzv. Diapauze. Během diapauzy často zvyšuje svoji odolnost vůči chladu a mrazu, což je zajištěno komplexní fyziologickou změnou. Velmi důležitým aspektem této změny je syntéza a akumulace tzv. Kryoprotektantů. Zajímalo nás, zda se v chladem aklimovaných larvách hromadí nějaké látky, na rozdíl od larev diapauzních nebo chovaných za dlouhého dne. Na tuto otázku bylo odpovězeno pomocí metabolomické analýzy, která

poskytla výčet kryoprotektivních látek (metabolitů). V této práci se budu zabývat jedním z metabolitů, konkrétně prolinem, u larev modelového druhu mušky *Chymomyza costata* z čeledi Octomilkovitých (*Drosophilidae*). Budeme se zabývat metabolickými drahami, které vedou k metabolitu, a budeme se snažit potvrdit hypotézu, že organismus získává prolin z extracelulární matrix z kolagenu.

## 1.2 Diapauza a chladová odolnost hmyzu

### 1.2.1 Diapauza

Hmyz se nejčastěji vyrovnává s nepříznivými podmínkami vstupem do dormance. Známe dva typy. Prvním je kviescence, což je odpověď organismu na nepříznivé podmínky prostředí jako jsou například chlad, nedostatek potravy, kyslíku a jiných. V tomto případě trvá klidový stav jen po dobu, jakou působí nepříznivé podmínky na živý organismus. Při změně podmínek hmyz toho stádium ukončuje a je opět plně aktivní (Tauber et al., 1986).

Druhým typem dormance je diapauza. Diapauza je komplexní proces, který je obvykle řízen vnějšími faktory, jako jsou fotoperioda, změna teploty nebo příjem potravy. V tomto stádiu jsou fáze života silně omezeny a je pozastaven vývoj, který trvá i přes zlepšení podmínek, tedy až do ukončení procesu diapauzy. Probíhá hluboká fenotypická proměna. Organismus je v klidovém stavu, a je závislý na snížení energetických výdajů, produkci látek, ukončení reprodukce, shánění potravy, tvorby zásob, migraci, výraznému zpomalení metabolismu, dále dochází k posilování obranných a ochranných struktur (operony, šokové proteiny), změně struktury membrán, změně genové exprese a akumulaci metabolitů (kryoprotektantů) jako jsou například prolin, trehalóza, nebo betain (Tauber et al., 1986; Beck, 1975; Košťál et al., 2017; Lees, 1955; Denlinger, 2009; Košťál et al., 2006; Lee, 1991).

Dá se rozdělit na fakultativní a obligátní. Fakultativní typ je závislý na podnětech z prostředí. Obligátní je geneticky závislý na vývojovém stádiu druhu, nikoliv na přírodních podmínkách. Dalším typem rozdělení je na hibernaci neboli přezimování a estivaci. Oba typy jsou indukovány nejčastěji fotoperiodickým signálem, který umožňuje hmyzu se připravit na sezónní změnu podmínek úpravou svého životního stylu (Nelson et al., 2010;

Košťál, 2017; Saunders, 1981). Jediným rozdílem mezi hibernací a estivací v rámci reakce na fotoperiodu je, že hibernace je odpovědí na krátký den (SD), a estivace na dlouhý den (LD). Sekundárně reaguje hmyz při vstupu do diapauzy na snížení teploty.

Různé druhy vstupují do diapauzy v odlišnou dobu, v reakci na různé podmínky prostředí v různých stádiích vývoje (Tauber et al., 1986; Košťál et al., 2009; 2017; Lees, 1955; Denlinger, 2009).

Larvy modelového druhu *Chymomyza costata* vstupují do diapauzy koncem léta, když se zhoršují podmínky prostředí. Larvy vstupují do diapauzy ve třetím vývojovém stádiu instaru, kdy jsou chované v laboratorních podmínkách v inkubátorech na umělé dietě, jak je detailněji popsáno v části metodiky. Jednou z důležitých fenotypických změn, jež doprovázejí vstup do diapauzy je zvýšení chladové odolnosti.

### **1.2.2 Chladová odolnost**

Vědní obor kryobiologie, který studuje chladovou odolnost, se zabývá poškozujícími účinky nízkých teplot na hmyz, a na druhé straně studuje adaptaci a aklimatizaci organismu, které pomáhají poškození předcházet, tolerovat nebo jej opravit. Definicí pro chladovou odolnost je schopnost organismu přežít v nízkých teplotách pod teplotním prahem pro vývoj. Konkrétní teplotní práh je pro organismy odlišný, závislý na druhu, ekologickém kontextu a fyziologickém stavu jedince. Nízká teplota je taková, jaká leží pod prahovou hodnotou pro aktivitu a vývoj, nebo pod kterou dochází k poškození. Poslední stanovený teplotní práh byl definován Nedvědem roku 1998 jako „Upper Limit of Cold Injury Zone“ (Nedvěd et al., 1998). Chladová odolnost bývá ovlivněna přizpůsobením genotypu druhu, nebo chladovou aklimací a vstupem do diapauzy, spojeným s fenotypovými změnami vyvolanými prostředím. Studií chladové odolnosti můžeme přispět v cestě ke kryoprezervaci, skladování tkání, orgánů nebo celých organismů. Také ke zlepšení znalostí o růstu a přezimování škůdců a následné ochraně plodin, nebo ke zdokonalení chovu modelových organismů a jejich vstupu do diapauzy (Košťál et al., 2009; Pegg, 2001; Toxopeus, 2019).



Principy chladové odolnosti rozdělujeme na pět základních strategií, které hmyz využívá k přežití nízkých teplot (Košťál, 2004; Bale, 1996, 1993; Lee et al., 1987; Holmstrup & Westh, 1994):

- 1) Aktivita za nízkých teplot, nebo v tepelně pufovaném prostředí
- 2) Podchlazení
- 3) Promrznutí
- 4) Dehydratace
- 5) Chladová aklimace

- 1) Aktivitu za nízkých teplot využívají druhy žijící v půdě, nebo tlejícím dřevu a vytváří vývojová stadia, která zůstanou aktivní po celou dobu vývoje i přes přítomnost chladu. Tyto druhy musí být schopny snížit svůj teplotní práh a zajistit veškeré funkce při teplotách blízko nuly nebo nižších. Jedná se například o zástupce dvoukřídlého hmyzu. Některé druhy jako jsou chvostoskoci dokonce svoji aktivitu přesouvají do chladného období, a naopak to teplé přežívají v dormanci.
- 2) Jedinci, jež využívají strategii podchlazení (freeze avoidance) jsou schopni udržovat tělní tekutiny za teplot pod rovnovážným bodem mrznutí/tání (m. p. – melting point) v tzv. podchlazeném stavu. Rovnovážený bod mrznutí/tání (m. p.) je pod  $0^{\circ}\text{C}$  kvůli působení solutů rozpuštěných v tělních tekutinách, a je přímo úměrný osmolaritě roztoku. Hodnota rovnovážného bodu mrznutí/tání byla stanovena na úroveň  $-0,5^{\circ}\text{C}$  až  $-0,7^{\circ}\text{C}$ . Ovšem ani při dosažení těchto teplot tělní tekutiny nepromrzají a zůstávají v tzv. podchlazeném stavu, až do doby než dojde k homogenní nebo heterogenní nukleaci a samovolnému růstu ledových krystalků, ke které dochází v bodě SCP (Supercooling point). SCP neboli bod podchlazení je reálná teplota krystalizace vody. Je tedy důležité, aby se v těle nevytvořil zárodečný krystal, nebo alespoň nenabyl kritické velikosti, kdy dojde k explozivnímu promrznutí a připojování dalších molekul vody do krystalické mřížky ledu, což vede k zahušťování zbylého vodného roztoku. Opačný případ zapříčiní smrt jedince (Nedvěd, 1996; Košťál, 2009). Aby se vytvořil zárodečný krystal ledu, je nejprve nutné vytvořit shluk molekul vody (homogenní nukleace), který má prostorové uspořádání zárodečného krystalu. Dle teploty se odvozuje množství molekul vody potřebných k vytvoření krystalu. Například při  $-5^{\circ}\text{C}$  musí být čtyřicet pět tisíc molekul, nýbrž při  $-40^{\circ}\text{C}$  stačí pouhých sedmdesát molekul vody (Košťál, 2009). Dále je vznik krystalu ovlivňován

viskozitou, osmolalitou, přítomností iniciačního jádra jako prachové částice, bakterie nebo makromolekuly; také povrchem, na kterém led vzniká (heterogenní nukleace), a regulací přítomností bílkovinných látek typu AFPs (anti- INAs) nebo INAs (Ramløv, 2000). Krystalizace ledu však může začít spontánně, a šance se zvyšuje se zvětšujícím se objemem vody, a dobou vystavení nízké teplotě.

Hmyz k ochraně před zmrznutím využívá vysokomolekulární kryoprotektivní látky jako AFPs (Anti-freeze proteins), které se vážou na zárodečné krystalky ledu.

Inhibují jejich růst a udržují stav podchlazení. Výrazně sníží svůj bod podchlazení (SCP), a zvýší tak svoji kapacitu podchlazení, což jim umožní být v kapalném stavu i při  $-25^{\circ}\text{C}$  (Košťál, 2009; Nedvěd, 1996). Jakmile krystal přesáhne svoji kritickou velikost dojde k explozivnímu promrznání zmíněnému výše. Tento proces je doprovázen uvolňováním skupenského tepla, které umožňuje měřit záznam reálného bodu mrznutí, neboli bod podchlazení tzv. SCP (Supercooling point).

Promrznání je ukončeno až dosažením molality odpovídající okolní teplotě, a rovnováze mezi krystalem a roztokem. Krystal tedy může dále růst jen dalším snížením teploty (Nedvěd, 1996).

Druhou možností je se vyhnout nukleaci způsobené látkami (INAs – Ice nucleating agents), které mají vhodný povrch pro vytvoření zárodečného krystalu. Vyhýbá se jim odstraněním z těla (vyprázdnění obsahu střev) nebo jejich deaktivací uložením v lipidické fázi membrán. Dlouhodobé přežívání v nízkých teplotách bylo zjištěno u housenky obaleče *Epiplima scudderiana* a u vajíček píďalky *Epirrita autumnata* (Nedvěd, 1996).

Ovšem při dlouhodobému vystavení nízkým teplotám dochází k poškození či úmrtí i bez zmrznutí. Záleží na intenzitě vystavení chladu. Chlad působí na struktury i procesy v organismu a je těžké rozhodnout o příčině poškození. Při poklesu teploty může docházet k postupnému přechodu membránových lipidů do „nefunkční“ gelové fáze (Košťál, 2009). Dále dochází k chladové denaturaci proteinů, nebo snížení enzymatické aktivity a změně metabolismu, také ke snížení aktivit transportních systémů, a selhání iontových pump (Privalov, 1990). Všechny tyto aspekty způsobují poškození organismu (Košťál, 2009).

- 3) Další strategií přežívání nízkých teplot je promrznutí. Některé druhy jsou schopni tolerovat, a do jisté míry regulovat proces promrznání tělních tekutin

v mimobuněčných prostorech. Každý druh má svůj specifický práh tolerance, u kterého závisí na minimální tolerované teplotě a době její expozice (Toxopeus, 2019).

Principem je vylučování vlastních nukleátorů (slouží jako matrice pro krystalové struktury) do hemolymfy. Zástupci těchto nukleátorů jsou INPs (Ice nucleation proteins), které stimulují tvorbu ledových krystalků a podporují mrznutí. Hmyz má nízkou kapacitu podchlazení a vysoký bod podchlazení (SCP). Mrzne tedy při vyšších teplotách (zhruba od  $-1^{\circ}\text{C}$  do  $-10^{\circ}\text{C}$ ). Díky tomu je zaručený řízený a pomalý růst krystalků, přičemž buňky mají dostatek času se vyrovnat s osmotickými změnami, a předcházet osmotickému šoku. Vysoká koncentrace roztoků uvnitř buněk, a její zvyšování díky dalšímu přísunu vody do extracelulárních krystalů, brání vzniku ledu uvnitř buněk. Určité druhy přezimujícího hmyzu (larvy páteříčka sněhového) jsou schopni přežít i velmi nízké teploty ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) po dlouhou dobu, či například Skokan lesní (*Rana sylvatica*) dokáže přežít dva týdny při tělní teplotě  $-6^{\circ}\text{C}$ , přitom až 70% tělní vody je přeměněno na led (Toxopeus, 2019).

Částečným promrznutím hemolymfy se zvyšuje její osmolarita, kdy dochází k odčerpání vody zevnitř buněk. Je to proces mimobuněčného mrznutí, ale i vnitrobuněčné dehydratace. Mezi poškození, která mohou nastat se řadí například změna aktivity proteinů zapříčiněná zvýšením koncentrace solutů uvnitř buněk, dále denaturace, ztráta elektrochemického potenciálu, destrukce membrán přesáhnutím limit dehydratace buněk a další.

- 4) Strategie dehydratace byla popsána u přezimujících kokonů žížal, chvostoskoků a některých druhů členovců. Vlastnosti jako malá velikost těla, a vysoká propustnost povrchu těla pro vodu předurčuje tuto strategii (Holmstrup & Westh, 1994). Principem je, že po vytvoření ledu v půdních prostorech je parciální tlak vodní páry nad ledem nižší než tlak vodní páry nad osmoticky aktivní vodou, která je dosud v kapalném stavu. Jelikož je kutikula propustná pro vodu, dochází k jejímu rychlému odpařování a připojení ke krystalům ledu v okolí. Dochází tedy k dehydrataci organismu jako u strategie promrznutí, a navíc zahuštění tělních roztoků, což brání promrznutí uvnitř organismu (Holmstrup & Westh, 1994).

- 5) Strategie rychlé chladové aklimace („rapid cold hardening“) byla poprvé studována u jedinců *Sarcophaga crassipalpis*. Je založena na krátkém vystavení neletální nízké teplotě, díky čemuž následně jedinci přežívají delší dobu ve velmi nízkých teplotách (Lee, 1987). Při studiu u dalších druhů byly analyzovány mechanismy jako akumulace glycerolu, nebo aktivace chaperoninů typu HSPs (Heat Shock Proteins), které jsou částečně zodpovědné za aklimaci.

I přes schopnost jedince ovládat strategii přežití nízkých teplot není vyloučen projev nějakého poškození. Změna teploty se dotýká veškerých procesů i struktur buňky, jak již bylo popsáno výše. Aby organismy předešly poškození zapříčiněného nepříznivými vlivy nízkých teplot akumulují látky s kryoprotektivními účinky, tzv. kryoprotektanty (Storey, 1991; Košťál, 2003; Riihimaa a Kimura, 1990). Kryoprotektanty můžeme rozdělit na vysokomolekulární a nízkomolekulární. Vysokomolekulární mají charakter proteinu, glykoproteinu, řadí se do nich například AFPs (anti-freeze proteins), nebo INPs (ice-nucleation proteins). My se však budeme více zabývat těmi nízkomolekulárními, které mají charakter cukru, polyolu, aminokyseliny a derivátů. Patří mezi ně ribitol, mannitol, glycerol, trehalóza, sacharóza, fruktóza, prolin a další. Podobné látky akumulují různí živočichové i rostliny v odpovědi na různé výzvy jako chlad/mráz/horko, sucho/dehydratace, zasolení/změny osmolarity. Nás však zajímají v roli kryoprotektantů (Miller and Smith, 1975; Somme, 1982; Lee, 1991; Košťál, 2009; Toxopeus, 2019).

