

Jihočeská Univerzita
Přírodovědecká fakulta



Adaptace hmyzu na chlad: role šokových proteinů z nadrodiny Hsp

Bakalářská práce

Tomáš Štětina

Vedoucí práce: prof. Ing. Vladimír Košťál, CSc.

České Budějovice, 2012

Bakalářská práce

Štětina Tomáš (2012): Adaptace hmyzu na chlad: role šokových proteinů z nadrodiny Hsp [Cold adaptation of insects: the role of shock proteins from Hsp family. Bc. Thesis, in Czech] – 50 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Anotace: Heat shock proteins (Hsps) form evolutionarily conserved group of proteins that are best known for their unique function in repair of miss folded proteins that would otherwise aggregate in cells during stress conditions. The most extensively studied is the inducible Hsp70. Using 3rd instar larvae of transgene mutant of fruit fly, *Drosophila melanogaster* that lacks all copies of hsp70 gene, we assessed: 1) whether the absence of this gene is deleterious for larvae in their capacity to survive cold stress; and 2) whether any other gene from Hsps family may compensate for the loss of hsp70. We found that 1) survival of cold stress is not altered in Hsp⁻ larvae when compared to wild type Hsp⁺ larvae; 2) there is no other gene of Hsps family that would compensate for the loss of hsp70 at the level of transcription. Our ongoing effort is focusing on analysis of cold stress response at the protein level.

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

v Českých Budějovicích, prosinec 2012

.....

Poděkování:

Tímto bych chtěl poděkovat všem přátelům, spolupracovníkům Entomologického ústavu a rodinným příslušníkům za neustávající podporu. Především ale děkuji školiteli prof. Ing. Vladimíru Košťálovi, CSc. za profesionálně zvládnutou pomoc při psaní této práce.

Obsah:

1.	Úvod.....	1
1.1	Hmyz a sezónní výkyvy teplot.....	1
1.2	Adaptace hmyzu k sezónním nízkým teplotám.....	1
1.2.1	Obecné adaptace.....	1
1.2.2	Fyziologické mechanismy pro přežití v podchlazeném stavu.....	3
1.3	Nízkoteplotní stres - <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.3.1	Strategie pro přežití chladu u octomilky <i>Drosophila melanogaster</i>	5
1.3.2	Obecná charakteristika Hsps.....	6
1.3.3	Hsps u <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.4	Cíle práce.....	9
2.	Materiál a metodiky.....	11
2.1	Kmeny <i>Drosophila melanogaster</i>	11
2.2	Chov a aklimační varianty.....	11
2.3	Fenotyp: chladová odolnost.....	12
2.3.1	Krátkodobý chladový šok.....	12
2.3.2	Dlouhodobé vystavení mírnému chladu.....	13
2.4	Výběr a design primerů pro PCR reakce.....	13
2.5	Genomová DNA.....	15
2.6	Transkripční analýza genů <i>hsp</i>	17
2.6.1	Výběr aklimace a vystavení chladu.....	17
2.6.2	Izolace tRNA.....	17
2.6.3	cDNA syntéza.....	18
2.6.4	qRT-PCR.....	19
2.6.5	Výběr referenčních genů.....	20
2.7	Statistické vyhodnocení.....	20
3.	Výsledky.....	21
3.1	Chladová odolnost.....	22
3.1.1	Krátkodobý chladový šok.....	22
3.1.2	Dlouhodobé vystavení chladu.....	22
3.2	Genomová DNA.....	23
3.3	Transkripční analýza.....	24

3.3.1	Gen <i>hsp70</i>	24
3.3.2	Ostatní geny nadrodiny <i>hsp</i>	26
4.	Diskuze.....	30
5.	Závěry.....	33
6.	Literatura.....	34
7.	Příloha.....	43

1. Úvod

1.1. Hmyz a sezónní výkyvy teplot

Naše planeta obíhá kolem Slunce s nakloněnou osou s úhlem přibližně 23°. Tato astronomická poloha, spolu s dalšími geografickými faktory, je příčinou sezónního střídání teplot s ohromnými rozdíly v různých místech na Zemi, tj. bezmála 150°C (Ahrens, 1995).