### 1.2.3 Modelový druh - *Chymomyza costata*

Za modelový druh jsme si zvolili mušku *Chymomyza costata* z třídy Hmyzu (Insecta), řádu Dvoukřídli (Diptera), čeledi Octomilkovití (Drosophilidae). Je to blízká příbuzná mušky *Drosophila melanogaster*, která je



jednou z nejpůvodnějších a nejprozkoumanějších modelových organismů. Na náš experiment se *D. melanogaster* nehodí z důvodu tropického rozšíření a nízké chladové odolnosti, tedy nízké schopnosti aklimace. Na rozdíl od ní, bohužel o *C. Costata* zatím tolik informací není. Larvy této mušky prochází třemi instary, dále se kuklí a následuje vývoj v dospělce (imago). Během jara a léta, když jsou mušky aktivní, se v přírodě vystřídá několik (cca 3-4) generací, v laboratoři při teplotě 18°C existuje jedna generace zhruba měsíc.

Víme, že je rozšířena cirkumpolárně od chladného mírného pásu po subpolární oblasti. Podle studií binomie ostatních druhů soudíme, že se přezimující larvy vyskytují pod kůrou padlých stromů. Na základě jejího severského rozšíření je schopna adaptace na zimu, a disponuje vysokou mrazuvzdorností. Je to jeden z nejodolnějších organismů vůči mrazu, které věda zná. Dokáže přežít v kapalném dusíku, či elektronovém kryo-mikroskopu (Košťál et al., 2011).

Také je velice senzitivní na fotoperiodu, a v souladu s blížícími se nepříznivými podmínkami a vystavením krátkému dni všechny larvy třetího instaru zastavují svůj vývoj a vstupují do diapauzy (Riihimaa a Kimura, 1989; Košťál et al., 2000a; Saunders, 1982). Přezimující larvy jsou silně odolné vůči chladu a mrazu, kdy dochází k podchlazení na -20°C.

## **2. Cíle práce**

Cílem této práce bylo, se pokusit odpovědět na některé z dílčích otázek, které by pomohly k objasnění metabolických přeměn spojených se vstupem do diapauzy, chladovou aklimací, a adaptivních přeměn, které vedou k syntéze a akumulaci kryoprotektantů, v mém případě prolinu, které zvyšují chladovou odolnost jedince.

Dalším cílem bylo zvládnout metody analýzy transkriptů pomocí RT-qPCR metody.

Ovšem hlavním cílem práce je změřit relativní četnosti mRNA transkriptů pro geny kódující enzymy metabolismu vybraného kryoprotektantu – prolinu, u různě aklimovaných larev modelového druhu *Chymomyza Costata*. V souvislosti s posuzováním změn relativní četnosti transkriptů jsme chtěli vytipovat kandidáty pro další výzkum, u kterých byly pozorovány největší změny.

### **3. Materiál a metodiky**

#### **3.1 Metabolomická analýza**

První položenou otázkou, která musela být zodpovězena, byla metabolomická analýza zabývající se akumulací kryoprotektantů u modelového druhu. Chtěli jsme zjistit, zda se v těle aklimovaných jedinců hromadí kryoprotektanty, a v jakých koncentracích oproti larvám nediapauzním a diapauzním bez chladové aklimace.

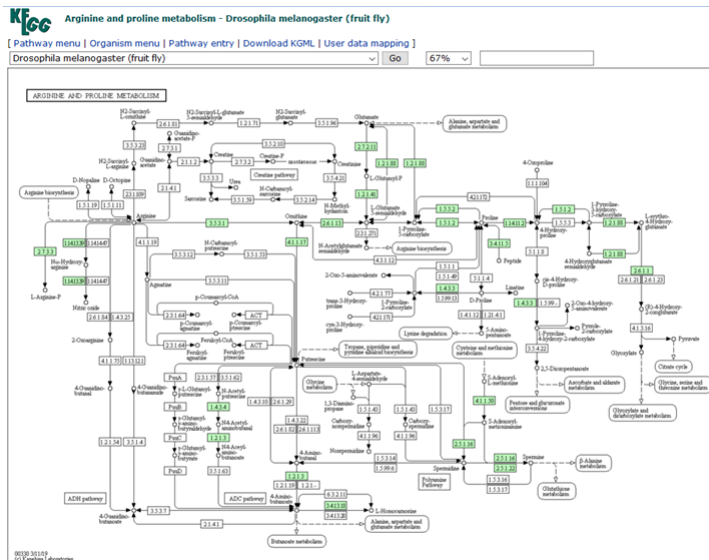
Bylo provedeno několik metabolomických analýz:

A) Cílené analýzy: V tomto typu analýzy bylo zjišťováno jen několik látek pomocí GC-plynnové chromatografie, LC-kapalinové chromatografie, či spektrofotometrických metod.

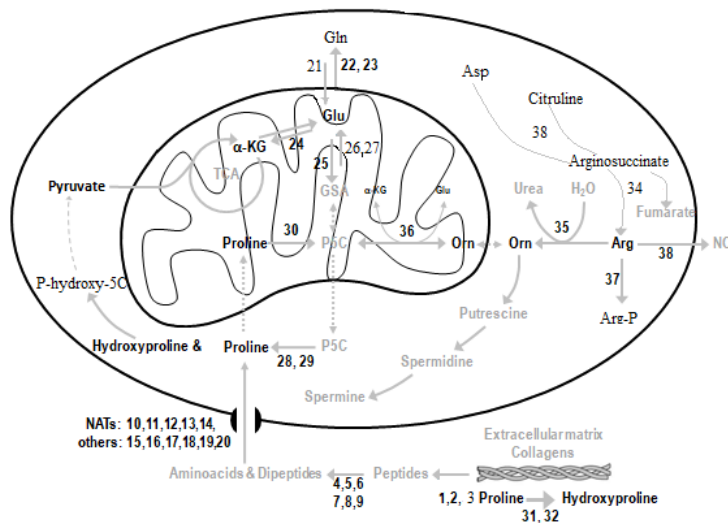
Jsou cílené, tedy jen pro malý počet látek, o kterých je známo, že se podílejí na diapauze, a pokrývají hlavní procesy, dráhy vedoucí k prolinu. Tyto látky byly vybrány na základě studií metabolických drah vedoucích k prolinu z mnoha databází jako například KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Například na obrázku č. 2, vidíme metabolismus argininu a prolinu v databázi KEGG, kde zeleně zvýrazněné enzymy jsou známy u druhu *Drosophila melanogaster*, tedy blízké příbuzné *C. costata*. Enzymy jsou kodované jedním nebo více geny. Vedoucím práce mi bylo zadáno schéma metabolismu prolinu a jeho okolí (obr. 3), a bylo mým úkolem jej zaplnit transkripty kodujících genů, a zjistit zda u prolinu dochází k aktivitě na úrovni transkriptomu. Transkriptomické profilování bylo založeno na kandidátních sekvencích libovolně vybraných z publikovaných databází, která obsahují mRNA transkripty *C. costata*. Vybrané geny široce pokrývají hlavní struktury a procesy, které jsou známy nebo navržené, aby byly spojeny s diapauzou hmyzu a tolerancí za studena (Košťál et al, 2018).

V dalším kroku byly pro vybrané geny pomocí databází FlyBase a Geneious vyhledány a srovnány kódující sekvence. U těchto kódujících sekvencí byla vyhledána ta nejvíce podobná pomocí metody blastování. Na sekvenci byly zhotoveny primery, které byly použity při kroku u PCR metody.

**Obr. 2:** Metabolismus argininu a prolinu u *D. melanogaster*



**Obr. 3:** Schéma metabolismu prolinu



B) Necílená analýza: Analyzuje několik tisíc látek. Dle necílené analýzy zjistíme, zda se výrazněji akumulují i další látky. Vedle trehalózy a prolinu se nám výrazněji akumuluje i betain (nepublikované výsledky, Košťál; Toxopeus, 2019; Košťál et al., 2018).

Podle výsledků analýzy byly srovnány velikosti peaku v grafech u LD a SD. Velikosti peaku „odpovídají“ koncentraci. Podle nejvýraznějších změn byla sestavena tabulka vybraných metabolitů, kde je jasně vidět nejvyšší koncentrace



prolinu. Srovnáváme přibývající/ubývající množství jednotlivých metabolitů aklimovaných při LD, přes SD až po chladem aklimované larvy (SDA10), pomocí barevné škály.

Výsledky metabolické analýzy (analyzované pomocí HILIC) jsem již dostala zadané (viz Obr. 4).

**Obr. 4:** Tabulka s výslednými hodnotami různých metabolitů získaných metabolickou analýzou u různě aklimovaných larev modelového druhu.

		MIN	50% percentil			MAX
		formatted as a whole matrix: tříbarevná škála percentil: 50				
metabolites:		LD3	SD3	SD6	SD11	SDA11
LC/GC peak area	Glutamine	4,4E+09	5,2E+09	1E+10	1,3E+10	4,7E+09
	Aspartate	1,8E+07	6101464	1,4E+07	1,5E+07	7000360
	Alanine	6,7E+07	5,6E+07	5,1E+07	9E+07	4E+07
	alpha-Ketoglutarate	5E+08	5,6E+08	5,1E+08	4,7E+08	3E+08
	Glutamate	9,8E+08	7,4E+08	6,4E+08	6,7E+08	6,1E+08
	Proline	1,4E+10	1,6E+10	2,1E+10	2,7E+10	3,3E+10
	4-Hydroxyproline	3386702	1974336	2080239	2281219	4375819
	Proline 3-hydroxy-5-carboxylate	3,3E+09	3,8E+09	7,5E+09	9,2E+09	3,5E+09
	Pyruvate	1,7E+07	1,8E+07	1,4E+07	2E+07	867464
	Ornithine	5,1E+07	8,6E+07	7E+07	7,9E+07	1,8E+07
	Arginine	4,3E+09	4,7E+09	4,7E+09	4,7E+09	4,2E+09
	Arginosuccinate	9021601	6375756	1E+07	2E+07	9823354
	Arginine phosphate	7097223	2,3E+07	4,1E+07	7,8E+07	1,4E+08
	Citrulline	2,8E+07	3,4E+07	2E+07	8199487	1E+07

Mým úkolem bylo dodělat stejnou barevnou škálu pro výčet transkriptů (obr. 5), a odhadnout jejich relativní četnosti pomocí následujících kroků metodiky. Červeně zvýrazněné transkripty byly mým úkolem, a data ze zbylých jsem dostala vypracované.

**Obr. 5:** Seznam transkriptů, pro které byla měřena relativní četnost

1	Matrix metalloproteinase 1, CG4859
2	Matrix metalloproteinase 2, CG1794
3	Brachyurin-like collagenase, XP_017012400
4	Aminopeptidase P, CG6291
5	Angiotensin converting enzyme, dipeptidase-A, CG8827
6	Prolyl aminopeptidase, KOB68997
7	Dipeptidase-like, CG1654
8	Dipeptidase-B, CG9285
9	Dipeptidase-C, CG5663
10	Nutrient amino acid transporter 1, CG3252
11	Nutrient amino acid transporter 2, CG15088
12	Nutrient amino acid transporter 3 & 5, CG4476, CG1698
13	Nutrient amino acid transporter 4, CG8850
14	Nutrient amino acid transporter 6, CG15279
15	Excitatory amino acid transporter 1 (Glu/Na+), CG3747
16	Neurotransmitter transporter like (Gly, Pro), CG7075
17	Glycine transporter, CG5549
18	Inebriated, SLC6 transporter, CG15444
19	SLC7 CAT transporter similar to Eaa1, CG5535
20	SLC7 LAT transporter similar to Eaa1, CG1607
21	Glutaminase, CG42708
22	Glutamine synthetase 1, CG2718
23	Glutamine synthetase 2, CG1743
24	Glutamate dehydrogenase, CG5320
25	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate synthase, CG7470
26	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 1, CG7145
27	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 2, CG33092
28	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate reductase, CG6009
29	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate reductase 2-like, CG5840
30	Proline oxidase (dehydrogenase), CG1417
31	Prolyl-4-hydroxylase (collagen), CG31014
32	Prolyl-4-hydroxylase (HIF-1alpha), CG44015
33	Arginosuccinate synthase, CG1315
34	Arginosuccinate lyase, CG9510
35	Arginase, CG18104
36	Ornithine aminotransferase, CG8782
37	Arginine kinase, CG32031
38	Nitric oxid synthase, CG6713

### 3.2 Laboratorní aklimace larev

Pro experimentální část práce byly použity larvy *C. Costata*, konkrétně divoký kmen Sapporo získán 1983 poblíž Sappora, Hokkaido, Japonsko. Od té doby mušky chováme z původních jedinců v laboratoři na Entomologickém ústavu AV ČR v Českých Budějovicích. V našem experimentu byli dospělci chováni ve sklenicích o objemu 250ml, a larvální stádia v 50ml zkumavkách s vatovou zátkou. Jedinci byli krmeni umělou dietou složené z agaru, kukuřičného šrotu, sušených kvasinek a ječného sladu. Mušky kladly svá vajíčka na kousek jablka, které byly po naklazení vajíček přeneseny do nové zkumavky s dietou, což umožnilo larvální vývoj. Larvy byly aklimovány v inkubátorech Sanyo MIR 154, při konstantní teplotě 18°C. Byl to kontinuální chov za dlouhého dne - LD 16L/8D (obr. 6), tedy při šestnácti hodinách světla a osmi hodinách tmy; a krátkého dne - SD 12L/12D (obr. 6), kde je larva vystavena dvanácti hodinám světla a dvanácti hodinám tmy (larvy reagují na temnou fázi dne); či chladově aklimované (SDA) v SD při 4°C (obr. 7). Indukce diapauzy probíhá primárně krátkým dnem, a chladová aklimace probíhá nejprve snížením teploty na jedenáct stupňů, po které následuje snížení na čtyři stupně Celsia.

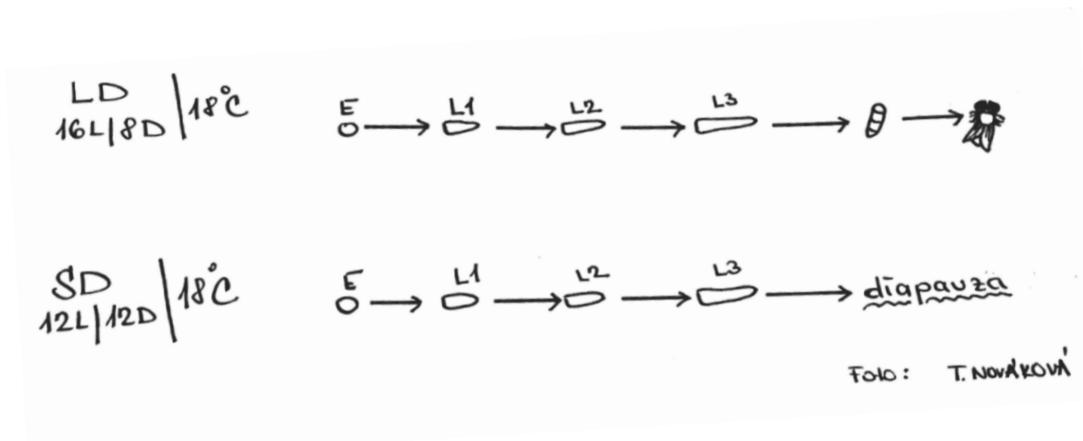
Rozlišujeme: 1. Nediapauzní larvy: LD3

2. Diapauzní larvy: SD3, SD6, SD10

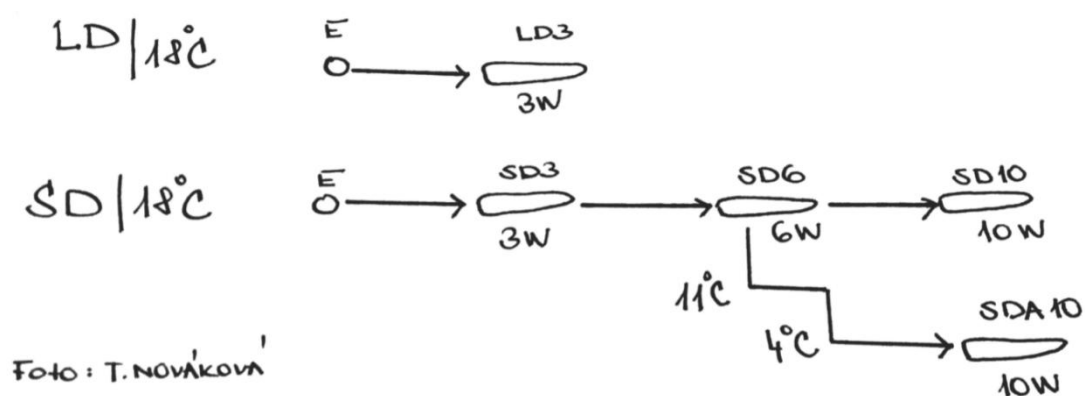
3. Diapauzní chladem aklimované: SDA10

Pro experiment byly vždy použity larvy třetího instaru, kterého larvy dosáhnou zhruba třináctý den. Naše larvy jsou sbírány 18. den. Jedná se tedy o plně vzrostlé larvy třetího instaru, které se nacházejí v tzv. pre-wandering stage, neboli před putující fází. V putující fázi jsou larvy nachystané na fázi kuklení, proběhly v nich hormonální změny, zastavily příjem potravy, a hledají si vhodné místo na kuklení. Tato putující fáze je pro nás markerem sběru larev. Sbíráme takové larvy, které jsou ve třetím instaru, ale ještě této putující fáze nedosáhly. Tímto jsme dosáhli věkové synchronizace larev v maximálním rozmezí 24hodin. Vzorky pro získání dat byly připravené z celých larev.

**Obr. 6:** Larvální vývoj za dlouhého (LD 16L\8D) při 18°C od embrya (E), přes vývojová stádia (L1-L3) vedoucí ke kuklení a vývoji imaga. A vývoj za krátkého dne (SD 12L\12D) při 18°C začínající embryem (E), vedoucí k diapauze po třetím instaru (L3), která může být udržovaná až do smrti larev.



**Obr. 7:** Schéma aklimačního protokolu. Chladová aklimace larev v 6 týdnech (SD6) z 18 °C přes 11°C na 4°C pro získání chladově aklimovaných larev v deseti týdnech (SDA10).



### 3.3 Odhad relativní četnosti mRNA transkriptů

Larvy byly sámplovány do Ribozolu™ a následně uloženy do -80°C. Sledování exprese genů proběhlo dle následujících protokolů:

#### 3.3.1 Izolace celkové RNA z larev (Total RNA isolation)

Chemikálie: Ribozol™ (RNA Extraction Reagent - Amresco, Solon, OH, USA), chloroform, isopropanol, DEPC H<sub>2</sub>O, 75% EtOH v DEPC H<sub>2</sub>O

- 1) Odeber 5 larev do 400 µl ledově chlazeného Ribozolu
- 2) Ulož vzorky do -80°C
- 3) Důkladně vyčisti pracovní plochu ethanolem, zapni si centrifugu, nachystej si chladicí box s ledem, RNA pipety, eppendorfky a pinzetu. Nasad' si rukavice, aby nedošlo ke kontaminaci.
- 4) Nechej rozpustit vzorky na ledu, důkladně si rozstříhej larvy očištěnými nůžkami. Po každém vzorku omyj nůžky destilovanou vodou.
- 5) Důkladně homogenizuj (30sec) vzorky na ledu pomocí baterií poháněným homogenizérem s paličkovým nástavcem. Nástavce vyměňuj po každé sérii vzorků.
- 6) Napipetuj 600 µl Ribozolu (celkový objem 1000 µl), promíchej pomocí vortexu a krátce stoč na centrifuze
- 7) Nechej při pokojové teplotě 5minut. Vortexuj každou 1-2minuty.
- 8) Promyj špičku pipety chloroformem. Přidej 200 µl chloroformu (stabilizovaným amylenem). Prudce protřepej prudce po dobu 15s, poté zvortexuj.
- 9) Nechej při pokojové teplotě po dobu 5minut. Dvě fáze (vodná a organická) se viditelně oddělí.
- 10) Mezitím si připrav 1,5 ml eppendorfku se 400 µl isopropanolu (sráží RNA), dej chladit na led
- 11) Po rozdělení dvou fází a interfáze (genomická DNA) dej do centrifugy na 12.000g/15min/4°C.
- 12) Odeber přesně 400 µl horní vodné bezbarvé fáze do připravené eppendorfky s isopropanolem. V případě nasátí interfáze s gDNA znovu stoč.
- 13) Nechej probíhat srážení RNA 30minut na ledu
- 14) Dej vzorek do centrifugy na 22.000g/20min/4°C, poté odstraň všechnu tekutinu (isopropanol). Zůstane pelet na dně eppendorfky.

- 15) Omyj peletu 500  $\mu\text{l}$  75%EtOH v DEPC H<sub>2</sub>O (-20°C), následně opatrně zamíchej (5x) otočením eppendorfky. Peleta se uvolní od stěny.
- 16) Dej do centrifugy na 22.000/5min/4°C, odstraň všechnu tekutinu. Použij nejdříve 1000  $\mu\text{l}$  pipetu, dej na led, stoč 2 zkumavky najednou, a opatrně odstraň zbytek tekutiny pomocí 200  $\mu\text{l}$  pipety
- 17) Vysuš pelet (5-6min) na vzduchu na velké čisté Petriho misce.
- 18) Rozpusť peletu ve 12  $\mu\text{l}$  DECP H<sub>2</sub>O, poklepej na eppendorfku a dvakrát stoč. Následně zahřej na 70°C/5minut, a dej do boxu na led, poklepej a stoč.
- 19) Použij 2  $\mu\text{l}$  pro změření RNA koncentrací na přístroji NanoDrop, podle výsledků rozpusť zbývajících 50  $\mu\text{l}$  na finální koncentraci 1  $\mu\text{g}$  celkové RNA/1  $\mu\text{l}$

### 3.3.2 Ošetření DNÁsou (DNA treatment)

Chemikálie: DEPC H<sub>2</sub>O, 10x DNase I reakční pufr, DNase I (Ambion, Life Technologies, Foster City, CA, USA), isopropanol, glykogen, 75% EtOH v DEPC H<sub>2</sub>O, EDTA

- 1) Nastav heater na 65°C.
- 2) Smíchej přesně 5  $\mu\text{l}$  (5  $\mu\text{g}$ ) tRNA a přidej 20  $\mu\text{l}$  MM:

**Tab. 1:** Tabulka sloužící pro výpočet MM pro 9 vzorků.

MM 1x:	MM 9x:
2,5 $\mu\text{l}$ 10x DNase I Reaction buffer	22,5 $\mu\text{l}$ 10x DNase I Reaction buffer
15 $\mu\text{l}$ DEPC H <sub>2</sub> O	135 $\mu\text{l}$ DEPC H <sub>2</sub> O
2,5 $\mu\text{l}$ DNase I	22,5 $\mu\text{l}$ DNase I
Total: 20 $\mu\text{l}$	Total: 180 $\mu\text{l}$ $\div$ 9 = 20 $\mu\text{l}$

- 3) Jemně promíchej a nechej inkubovat při pokojové teplotě přesně na 15 minut. V mezičase si připrav EDTA, isopropanol, glykogen a zvortexuj.
- 4) Přidej 2,5  $\mu\text{l}$  25 mM EDTA.
- 5) Zahřej na 10 minut v 65°C v heateru, krátce stoč na stolní centrifuze.
- 6) Přidej 27,5  $\mu\text{l}$  isopropanolu.
- 7) Přidej 2  $\mu\text{l}$  glykogenu, promíchej otočením eppendorfky a nechej srážet 30 minut na ledu. Poté opět zvortexuj a stoč.
- 8) Dej do centrifugy na 22 000g/20 min/4°C , opatrně odstraň tekutinu.
- 9) Promyj vzniklou peletu 500  $\mu\text{l}$  75% EtOH v DEPC H<sub>2</sub>O (- 20°C) a šetrně promíchej obracením (5x) eppendorfky

- 10) Dej do centrifugy na 22 000g/5min/4°C, poté odstraň veškerou tekutinu. Nejdříve použij 1000 µl pipetu, dej na led, zvortexuj a 2x stoč dvě zkumavky najednou a odeber pomocí 200 µl pipety zbytek tekutiny
- 11) Vysuš peletu na velké, čisté Petriho misce po dobu 5-6 minut.
- 12) Rozpusť peletu v 5,5 µl DEPC H<sub>2</sub>O. Poklepej na eppendorfku aby se peleta uvolnila a dvakrát stoč.
- 13) Ujisti se, že je eppendorfka dobře uzavřená a zahřej na 70°C/5 min, ochlad' na ledu, poklepej a stoč.
- 14) Celý obsah uchovej při -80°C do dalšího kroku reverzní transkripce.

### 3.3.3 Reverzní transkripce (Reverse transcription)

V reverzní transkripci získám z celkové RNA(tRNA) jen mRNA, díky Oligo(dt) 23 anchored primeru. A mRNA současně přepisují pomocí enzymu Superskript III na cDNA, která slouží jako templát pro PCR polymerázu.

Chemikálie: Oligo (dt) 23 anchored primer (500 ng/ µl) (Sigma-Aldrich), 10mM dNTP mix, DEPC H<sub>2</sub>O, 5x First Strand buffer (ze Superskript kitu), 0,1 M DTT(ze Superskript kitu), 40U/ µl RNasin (z RT System kitu), 200 U/ µl Superskript III(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

- 1) Nastav si termocyklér (T3000, Biometra) na 70°C
- 2) Nachystej si eppendorfky a řádně si je popiš a seřaď
- 3) Přichystej si MM pro 44 vzorků dle tabulky č. 2:

**Tab. 2:** Tabulka pro výpočet MM na 44 vzorků.

1x premix:	44x premix:
1 µl Oligo (dt) 23 anchored primer (500 ng/ µl)	44 µl Oligo (dt) 23 anchored primer (500 ng/ µl)
1 µl 10mM dNTP mix	44 µl 10mM dNTP mix
6 µl sterilní voda	264 µl sterilní voda
Total: 8 µl	Total: 352 µl ÷ 44= 8 µl

- 4) Namíchej 5 µl tRNA ošetřené DNAsou s 8 µl premixu
- 5) Zahřej v heat bloku v 65°C na 10 minut (rozvolní se RNA sekundární struktury)
- 6) Ochlad' na ledu, inkubuj na ledu po dobu 1 minuty a poté zvortexuj a stoč.

7) Nachystej si MM2 dle tabulky č. 3

**Tab. 3:** Tabulka pro výpočet premixu MM2 pro 44 vzorků.

1x premix:	44x premix:
4 $\mu$ l 5x First Strand buffer	176 $\mu$ l 5x First Strand buffer
2 $\mu$ l 0,1 M DTT	88 $\mu$ l 0,1 M DTT
0,25 $\mu$ l 40U/ $\mu$ l RNasin	11 $\mu$ l 40U/ $\mu$ l RNasin
0,75 $\mu$ l 200 U/ $\mu$ l Superskript III	33 $\mu$ l 200 U/ $\mu$ l Superskript III
Total: 7 $\mu$ l	Total: 308 $\mu$ l $\div$ 44= 7 $\mu$ l

8) Přidej 7  $\mu$ l MM2 do každého vzorku (výsledný objem vzorku bude 20  $\mu$ l).

9) Inkubuj v T3000 PCR bloku

46°C /2 hodiny

65°C /15 minut

0°C / 10 minut

10) Ochlad' na ledu

11) Nařeď 25x (přidej 480  $\mu$ l sterilní vody), zamíchej, zvortexuj a stoč

12) Vytvoř si 3 aliquoty po 44  $\mu$ l a ulož je do -80°C (spolu se zbývající cDNA)

### 3.3.4 qPCR metoda

V tomto kroku byla použita metoda RT-qPCR (Real-time/quantitative polymerase chain reaction). Metoda slouží pro kvantifikaci DNA a transkripce. Je založená na klasické PCR metodě, ale s cyclerem, který v průběhu PCR kontinuálně zaznamenává množství DNA v průběhu cyklů. Detekci množství DNA umožňuje fluorescenční substrát (SYBR G), který se váže na přítomnou DNA, a vyzařuje fluorescenci až po navázání DNA. Hladina fluorescence je detekována detektorem a odráží množství přítomné DNA.

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

Tato analýza je tvořená na 96 - jamkových destičkách (BioRad)

1) Rozpusť si aliquoty cDNA z předchozího kroku na ledu, a použij organizér

2) Připrav si qPCR MM podle tabulky č. 4:

**Tab. 4:** Tabulka pro výpočet MM mixu.

1x MM:	20 x MM:
10 µl LA mix	200 µl LA mix
3,4 µl sterilní voda	68 µl sterilní voda
0,8 µl SYBR G	16 µl SYBR G
5 µl cDNA	100 µl cDNA
0,4 µl Primer up	8 µl Primer up
0,4 µl Primer down	8 µl Primer down
Total: 20 µl	Total: 400 µl ÷20= 20 µl

- 3) Napipetuj do 96-jamkové destičky 5 µl cDNA a přidej 15 µl MM.
- 4) Sklepni destičky, aby se nic nedrželo na stranách.
- 5) Přikryj destičky fólií, aniž by ses dotknul horní části prsty, a upevni pomocí špachtle
- 6) Umísti destičky do PCR termocykléru (BioRad, CFX96 Thermal Light Cyclcer)
- 7) Zahaj proces qPCR:
  - 95°C/ 3min
  - 94°C/ 15 sec
  - 60°C/ 30 sec
  - 72°C/ 30 sec
  - 95°C/ 15 sec



## 4. Výsledky

Hodnoty z PCR byly vyhodnoceny podle parametrů EFF a CT uvedených v tabulce na obr. 8. Z těchto hodnot měřených u vzorků v LD3,SD3,SD6,SD10,SDA10, ve třech opakování (A-C) byla vypočítána ddct hodnota, ta byla zprůměrována a dosazena pro zhotovení barevné škály transkriptů (obr. 26).

Z horního grafu na obrázku 9, jsme získali hodnotu CT, která byla přímým výstupem RT-qPCR. CT je kritická hodnota, kdy se začíná zvedat křivka a exponenciálně přibývat produktu. Stroj CFX96 PCR light cycler stanovuje optimální hodnotu CT podle zabudovaného algoritmu pro všechny křivky ve všech cyklech. Pokud je tedy vysoké CT, znamená to, že na začátku bylo velké množství targetu, a křivka bude exponenciálně růst dříve.

Dolní graf na obrázku 9 zobrazuje melting analýzu, kde je vidět že bylo měřeno správně, protože má jen jeden peak s teplotou tání 80,5°C, v každé reakci byl amplifikován jen jeden produkt.

Hodnotou EFF se rozumí eficeience. Eficieience odpovídá páru primeru, a teoretickému zdvojnásobení množství produktu při každém kroku PCR. Každý pár primeru má svoji eficeience. Naše eficeience byla stanovena arbitrárně na hodnotu 1,85.

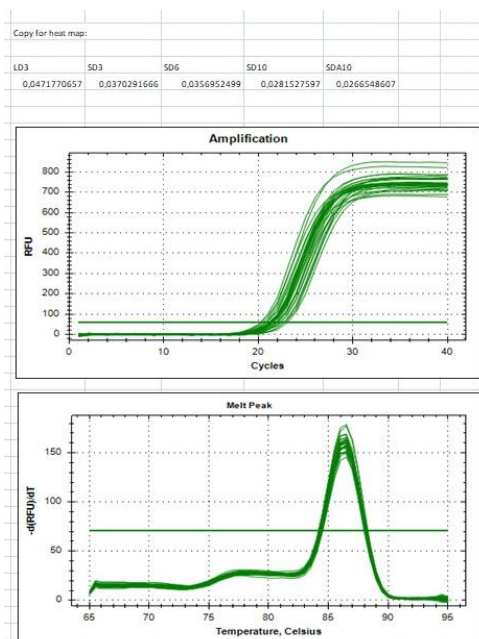
Hodnoty ddct (obr. 8) byly vypočítány podle vztahu:  $ddct = \frac{EFF_{ref}^{CT_{ref}}}{EFF_{target}^{CT_{target}}}$

V našem měření byla použita neměnná reference 5μl pro reakci (1mg/ μl), a další referencí byly 4 referenční geny (RP-ribosomální protein). RP jsou ribosomální proteiny kodující geny, které se syntetizují v buňkách se stejnou frekvencí. Hodnota CT je tedy pro referenci ve všechno krocích velmi podobná.

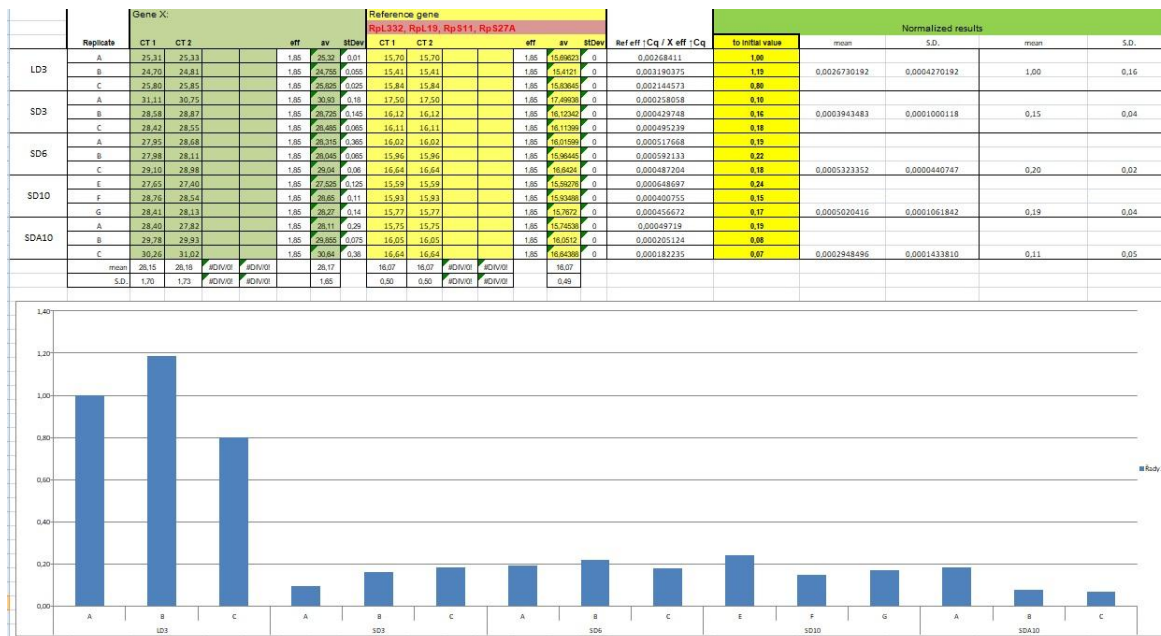
**Obr. 8:** Excelová tabulka s výsledky RT-qPCR měřených u larev v LD3,SD3,SD6,SD10 a SDA10 u transkriptu *Matrix metalloproteinase 1* (Mmp1). Jsou zde uvedené hodnoty ddct, které byly převedeny na barevnou škálu (obr. 26). Hodnoty CT jsou v doubletech (CT1, CT2), ve třech opakování (A-C). Dolní sloupcový graf zobrazuje expresi genů.



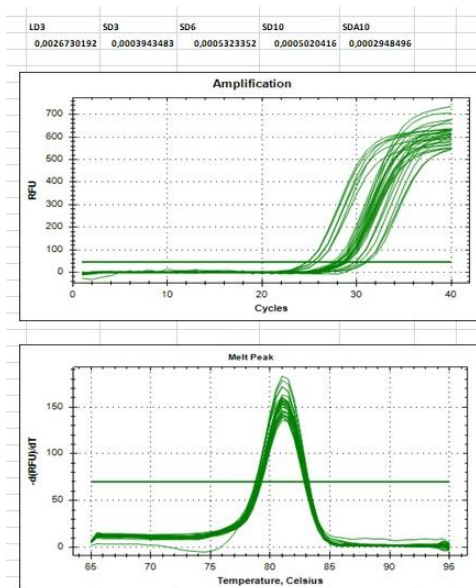
**Obr. 9:** Horní graf obsahuje záznam snímání fluorescence během jednotlivých cyklů (celkem 40) přístrojem Light-Cycler. Proměřované vzorky obsahovaly hodnoty získané z celých larev *C. Costata*. Spodní graf pro kontrolu správnosti zobrazuje melting analýzu pro Mmp1 s jedním peakem s teplotou tání 80,5°C. V horní části obrázku vidíme zprůměrované výsledné hodnoty ddct, sloužící pro tabulku transkriptů s barevnou škálou (obr. 26).



**Obr. 10:** Tabulka s výsledky RT-qPCR měřených u larev v LD3,SD3,SD6,SD10 a SDA10 u transkriptu *Matrix metalloproteinase 2* (Mmp2). V tabulce jsou vypočítané a zprůměrované hodnoty ddct, směrodatné pro souhrnnou tabulku transkriptů (obr. 26).



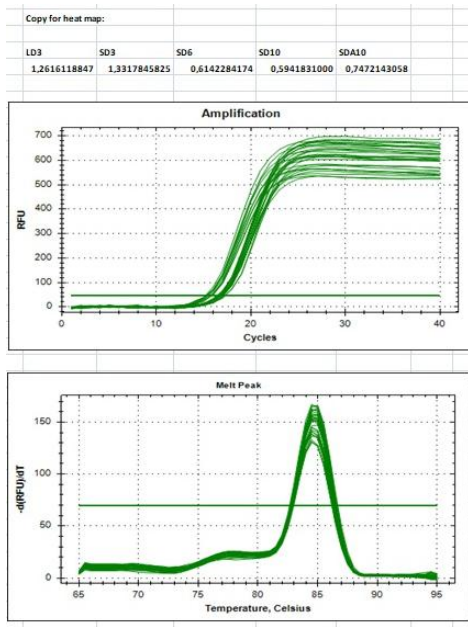
**Obr. 11:** Číselná řada zobrazuje zprůměrované hodnoty ddct pro *Matrix metalloproteinase 2* vypočítané v tabulce na obrázku 10. Horní graf obsahuje záznam snímání fluorescence během jednotlivých cyklů (celkem 40) přístrojem Light-Cycler, ze kterého byly snímány hodnoty CT. Proměřované vzorky obsahovaly hodnoty získané z celých larev *C.Costata*. Spodní graf pro kontrolu správnosti zobrazuje melting analýzu pro Mmp2 s jedním peakem s teplotou tání 80,5°C.



**Obr. 12:** Tabulka s výsledky RT-qPCR měřených u larev v LD3,SD3,SD6,SD10 a SDA10 u transkriptu *Brachyurin* (Brach). Jsou zde vypočítané a zprůměrované hodnoty ddct, směrodatné pro tabulku transkriptů (obr. 26).

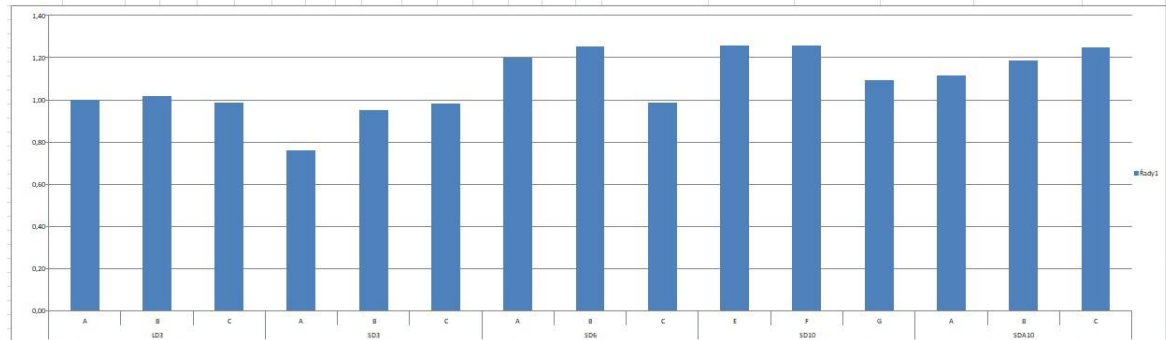


**Obr. 13:** Číselná řada zobrazuje zprůměrované hodnoty ddct pro Brach vypočítané v tabulce na obrázku 12. Horní graf obsahuje záznam snímání fluorescence během jednotlivých cyklů (celkem 40) přístrojem Light-Cycler, ze kterého byly snímány hodnoty CT. Proměřované vzorky obsahovaly hodnoty získané z celých larev *C.Costata*. Spodní graf pro kontrolu správnosti zobrazuje melting analýzu pro Brach s jedním peakem.

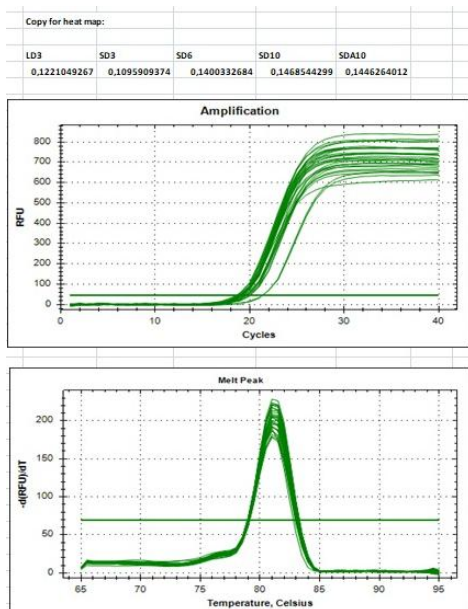


**Obř. 14:** Tabulka s výsledky RT-qPCR měřených u larev v LD3,SD3,SD6,SD10 a SDA10 u transkriptu *Amino peptidase P* (Apep) s daty ddct.

	Gene X:				Reference gene				Normalized results								
	Replicate	CT 1	CT 2	eff	av	stDev	CT 1	CT 2	eff	av	stDev	Ref eff   Cq / X eff   Cq	to initial value	mean	S.D.	mean	S.D.
LD3	A	19.10	19.13	1.85	19.115	0.015	15.70	15.70	1.85	15.69620	0	0.122067718	1.00				
	B	19.03	18.58	1.85	18.805	0.225	15.41	15.41	1.85	15.4121	0	0.124026233	1.02	0.1221049267	0.0015537727	1.00	0.01
	C	19.37	19.19	1.85	19.28	0.08	15.84	15.84	1.85	15.83647	0	0.120220839	0.98				
SD3	A	21.35	21.38	1.85	21.365	0.015	17.50	17.50	1.85	17.49837	0	0.092778836	0.76				
	B	19.67	19.58	1.85	19.625	0.045	16.11	16.11	1.85	16.12567	0	0.116059501	0.95	0.1095909374	0.0120365026	0.90	0.10
	C	19.70	19.42	1.85	19.56	0.14	16.11	16.11	1.85	16.11284	0	0.120038975	0.98				
SD6	A	19.22	19.06	1.85	19.14	0.08	16.02	16.02	1.85	16.01981	0	0.146336213	1.20				
	B	19.03	19.00	1.85	19.015	0.015	15.86	15.86	1.85	15.86441	0	0.153101786	1.25				
	C	20.08	20.08	1.85	20.08	0	16.64	16.64	1.85	16.6424	0	0.120661806	0.99	0.1400332684	0.0139733892	1.15	0.11
SD10	E	18.68	18.60	1.85	18.64	0.04	15.59	15.59	1.85	15.59270	0	0.153413304	1.26				
	F	19.08	18.88	1.85	18.98	0.1	15.93	15.93	1.85	15.93487	0	0.153613689	1.26				
	G	19.00	19.08	1.85	19.04	0.04	15.77	15.77	1.85	15.7672	0	0.133362296	1.09	0.14688044299	0.0094176878	1.20	0.08
SDA10	A	19.16	18.81	1.85	18.985	0.175	15.75	15.75	1.85	15.7625	0	0.130390104	1.12				
	B	19.14	19.22	1.85	19.19	0.03	16.05	16.05	1.85	16.0513	0	0.145011541	1.19				
	C	19.88	19.51	1.85	19.7	0.19	16.64	16.64	1.85	16.64381	0	0.152577559	1.23	0.1446264012	0.0066548002	1.18	0.05
	mean	19.43	19.30			19.37	16.07	16.07									
	S.D.	0.63	0.67			0.62	0.80	0.80			0.49						

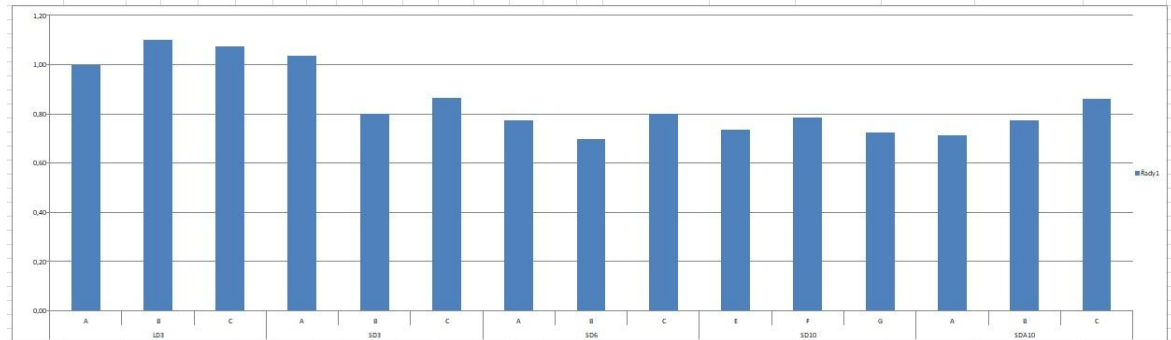


**Obř. 15:** Číselná řada zobrazuje zprůměrované hodnoty ddct pro Apep vypočítané v tabulce na obrázku 14. Horní graf obsahuje záznam snímání fluorescence během jednotlivých cyklů (celkem 40) přístrojem Light-Cycler, ze kterého byly snímány hodnoty CT. Proměřované vzorky obsahovaly hodnoty získané z celých larev *C. Costata*. Spodní graf pro kontrolu správnosti zobrazuje melting analýzu pro Apep s jedním peakem.

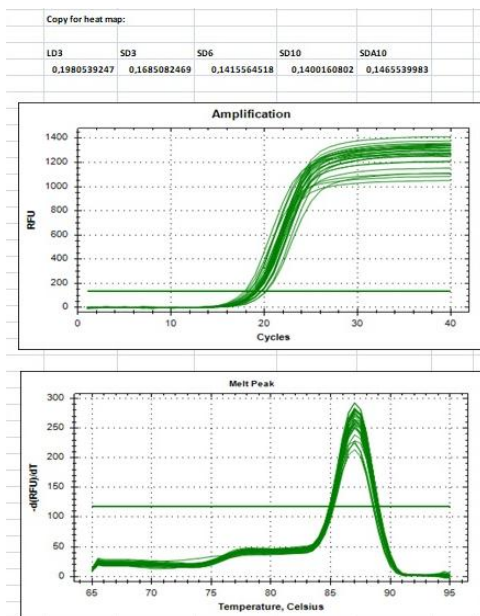


**Obr. 16:** Tabulka s výsledky RT-qPCR měřených u larev v LD3,SD3,SD6,SD10 a SDA10 u transkriptu *Angiotensin converting enzyme, dipeptidase A* (Ance) s daty ddct pro obr. 26.

Replicate	Gene X:				Reference gene				RefEff	iCq	X	Eff	iCq	Normalized results			
	CT1	CT2	Eff	SDDev	CT1	CT2	Eff	SDDev						to initia value	mean	S.D.	mean
LD3	A	18.34	18.50	1.85	18.42	0.08	15.70	15.70	1.85	15.8923	0	0.187191022	1.00				
	B	17.88	18.08	1.85	17.98	0.1	15.41	15.41	1.85	15.4721	0	0.206023888	1.18	0.1980539247	0.0079572015	1.00	0.04
	C	18.26	18.63	1.85	18.445	0.186	15.84	15.84	1.85	15.8365	0	0.200940792	1.07				
SD3	A	20.12	20.21	1.85	20.165	0.045	17.50	17.50	1.85	17.4993	0	0.19408555	1.04				
	B	19.14	19.38	1.85	19.21	0.07	16.12	16.12	1.85	16.1242	0	0.149745224	0.88	0.1685082469	0.0186878547	0.85	0.09
	C	18.99	19.16	1.85	19.075	0.085	16.11	16.11	1.85	16.1138	0	0.164170962	0.86				
SD6	A	19.07	19.25	1.85	19.18	0.09	16.02	16.02	1.85	16.0198	0	0.144546765	0.77				
	B	19.25	19.30	1.85	19.275	0.025	15.96	15.96	1.85	15.9642	0	0.132471486	0.79				
	C	19.72	19.74	1.85	19.73	0.01	16.64	16.64	1.85	16.6421	0	0.149651105	0.86	0.1415564518	0.0081105249	0.71	0.04
SD10	E	19.83	19.80	1.85	19.815	0.015	15.59	15.59	1.85	15.5976	0	0.13775319	0.74				
	F	19.07	19.04	1.85	19.055	0.015	15.93	15.93	1.85	15.9348	0	0.14668714	0.78				
	G	19.05	18.98	1.85	19.015	0.035	15.77	15.77	1.85	15.7673	0	0.133605911	0.72	0.1400160802	0.0047980640	0.71	0.02
SDA10	A	19.08	18.96	1.85	19.02	0.06	15.71	15.71	1.85	15.7433	0	0.13386841	0.71				
	B	19.17	19.21	1.85	19.18	0.02	16.05	16.05	1.85	16.0512	0	0.145011541	0.77				
	C	19.59	19.61	1.85	19.61	0.02	16.64	16.64	1.85	16.6438	0	0.161263513	0.86	0.1465539983	0.0114327076	0.74	0.06
mean	19.04	19.12		19.08		16.07	16.07		16.07								
S.D.	0.58	0.50		0.51		0.50	0.50		0.48								

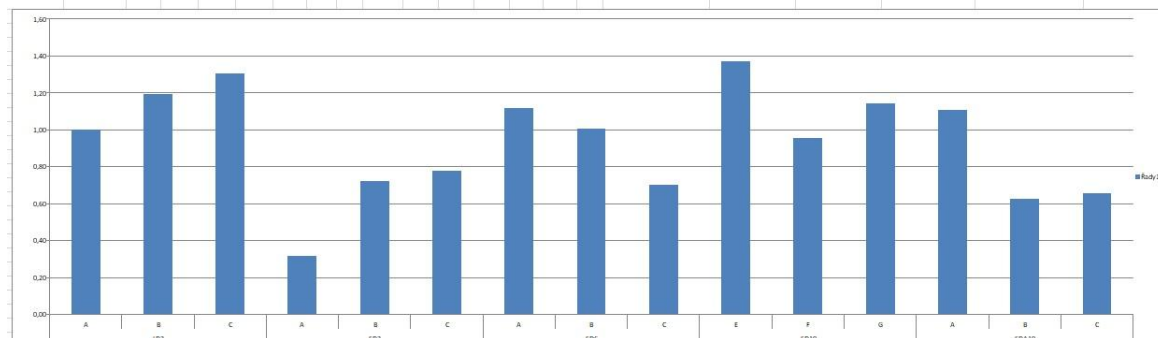


**Obr. 17:** Číselná řada zobrazuje zprůměrované hodnoty ddct pro Ance vypočítané v tabulce na obrázku 16. Horní graf obsahuje záznam snímání fluorescence během jednotlivých cyklů (celkem 40) přístrojem Light-Cycler, ze kterého byly snímány hodnoty CT. Proměřované vzorky obsahovaly hodnoty získané z celých larev *C. Costata*. Spodní graf pro kontrolu správnosti zobrazuje melting analýzu pro Ance s jedním peakem.

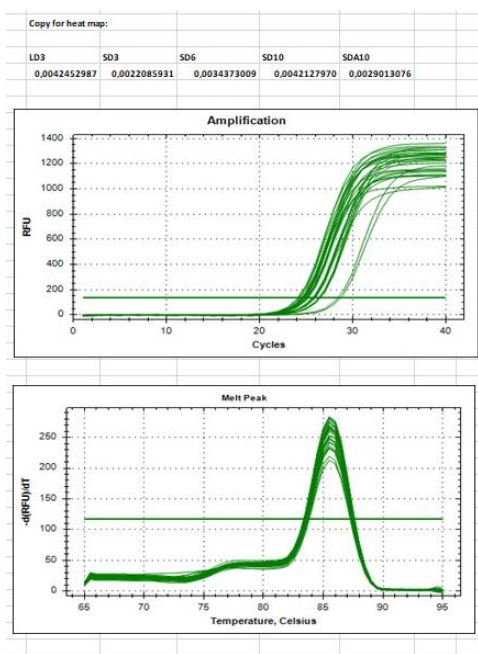


**Obr. 18:** Excelová tabulka s výsledky RT-qPCR měření u larev v LD3,SD3,SD6,SD10 a SDA10 u transkriptu *Prolyl aminopeptidase (ProPep)* s daty ddct pro tabulku v obr. 26

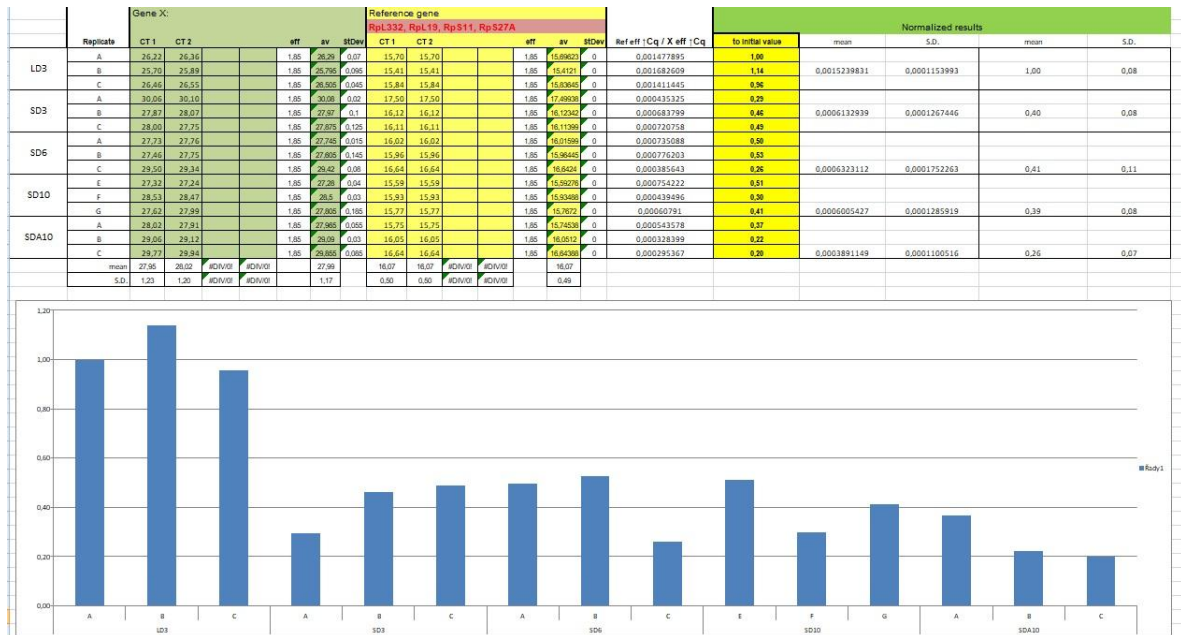
	Gene X:						Reference gene						Normalized results				
	Replicate	CT1	CT2	eff	sv	SDDev	CT1	CT2	eff	sv	SDDev	Ref eff / Cq / X eff / Cq	to initial value	mean	S.D.	mean	S.D.
LD3	A	24.62	25.03	1.85	24.028	0.005	15.70	15.70	1.85	16.8920	0	0.003639572	1.00				
	B	24.28	24.63	1.85	24.295	0.075	15.81	15.81	1.85	16.4121	0	0.004339398	1.19	0.0042452987	0.0004609912	1.00	0.11
	C	24.50	24.56	1.85	24.53	0.003	15.84	15.84	1.85	16.8265	0	0.004756945	1.21				
SD3	A	28.36	28.63	1.85	28.495	0.135	17.50	17.50	1.85	17.4933	0	0.001154198	0.32	0.0022085931	0.0007497826	0.52	0.18
	B	25.77	25.78	1.85	25.775	0.005	16.12	16.12	1.85	16.1232	0	0.002638582	0.72				
	C	25.67	25.63	1.85	25.65	0.02	16.11	16.11	1.85	16.1138	0	0.002832999	0.78				
SD6	A	24.88	25.04	1.85	24.96	0.08	16.02	16.02	1.85	16.0190	0	0.004077673	1.12				
	B	25.04	25.12	1.85	25.08	0.04	15.95	15.95	1.85	15.9848	0	0.003669304	1.01				
	C	26.34	26.34	1.85	26.34	0	16.64	16.64	1.85	16.6402	0	0.002554925	0.70	0.0034373009	0.0006389840	0.81	0.15
SD10	E	24.15	24.27	1.85	24.21	0.08	15.59	15.59	1.85	15.5925	0	0.004985589	1.37				
	F	25.08	25.19	1.85	25.135	0.095	15.93	15.93	1.85	15.9385	0	0.003483275	0.96				
	G	24.61	24.74	1.85	24.675	0.065	15.77	15.77	1.85	15.7672	0	0.004169526	1.15	0.0042127970	0.0006140794	0.99	0.14
SDA10	A	24.66	24.75	1.85	24.705	0.045	15.75	15.75	1.85	15.7453	0	0.004038704	1.11				
	B	25.94	25.95	1.85	25.945	0.005	16.05	16.05	1.85	16.0511	0	0.002273304	0.62				
	C	26.44	26.47	1.85	26.455	0.015	16.64	16.64	1.85	16.6438	0	0.002391914	0.66	0.0029013076	0.0008057172	0.68	0.19
	mean	25.34	25.46				25.40				16.07	16.07					
	S.D.	1.08	1.07				1.04				0.30	0.30					



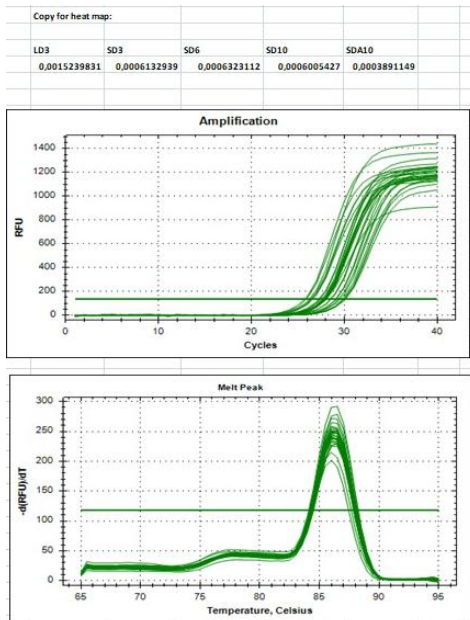
**Obr. 19:** Číselná řada zobrazuje zprůměrované hodnoty ddct pro ProPep vypočítané v tabulce na obrázku 18. Horní graf obsahuje záznam snímání fluorescence během jednotlivých cyklů (celkem 40) přístrojem Light-Cycler, ze kterého byly snímány hodnoty CT. Proměřované vzorky obsahovaly hodnoty získané z celých larev *C. Costata*. Spodní graf pro kontrolu správnosti zobrazuje melting analýzu pro ProPep s jedním peakem.



**Obr. 20:** Tabulka s výsledky RT-qPCR měřených u larev v LD3,SD3,SD6,SD10 a SDA10 u transkriptu *Dipeptidase-like* (DiPep) s vypočítanými, a zprůměrovanými hodnotami ddct, směrodatnými pro tabulku transkriptů (obr. 26).



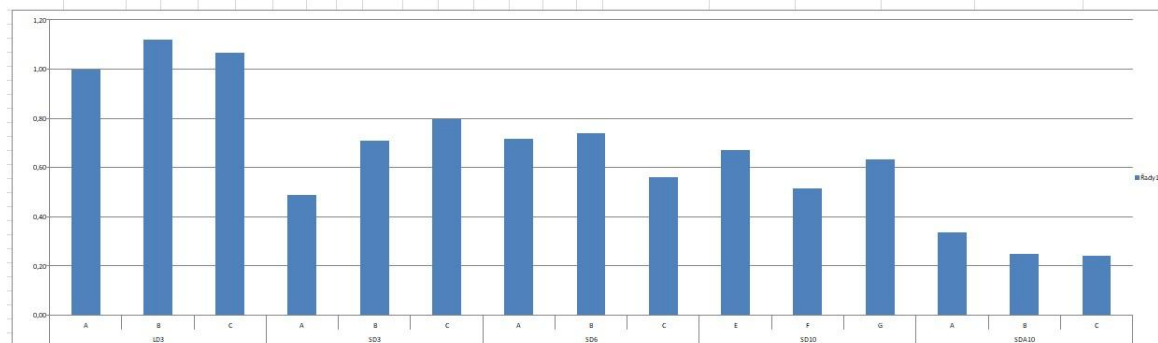
**Obr. 21:** Číselná řada zobrazuje zprůměrované hodnoty ddct pro DiPep vypočítané v tabulce na obrázku 20. Horní graf obsahuje záznam snímání fluorescence během jednotlivých cyklů (celkem 40) přístrojem Light-Cycler, ze kterého byly snímány hodnoty CT. Proměřované vzorky obsahovaly hodnoty získané z celých larev *C. Costata*. Spodní graf pro kontrolu správnosti zobrazuje melting analýzu pro DiPep s jedním peakem.



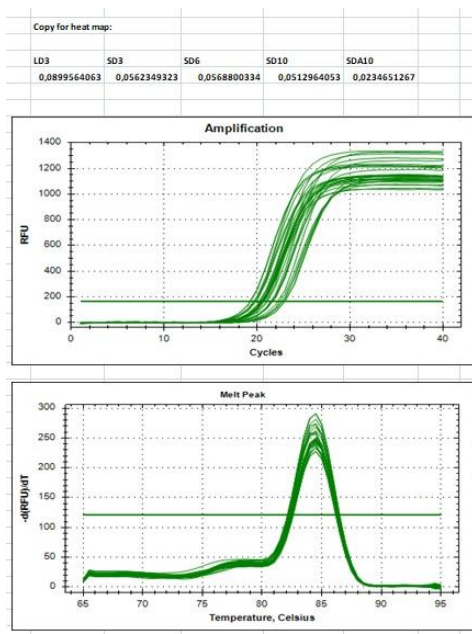


**Obr. 22:** Tabulka s výsledky RT-qPCR měřených u larev v LD3,SD3,SD6,SD10 a SDA10 u transkriptu *Dipeptidase B* (Dip B) s vypočítanými a zprůměrovanými hodnotami ddct, směrodatnými pro tabulku s relativní četností transkriptů (obr. 26).

	Gene X:				Reference gene Rpl.332, Rpl.19, Rp911, Rp927A				rel eff / Cq / X eff / Cq	Normalized results						
	Replicate	CT1	CT2		eff	av	stdDev	CT1		CT2		to initial value	mean	S.D.	mean	S.D.
LD3	A	19.62	19.80		1.85	19.71	0.09	15.70	15.70	1.85	16.9920	0	0.084651303	1.00		
	B	19.22	19.26		1.85	19.24	0.02	15.81	15.81	1.85	16.1121	0	0.294906054	1.18	0.0899564063	0.0041940177
	C	19.61	19.88		1.85	19.745	0.135	15.84	15.84	1.85	16.9265	0	0.090311876	1.07		0.05
SD3	A	22.66	22.70		1.85	22.68	0.02	17.50	17.50	1.85	17.6938	0	0.041293718	0.49		
	B	20.70	20.70		1.85	20.7	0	16.12	16.12	1.85	16.1234	0	0.059877975	0.71	0.0562349323	0.0110175670
	C	20.52	20.47		1.85	20.495	0.025	16.11	16.11	1.85	16.1138	0	0.067533104	0.88		0.12
SD6	A	20.54	20.61		1.85	20.575	0.035	16.02	16.02	1.85	16.0198	0	0.060528565	0.72		
	B	20.50	20.43		1.85	20.465	0.035	15.96	15.96	1.85	16.9648	0	0.062745387	0.74		
	C	21.65	21.55		1.85	21.6	0.05	16.64	16.64	1.85	16.6421	0	0.047366227	0.96	0.0568800334	0.0067878748
SD10	E	20.95	20.21		1.85	20.295	0.065	15.59	15.59	1.85	16.5075	0	0.05090473	0.67		
	F	21.08	20.97		1.85	21.03	0.06	15.93	15.93	1.85	16.9346	0	0.043523907	0.91		
	G	20.64	20.41		1.85	20.525	0.115	15.77	15.77	1.85	16.7671	0	0.053561078	0.63	0.0512964053	0.0056532176
SDA10	A	21.60	21.44		1.85	21.52	0.08	15.75	15.75	1.85	16.7459	0	0.028653916	0.54		
	B	22.43	22.21		1.85	22.32	0.11	16.05	16.05	1.85	16.0511	0	0.021142438	0.25		
	C	22.95	22.96		1.85	22.955	0.005	16.64	16.64	1.85	16.8438	0	0.020599026	0.24	0.0234651267	0.0036757293
	mean	20.94	20.91	#DIV/0!	#DIV/0!	20.52		16.07	16.07	#DIV/0!	#DIV/0!	16.07				
	S.D.	1.09	1.04	#DIV/0!	#DIV/0!	1.03		0.30	0.30	#DIV/0!	#DIV/0!	0.49				

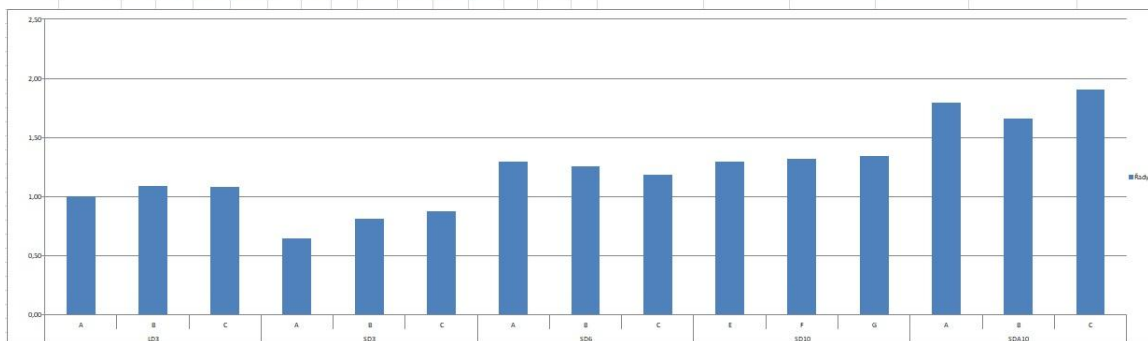


**Obr. 23:** Číselná řada zobrazuje zprůměrované hodnoty ddct pro Dip B vypočítané v tabulce na obrázku 22. Horní graf obsahuje záznam snímání fluorescence během jednotlivých cyklů (celkem 40) přístrojem Light-Cycler, ze kterého byly snímány hodnoty CT. Proměřované vzorky obsahovaly hodnoty získané z celých larev *C.Costata*. Spodní graf pro kontrolu správnosti zobrazuje melting analýzu pro Dip B s jedním peakem.

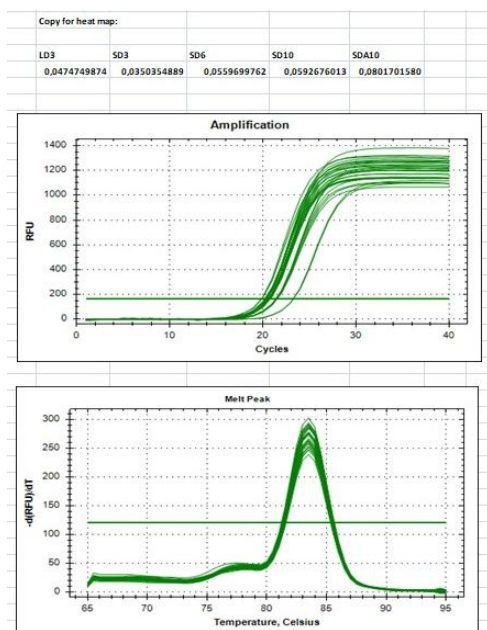


**Obr. 24:** Tabulka s výsledky RT-qPCR měřených u larev v LD3,SD3,SD6,SD10 a SDA10 u transkriptu *Dipeptidase C* (Dip C) s vypočítanými a zprůměrovanými hodnotami ddct, směrodatnými pro tabulku transkriptů (obr. 26).

	Gene X:				Reference gene				Normalized results									
	Replicate	CT1	CT2	ΔCt	av	SDav	CT1	CT2	ΔCt	av	SDav	Ref. eff.   Cq / X. eff.   Cq	to initial value	mean	S.D.	mean	S.D.	
LD3	A	20.73	20.75	1.85	20.74	0.01	15.70	15.70	1.85	15.9922	0	0.044920725	1.88					
	B	20.24	20.40	1.85	20.32	0.08	15.41	15.41	1.85	15.4111	0	0.048830933	1.88	0.0474749874	0.0018074637	1.00	0.04	
	C	20.74	20.76	1.85	20.75	0.01	15.84	15.84	1.85	15.8366	0	0.048867303	1.88					
SD3	A	23.24	23.26	1.85	23.25	0.01	17.50	17.50	1.85	17.4999	0	0.029080114	0.45					
	B	21.50	21.50	1.85	21.5	0	16.17	16.17	1.85	16.1240	0	0.036604099	0.81	0.0350354889	0.0043654225	0.74	0.09	
	C	21.39	21.35	1.85	21.37	0.02	16.11	16.11	1.85	16.1199	0	0.039422254	0.89					
SD6	A	20.61	20.67	1.85	20.64	0.03	16.02	16.02	1.85	16.0199	0	0.058155959	1.29					
	B	20.63	20.64	1.85	20.635	0.005	15.96	15.96	1.85	15.9645	0	0.056514782	1.26					
	C	21.42	21.40	1.85	21.41	0.01	16.84	16.84	1.85	16.8324	0	0.052239189	1.19	0.0559699762	0.0020438963	1.18	0.04	
SD10	E	20.27	20.16	1.85	20.215	0.005	15.99	15.99	1.85	15.9879	0	0.058219377	1.30					
	F	20.50	20.55	1.85	20.525	0.025	15.93	15.93	1.85	15.9399	0	0.059381286	1.22					
	G	20.32	20.35	1.85	20.335	0.015	15.77	15.77	1.85	15.7672	0	0.060202141	1.24	0.0592676013	0.0008134422	1.25	0.02	
SDA10	A	19.87	19.81	1.85	19.84	0.03	15.75	15.75	1.85	15.7438	0	0.08054387	1.79					
	B	20.31	20.24	1.85	20.275	0.035	16.05	16.05	1.85	16.0512	0	0.074391145	1.66					
	C	20.73	20.55	1.85	20.64	0.09	16.64	16.64	1.85	16.6498	0	0.085575459	1.31	0.0801701580	0.0045736175	1.69	0.10	
	mean	20.63	20.63		20.63		16.07	16.07		16.07								
	S.D.	0.79	0.79		0.78		0.90	0.90		0.89								



**Obr. 25:** Číselná řada zobrazuje zprůměrované hodnoty ddct pro Dip C vypočítané v tabulce na obrázku 24. Horní graf obsahuje záznam snímání fluorescence během jednotlivých cyklů (celkem 40) přístrojem Light-Cycler, ze kterého byly snímány hodnoty CT. Proměřované vzorky obsahovaly hodnoty získané z celých larev *C. Costata*. Spodní graf pro kontrolu správnosti zobrazuje melting analýzu pro Dip C s jedním peakem.



Data pro zbylé transkripty (č. 10-38) byly vytvořeny dle stejného postupu. Jejich hodnoty jsou zaznamenány v tabulce na obrázku č. 26.

**Obř. 26:** Tabulka transkriptů a jejich relativní četnosti, vyhodnocené pomocí nástroje barevné škály programu excel. V tabulce jsou zaznamenané průměrné hodnoty ddct všech transkriptů. Dle hodnot byla vytvořena barevná škála zobrazující jejich expresi u různě aklimovaných larev modelového druhu *C.costata*.

		LD3	SD3	SD6	SD10	SDA10
1	Matrix metalloproteinase 1, CG4859	0,0472	0,0370	0,0357	0,0282	0,0267
2	Matrix metalloproteinase 2, CG1794	0,0027	0,0004	0,0005	0,0005	0,0003
3	Brachyurin-like collagenase, XP_017012400	1,2616	1,3318	0,6142	0,5942	0,7472
4	Aminopeptidase P, CG6291	0,1221	0,1096	0,1400	0,1469	0,1446
5	Angiotensin converting enzyme, dipeptidase-A, CG8827	0,1981	0,1685	0,1416	0,1400	0,1466
6	Prolyl aminopeptidase, KOB68397	0,0042	0,0022	0,0034	0,0042	0,0029
7	Dipeptidase-like, CG1654	0,0015	0,0006	0,0006	0,0006	0,0004
8	Dipeptidase-B, CG9285	0,0900	0,0562	0,0569	0,0513	0,0235
9	Dipeptidase-C, CG5663	0,0475	0,0350	0,0560	0,0593	0,0802
10	Nutrient amino acid transporter 1, CG3252	0,0511	0,0087	0,0104	0,0065	0,0203
11	Nutrient amino acid transporter 2, CG15088	0,0026	0,0014	0,0015	0,0012	0,0015
12	Nutrient amino acid transporter 3 & 5, CG4476, CG1698	0,0229	0,0091	0,0154	0,0152	0,0186
13	Nutrient amino acid transporter 4, CG8850	0,0119	0,0061	0,0098	0,0087	0,0054
14	Nutrient amino acid transporter 6, CG15279	0,0115	0,0053	0,0079	0,0097	0,0107
15	Excitatory amino acid transporter 1 (Glu/Na+), CG3747	0,0047	0,0022	0,0028	0,0032	0,0031
16	Neurotransmitter transporter like (Gly, Pro), CG7075	0,0018	0,0001	0,0001	0,0001	0,0000
17	Glycine transporter, CG5549	0,0007	0,0006	0,0005	0,0004	0,0001
18	Inebriated, SLC6 transporter, CG15444	0,0282	0,0199	0,0237	0,0227	0,0203
19	SLC7 CAT transporter similar to Eaa1, CG5535	0,0044	0,0018	0,0015	0,0014	0,0005
20	SLC7 LAT transporter similar to Eaa1, CG1607	0,0402	0,0221	0,0254	0,0251	0,0108
21	Glutaminase, CG42708	0,0180	0,0101	0,0177	0,0224	0,0185
22	Glutamine synthetase 1, CG2718	0,0501	0,0587	0,0379	0,0314	0,0422
23	Glutamine synthetase 2, CG1743	0,03869	0,01344	0,02906	0,01373	0,06388
24	Glutamate dehydrogenase, CG5320	0,1527	0,3576	0,3540	0,3604	0,0999
25	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate synthase, CG7470	0,04549	0,03923	0,05681	0,05715	0,04987
26	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 1, CG7145	0,0120	0,0100	0,0176	0,0248	0,0158
27	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 2, CG33092	0,0028	0,0005	0,0004	0,0003	0,0003
28	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate reductase, CG6009	0,00674	0,0047	0,00574	0,00522	0,00726
29	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate reductase 2-like, CG5840	0,01622	0,01592	0,02291	0,03169	0,08931
30	Proline oxidase (dehydrogenase) , CG1417	0,01532	0,00642	0,0103	0,01246	0,01409
31	Prolyl-4-hydroxylase (collagen), CG31014	0,00319	0,00054	0,00057	0,00078	0,00039
32	Prolyl-4-hydroxylase (HIF-1alpha), CG44015	0,01109	0,00747	0,00977	0,00848	0,00473
33	Arginosuccinate synthase, CG1315	0,00118	0,00962	0,0063	0,00335	0,00017
34	Arginosuccinate lyase, CG9510	0,00336	0,00281	0,00453	0,00579	0,00308
35	Arginase, CG18104	0,00695	0,00616	0,00505	0,00547	0,00493
36	Ornithine aminotransferase, CG8782	0,1132	0,08448	0,08589	0,11377	0,24191
37	Arginine kinase, CG32031	0,56451	0,94168	0,99534	0,67229	0,30173
38	Nitric oxid synthase, CG6713	0,00012	0,00012	0,00011	0,00011	3,6E-05

**Obr. 27:** Vpravo tabulka metabolitů u různě aklimovaných larev

v LD3,SD3,SD6,SD10,SDA10. Vlevo tabulka srovnávací signál metabolitů v log2-fold tvaru, u larev diapauzních SD10/SD3 a chladově aklimovaných SDA10/SD3.

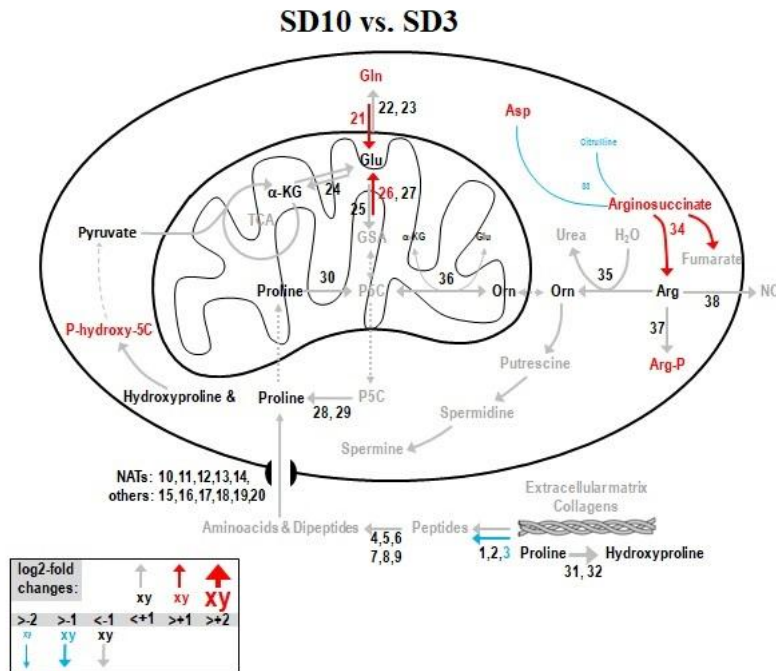
MIN						50% percentil						MAXI																																																																																																																	
formatted as a whole matrix:																																																																																																																													
tribarevná škála																																																																																																																													
percentil: 50																																																																																																																													
LD3						SD3						SD6						SD10						SDA10																																																																																																					
Glutamine	4,4E+09	5,2E+09	1E+10	1,3E+10	4,7E+09	Glutamine	1,27	-0,13	Aspartate	1,8E+07	6,101464	1,4E+07	1,5E+07	7,003360	Aspartate	1,31	0,20	Alanine	6,7E+07	5,6E+07	5,1E+07	9E+07	4E+07	Alanine	0,68	-0,49	alpha-Ketoglutarate	5E+08	5,6E+08	5,1E+08	4,7E+08	3E+08	alpha-Ketoglutarate	-0,25	-0,93	Glutamate	9,8E+08	7,4E+08	6,4E+08	6,7E+08	6,1E+08	Glutamate	-0,14	-0,27	Proline	1,4E+10	1,6E+10	2,1E+10	2,7E+10	3,3E+10	Proline	0,76	1,09	4-Hydroxyproline	3386702	1974336	2080239	2281219	4375819	4-Hydroxyproline	0,21	1,15	Pyrroline 3-hydroxy-5-carboxylate	3,3E+09	3,8E+09	7,5E+09	9,2E+09	3,5E+09	Pyrroline 3-hydroxy-5-carboxylate	1,29	-0,10	Pyruvate	1,7E+07	1,8E+07	1,4E+07	2E+07	8,674646	Pyruvate	0,15	-1,07	Ornithine	5,1E+07	8,6E+07	7E+07	7,9E+07	1,8E+07	Ornithine	-0,12	-2,29	Arginine	4,3E+09	4,7E+09	4,7E+09	4,7E+09	4,2E+09	Arginine	0,02	-0,16	Arginosuccinate	9021601	6375756	1E+07	2E+07	9823354	Arginosuccinate	1,63	0,62	Arginine phosphate	7097223	2,3E+07	4,1E+07	7,8E+07	1,4E+08	Arginine phosphate	1,76	2,56	Citrulline	2,8E+07	3,4E+07	2E+07	8199487	1E+07	Citrulline	-2,03	-1,73

**Obr. 28:** Vpravo tabulka relativní četnosti transkriptů u různě aklimovaných larev

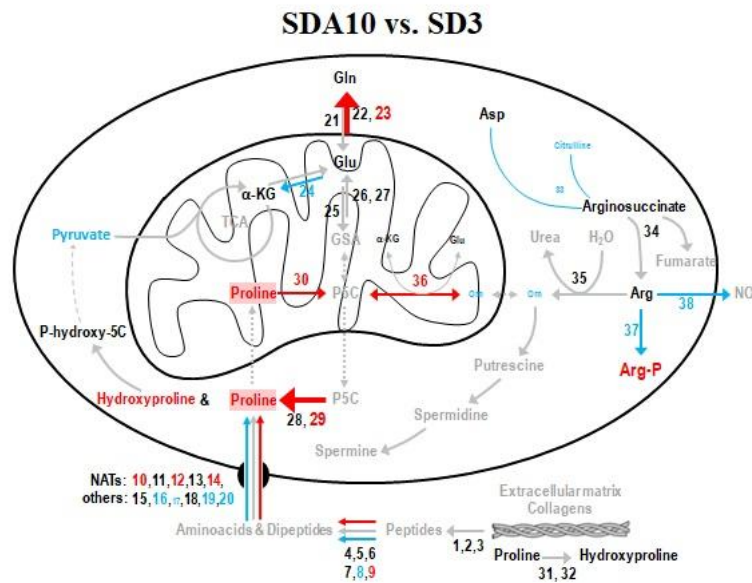
v LD3,SD3,SD6,SD10,SDA10. Vlevo tabulka srovnávací signál transkriptu v log2-fold tvaru, u larev diapauzních SD10/SD3 a chladově aklimovaných SDA10/SD3.

LD3						SD3						SD6						SD10						SDA10																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
1	Matrix metalloproteinase 1, CG4859	0,0472	0,0370	0,0357	0,0282	0,0267	Matrix metalloproteinase 1, CG4859	-0,40	-0,47	2	Matrix metalloproteinase 2, CG1794	0,0027	0,0004	0,0005	0,0005	0,0003	Matrix metalloproteinase 2, CG1794	0,35	-0,42	3	Brachyurin-like collagenase, XP_017012400	1,2616	1,3318	0,6142	0,5942	0,7472	Brachyurin-like collagenase, XP_017012400	-1,16	-0,83	4	Aminopeptidase P, CG6291	0,1221	0,1096	0,1400	0,1469	0,1446	Aminopeptidase P, CG6291	0,42	0,40	5	Angiotensin converting enzyme, dipeptidase-A, CG8827	0,1981	0,1685	0,1416	0,1400	0,1466	Angiotensin converting enzyme, dipeptidase-A, CG8827	-0,27	-0,20	6	Prolyl aminopeptidase, KOB68397	0,0042	0,0022	0,0034	0,0042	0,0029	Prolyl aminopeptidase, KOB68397	0,93	0,39	7	Dipeptidase-like, CG1654	0,0015	0,0006	0,0006	0,0006	0,0004	Dipeptidase-like, CG1654	-0,03	-0,66	8	Dipeptidase-B, CG9285	0,0900	0,0562	0,0569	0,0513	0,0235	Dipeptidase-B, CG9285	-0,13	-1,26	9	Dipeptidase-C, CG5663	0,0475	0,0350	0,0560	0,0593	0,0802	Dipeptidase-C, CG5663	0,76	1,19	10	Nutrient amino acid transporter 1, CG3252	0,0511	0,0087	0,0104	0,0065	0,0203	Nutrient amino acid transporter 1, CG3252	-0,41	1,23	11	Nutrient amino acid transporter 2, CG15088	0,0026	0,0014	0,0015	0,0012	0,0015	Nutrient amino acid transporter 2, CG15088	-0,21	0,13	12	Nutrient amino acid transporter 3 & 5, CG4476, CG1698	0,0229	0,0091	0,0154	0,0152	0,0186	Nutrient amino acid transporter 3 & 5, CG4476, CG1698	0,74	1,03	13	Nutrient amino acid transporter 4, CG8850	0,0119	0,0061	0,0098	0,0087	0,0054	Nutrient amino acid transporter 4, CG8850	0,52	-0,18	14	Nutrient amino acid transporter 6, CG15279	0,0115	0,0053	0,0079	0,0097	0,0107	Nutrient amino acid transporter 6, CG15279	0,89	1,02	15	Excitatory amino acid transporter 1 (Glu/Na+), CG3747	0,0047	0,0022	0,0028	0,0032	0,0031	Excitatory amino acid transporter 1 (Glu/Na+), CG3747	0,52	0,46	16	Neurotransmitter transporter like (Gly, Pro), CG7075	0,0018	0,0001	0,0001	0,0001	0,0000	Neurotransmitter transporter like (Gly, Pro), CG7075	0,05	-1,55	17	Glycine transporter, CG5549	0,0007	0,0006	0,0005	0,0004	0,0001	Glycine transporter, CG5549	-0,51	-2,12	18	Inebriated, SLC6 transporter, CG15444	0,0282	0,0199	0,0237	0,0227	0,0203	Inebriated, SLC6 transporter, CG15444	0,19	0,03	19	SLC7 CAT transporter similar to Eaa1, CG5535	0,0044	0,0018	0,0015	0,0014	0,0005	SLC7 CAT transporter similar to Eaa1, CG5535	-0,36	-1,86	20	SLC7 LAT transporter similar to Eaa1, CG1607	0,0402	0,0221	0,0254	0,0251	0,0108	SLC7 LAT transporter similar to Eaa1, CG1607	0,18	-1,03	21	Glutaminase, CG42708	0,0180	0,0101	0,0177	0,0214	0,0185	Glutaminase, CG42708	1,15	0,87	22	Glutamine synthetase 1, CG2718	0,0501	0,0587	0,0379	0,0314	0,0422	Glutamine synthetase 1, CG2718	-0,90	-0,47	23	Glutamine synthetase 2, CG1743	0,03869	0,01344	0,02906	0,01373	0,06388	Glutamine synthetase 2, CG1743	0,03	2,25	24	Glutamate dehydrogenase, CG5320	0,1527	0,3576	0,3540	0,3604	0,0999	Glutamate dehydrogenase, CG5320	0,01	-1,84	25	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate synthase, CG7470	0,04549	0,03523	0,05681	0,05715	0,04987	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate synthase, CG7470	0,54	0,35	26	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 1, CG7145	0,0120	0,0100	0,0176	0,0248	0,0158	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 1, CG7145	1,30	0,66	27	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 2, CG33092	0,0028	0,0005	0,0004	0,0003	0,0003	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase 2, CG33092	-0,68	-0,85	28	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate reductase, CG6009	0,00674	0,0047	0,00574	0,00522	0,00726	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate reductase, CG6009	0,15	0,63	29	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate reductase 2-like, CG5840	0,01622	0,01592	0,02291	0,03169	0,08931	delta-1-Pyrroline-5-carboxylate reductase 2-like, CG5840	0,99	2,49	30	Proline oxidase (dehydrogenase), CG1417	0,01532	0,00642	0,0103	0,01246	0,01409	Proline oxidase (dehydrogenase), CG1417	0,96	1,13	31	Prolyl-4-hydroxylase (collagen), CG31014	0,00319	0,00054	0,00067	0,00078	0,00039	Prolyl-4-hydroxylase (collagen), CG31014	0,52	-0,49	32	Prolyl-4-hydroxylase (HIF-1alpha), CG44015	0,01109	0,00747	0,00977	0,00848	0,00473	Prolyl-4-hydroxylase (HIF-1alpha), CG44015	0,18	-0,66	33	Arginosuccinate synthase, CG1315	0,00118	0,00962	0,0063	0,00335	0,00017	Arginosuccinate synthase, CG1315	-1,52	-5,79	34	Arginosuccinate lyase, CG9510	0,00336	0,00281	0,00453	0,00579	0,00308	Arginosuccinate lyase, CG9510	1,04	0,13	35	Arginase, CG18104	0,00695	0,00616	0,00505	0,00547	0,00493	Arginase, CG18104	-0,17	-0,32	36	Ornithine aminotransferase, CG8782	0,1132	0,08448	0,08589	0,11377	0,24191	Ornithine aminotransferase, CG8782	0,43	1,52	37	Arginine kinase, CG32031	0,56451	0,94168	0,99534	0,67229	0,30173	Arginine kinase, CG32031	-0,49	-1,64	38	Nitric oxid synthase, CG6713	0,00012	0,00012	0,00011	0,00011	3,6E-05	Nitric oxid synthase, CG6713	-0,16	-1,71

**Obr. 29:** Schéma metabolismu prolinu za tepla s vybarvenými metabolickými drahami vedoucími k prolinu. Schéma vychází z dat získaných srovnáním relativní četnosti transkriptů u larev aklimovaných v SD10 a SD3 z obr. 28.



**Obr. 30:** Schéma metabolismu prolinu za chladu s vybarvenými metabolickými drahami signalizujícími změny. Schéma vychází z dat získaných v tabulce na obr. 28



## 5. Diskuze

Z dat v obrázku 27 a 28 byly sestaveny tloušťky šipek v metabolismu za tepla (obr. 29) a chladu (Obr. 30). Hodnoty v tabulkách byly v logaritmických řadách (ve tvaru  $\log_2$ ), kdy hodnota v tabulce například 2x větší přibyla ve skutečnosti 4x. V závislosti na velikosti změny byly zhotovené barevné šipky v metabolismech prolinu. Látky, které byly zvýrazněné tenkou modrou šipkou ve skutečnosti nejvíce ubývaly. Látky, které měly širokou červenou šipku přibývaly nejvíce. Takto byl splněn úkol zaplnit slepou mapu metabolismu změnou signálu transkriptů za tepla a chladu. Naším cílem bylo zhodnotit aktivitu metabolitů a transkriptů na základě schémat v teple (obr. 29) a chladu (Obr. 30).

Na otázku jak se změnila relativní četnosti transkriptů kódující enzymy bylo odpovězeno v tabulce v obrázku č. 28, kde srovnáváme naměřené hodnoty mezi jednotlivými aklimovanými stádii larev.

Podle našich výše uvedených výsledků (obr. 27) se u chladem aklimovaných larev *C. Costata* akumuluje nejvýrazněji prolin, jakožto jeden z metabolitů vedle trehalózy, betainu. (Košťál, nepublikované výsledky). Otázkou bylo, odkud se tento metabolit akumuloval. Nabízela se hypotéza, že prolin pochází z extracelulární matrix z kolagenu. Tato hypotéza nebyla jednoznačně potvrzena, ale nešlo ji ani vyloučit. Faktem zůstává, že cesty vedoucí od kolagenu z prolinu jsou upregulované, ale některé i downregulované, nelze tedy hypotézu jednoznačně potvrdit.

Podle schéma na obr. 29 za tepla dochází k hromadění arginifosfátu (Arg-P), který je spojen s enegetickým metabolismem. Dále se hromadí P-hydroxy-5C, glutamin a glutamát. Avšak okolo prolinu nedochází za tepla k žádným změnám. Zmenšuje se rozklad kolagenu, ve kterém je prolin uložen. Kolageny tvoří více než 50% všech proteinů a jsou v nich uloženy glycin, prolin, nebo hydroxyprolin. V teple tedy nedochází k žádným změnám týkajících se akumulace prolinu z kolagenních vláken.

Naopak v chladu lze pozorovat řadu významných změn. První z nich je stydnutí (zmenšování) okolí argininu na rozdíl od schématu v teple. Je však logické, že se budou snižovat dráhy související s energetickým metabolismem, když jsou larvy vystaveny chladové aklimaci a mají pozastaven vývoj, šetří energii, a jejich metabolismus je výrazně zpomalen. Dochází k hromadění arginofosfátu, zřejmě díky jeho nepotřebnosti v chladu.

V okolí prolinu lze očekávat více změn díky jeho extrémním hladinám (0,5M). Pozorujeme rozklad peptidů na aminokyseliny a dipeptidy, a výrazně je ovlivněn i transport do cytosolu. Mezi transportéry jsou zařazeny mimo jiné i transportéry prolinu a hydroxyprolinu které se hromadí. Bohužel transkriptů 1-3 (Mmp1, Mmp2, a Brachyurin) se nezměnily. Očekávali jsme aktivaci kolagenázy (3), bohužel ta se nám nijak neprojevila. Do metabolismu vedoucího od kolagenu se ovšem řadí i kolagenáza, která je aktivní stále, a je možné, že její produkce štěpů z kolagenu je dostatečná. Další dráhy vedoucí k prolinu však vykazují aktivitu. Peptidáza (9) se zvyšuje, a transportéry 10,12,14 se zvyšují také. Není zatím známo, jaké látky tyto transportéry vedou do buňky, domníváme se ale, že transportér 10 transportuje mimo jiné i prolin. Velkým důkazem toho, že by se skutečně prolin akumulovat z kolagenu je i velké hromadění hydroxyprolinu, který se nemůže vyskytovat v buňce jinde než v kolagenu. Až rozkladem kolagenu dostaneme hydroxyprolin, který se od kolagenu musel nějak dostat do cytosolu z extracelulárního prostoru. Hypotéza je tedy potvrzená jen částečně. Nelze na otázku jednoznačně odpovědět, protože neznáme regulaci mezi mRNA a metabolity, a jejich studie by byla velice náročná. Nám se však podařilo uskutečnit první krok na úrovni transkriptů.

V chladu dochází také k rozkladu prolinu na svůj nestálý intermediát P5C. Enzym, který způsobuje konverzi je upregulovaný(30). Enzymy, které vrací prolin zpět (28,29) jsou ale také upregulované, nedochází tedy ke ztrátám prolinu. Degradace je tedy slabší. Dochází zároveň ke konverzi mezi prolinem a ornitinem (36), který ubývá.

Dále bylo naším cílem najít další kandidáty pro pokračování výzkumu a podrobnější analýze. Tento cíl se nám podařilo splnit, a bylo nalezeno 8 kandidátů. Mezi ně se řadí transkripty s číslem 9 (*Dipeptase C*), 10 (*Nutrient amino acid transporter 1*), 12 (*Nutrient amino acid transporter 3*), 14 (*Nutrient amino acid transporter 6*), 23 (*Glutamine synthetase1*), 29 (*Delta-1-Pyrroline-5-carboxylate reductase 2-like*), 30 (*Prolin oxidase*), 36 (*Ornithine aminotransferase*).

## **6. Závěr**

Cíle práce se podařilo splnit pouze částečně, všechny vzorky byly odebrány a zpracovány podle plánu, bohužel se nám ale nepodařilo jednoznačně potvrdit hypotézu, že se prolin akumuluje z extracelulární matrix z kolagenu. Hypotéza byla potvrzena jen částečně.

Osvojila jsem si metodu RT-qPCR, a práci s programy potřebnými k získání a vyhodnocení dat.

Podařilo se nám najít kandidáty pro další, podrobnější výzkum zabývající se metabolickými dráhami a akumulací prolinu. Mezi kandidáty se řadí transkripty označené čísla 9; 10; 12; 14; 23; 29; 30; 36.



## **7. Literatura**

- AITCHISON C. W. (1979). Winter-active subnivean invertebrates in Southern Canada. I. Collembola. *Pedobiologia* 19, 113-120.
- BALE, J. (1993). Classes of Insect Cold Hardiness. *Functional Ecology*, 7(6), 751-753. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/2390198>
- BALE, J.S. (1996). Insect cold hardiness: A matter of life and death. *Eur. J. Entomol.*, 93(3), 369-382.
- BECK, S. D. (1964). Time-measurement in insect photoperiodism. *Am. Natur.* 98:329-46.
- BECK, S. D. (1975). Photoperiodic determination of insect development and diapause. III. Effects of nondiel photoperiods. *J. Comp. Physiol.* 103:227-45.
- BECK, S. D. (1980). *Insect Photoperiodism*. 2nd ed. New York: Academic Press
- BERGER, J. (1995): *Biorytmy*. Praha – Litomyšl: Paseka
- DANKS, H. V. (2003). Studying insect photoperiodism and rhythmicity: Components, approaches and lessons. *Eur. J. Entomol.*, 100(2), 209-221. doi: 10.14411/eje.2003.036. - <https://www.eje.cz/pdfs/eje/2003/02/01.pdf>
- DENLINGER, D. L. (2009). Diapause. *Encyclopedia of Insects (Second Edition)*. Ohio, 267-271. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.09.008>.
- GIEBBULTOWICZ, J. (1999). Insect circadian clocks: Is it all in their heads?. *Journal of insect physiology*. 45. 791-800. 10.1016/S0022-1910(99)00055-4.
- GRAMBAL, A. A KOL. (2014). *Neurobiologické aspekty chronoterapeutických přístupů*. Olomouc: LF FN
- HOLMSTRUP, M., WESTH, P. (1994). Dehydration of earthworm cocoons exposed to cold: a novel cold hardiness mechanism. *J. Comp. Physiol. B* 164, 312-315.
- KOŠŤÁL V, BERKOVÁ P, ŠIMEK P. (2003). Remodelling of membrane phospholipids during transition to diapause and cold-acclimation in the larvae of *Chymomyza costata* (Drosophilidae). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*;135(3):407-19.

- KOŠŤÁL V., ŠIMEK P., ZAHRADNÍČKOVÁ H., CIMLOVÁ J., ŠTĚTINA T. (2012) Conversion of the chill susceptible fruit fly larva (*Drosophila melanogaster*) to a freeze tolerant organism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109: 3270–3274
- KOŠŤÁL V., ŠLACHTA M., ŠIMEK P. (2001) Cryoprotective role of polyols independent of the increase in supercooling capacity in diapausing adult of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Insecta). *Comp. Biochem. Physiol. B* 130: 365-374.
- KOŠŤÁL V., ŠTĚTINA T., POUPARDIN R., KORBELOVA J., BRUCE A.W. (2017). Conceptual framework of the eco-physiological phases of insect diapause development justified by transcriptomic profiling. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* 114: 8532-8537. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1707281114>
- KOŠŤÁL, V. (2004). Fyziologické mechanismy přežití hmyzu za nízkých teplot. Habilitační práce, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- KOŠŤÁL, V. (2006) Eco-physiological phases of insect diapause. *Journal of Insect Physiology.*, 52(2), 113-127. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2005.09.008>.
- KOŠŤÁL, V., MOLLAEI, M. & SCHÖTTNER, K. (2016b). Diapause induction as an interplay between seasonal token stimuli, and modifying and directly limiting factors: hibernation in *Chymomyza costata*. *Physiol. Entomol.* 41, 344–357 .
- KOŠŤÁL, V., NOGUCHI, H., SHIMADA, K., & HAYAKAWA, Y. (2000). Circadian component influences the photoperiodic induction of diapause in a drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal of insect physiology*, 46(6), 887-896.
- KOŠŤÁL, V., ŠAUMAN, I., STEHLÍK, J., ZÁVODSKÁ, R., SHIMADA, K., (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..
- KOŠŤÁL, V., ŠMILAUER P., HŮLA P., ŠTĚTINA T., MOOS M., ŠIMEK, P.(2018). Article | OPEN | Published: 13 March 2018 Recovery from supercooling, freezing, and cryopreservation stress in larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Scientific Reports* volume., 8(4414).
- KOŠŤÁL, V., ZAHRADNÍČKOVÁ, H. & ŠIMEK, P. (2011).Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 13035–13040 .

- LAUNAY JC, SAVOUREY G. (2009). Cold adaptations. *Ind Health.*;47(3):221-7.
- LEE R. E. (1991) Principles of Insect Low Temperature Tolerance. In: Lee R. E., Denlinger D. L. (eds) *Insects at Low Temperature*. Springer, Boston, MA
- LEE, R. E., CHEN, C. P., DENLINGER, D. L. (1987). A rapid cold-hardening process in insects. *Science* 238, 1415 – 1471
- LEES, A. D. (1955). *The Physiology of Diapause in Arthropods*. Cambridge Monographs Experimental Biology.
- MILLER, L. K., SMITH, J. S. (1975). Production of threitol and sorbitol by an adult insect: association with freezing tolerance. *Nature* 258, 519-520.
- NEDVĚD, O. (1996). Chladová odolnost hmyzu a tropy: Společné mechanismy ochrany proti mrazu i suchu. *Vesmír*. 75(669).
- NEDVĚD, O., LAVY, D., VERHOEF, H. A. (1998). Modelling the time-temperature relationship in cold injury and effect of high-temperature interruptions on survival in a chill-sensitive collembolan. *Functional Ecology* 12, 816-824.
- NELSON, R. J., DENLINGER, D. L., & SOMERS, D. E. (EDS.). (2009). *Photoperiodism: the biological calendar*. Oxford University Press.
- OBBARD, D. (2011). [obbard.bio.ed.ac.uk [online]. Dostupný na WWW: [http://obbard.bio.ed.ac.uk/photo\\_gallery/Chymomyza\\_costata.html](http://obbard.bio.ed.ac.uk/photo_gallery/Chymomyza_costata.html)
- PEGG, D. E. (2001). The current status of tissue cryopreservation. *Cryo-Letters* 22, 105 – 114.
- PRIVALOV, P. (1990). Cold denaturation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 281–305 .
- RAMLØY U.B. (2000). Aspects of natural cold tolerance in ectothermic animals, *Human Reproduction*, Volume 15, Issue suppl\_5, December 2000, Pages 26–46, [https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl\\_5.26](https://doi.org/10.1093/humrep/15.suppl_5.26)
- RIIHIMA A. J. (1996). Genetic variation in diapause, cold-hardiness and pupal eclosion rhythm in *Chymomyza costata*. *Acta Universitatis Ouluensis* 1-60 A274.

- RIIHIMAA, A. J. & KIMURA, M. T. (1988). A mutant strain of *Chymomyza costata* (Diptera, Drosophilidae) insensitive to diapause-inducing action of photoperiod. *Physiol. Entomol.* 13, 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.
- SALT, R. W. (1957). Natural occurrence of glycerol in insects and its relation to their ability to survive freezing. *Can Entomol.* 89:491–494.
- SALT, R. W. (1959). Role of glycerol in the cold-hardening of *Bracon cephi* (Gahan). *Can. J. Zool.* 37:59–69.
- SALT, R. W. (1961). Principles of insect cold hardiness. *Annu. Rev. Entomol.* 6:55–74.
- SAUNDERS D. S. (1981) Insect photoperiodism—the clock and the counter: a review. *Physiological Entomology*, 6(1), p. 99-116.
- SHIMADA, K., RIIHIMAA, A. (1990). Cold-induced Freezing Tolerance in Diapausing and Non-Diapausing Larvae of *Cymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae) with Accumulation of Trehalose and Proline. *Cryo-Letters* 11, 243-250.
- SMOLÍK, P. (2008). Chronobiologické komponenty psychických poruch. *Psychiatrie pro praxi* 9(3): s. 112-114.
- SØMME, L. (1982). Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comp. Biochem. Physiol.* 73, 519 – 543.
- STOREY K. B., STOREY J. M. (1986) Freeze tolerance and intolerance as strategies of winter survival in terrestrially-hibernating amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology* 83A: 613–617
- STOREY, K. B., STOREY, J. M. (1991). Biochemistry of cryoprotectants. In: LEE, R.E.Jr., DENLINGER, D.L. (Eds.), *Insect at Low Temperature*. Chapman and Hall, New York and London, 64 – 93.
- TAUBER, M. J., C. A. TAUBER, AND S. MASAKI. (1986). *Seasonal Adaptations of Insects*. Oxford University Press, New York. (TAUBER, Maurice J., Catherine A. TAUBER A SHINZŌ MASAKI. *Seasonal Adaptations of Insects*. 3. New York: Oxford University Press, 1986.)

TOXOPEUS, J., KOŠŤÁL, V., BRENT, J. S. (2019). Evidence for non-colligative function of small cryoprotectants in a freeze-tolerant insect. The Royal Society publishing.

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.

YOSHIDA, T., & KIMURA, M. T. (1995). The photoperiodic clock in *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology*, 41(3), 217-222.