Spolu se vznikem života a s jeho evolucí je spjata i adaptace na takovéto výkyvy teplot. Veškerí živočichové na naší planetě jsou ovlivňováni denními a sezónními cykly, z nichž ty nejdůležitější jsou právě teplotní.

Třídu *Insecta* řadíme podle schopnosti regulace tělesné teploty převážně k ektotermům. Jsou tedy závislí na teplotě okolního prostředí. Z hlediska stability tělní teploty spíše převažuje poikilotermie, jelikož často žijí v teplotně nestálém prostředí.

Tato práce se obecně zabývá přizpůsobením hmyzu k nízkým teplotám. Jak je ale můžeme definovat? Tento pojem je velice relativní, ale obecně si můžeme takový práh určit jako teplotu, kdy se zastavuje vývoj organismu. Tu určuje hodnota LDT („lower developmental threshold“; Jarošík et al., 2002) Tato práce se zabývá převážně účinky podnulových teplot. Ty často bývají pro hmyz dlouhodobě neslučitelné se životem, musel si tedy poradit využitím silně komplexních strategií jako je například: vstupem do dormantního stavu, migrací na menší nebo větší vzdálenosti, vyrovnáním se s fázovými přechody vody za podnulových teplot, restrukturalizací membrán, biosyntézou kryoprotektantů a také aktivizací ochranných a opravných systémů, včetně šokových proteinů. Tato práce se zabývá šokovými proteiny na konkrétním modelovém příkladu octomilky *Drosophila melanogaster*.

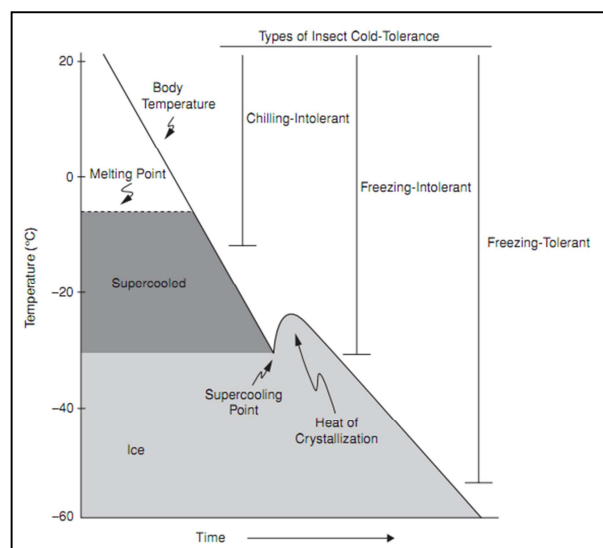
1.2. Adaptace hmyzu k sezónním nízkým teplotám

1.2.1. Obecné adaptace

Spolu s výskytem sezónních výkyvů teplot si hmyz během evoluce vyvinul rozličné mechanismy umožňující jeho přežití. Co se týče vyrovnání se s fázovými přechody vody, literatura většinou uvádí dva základní pojmy (Obr. 1.2) – „freeze avoidance“ a „freeze tolerance“ (Salt, 1961; Bale, 1987; Lee, 1989; Block, 1991; Bale, 1993). Z širšího hlediska jsou některé druhy hmyzu schopny se „vyhnout“ nízkým tělním teplotám chladného období pomocí následujících adaptivních strategií:

1) Regulace tělesné teploty

Tato schopnost je u hmyzu možná pouze na úrovni tzv. endotermních superorganismů (Stabentheiner, 2010). Řadíme sem například termity rodu *Coptotermes*, s jejich vysoce teplotně stabilními hnízdy (Greves, 1964) nebo evropské včely *Apis mellifera carnica*, které se i přes zimu dokáží zahřát až na 35°C (Stabentheiner, 2003).



Obr. 1.2: Typy reakce hmyzu na nízké teploty. Je znázorněna tělesná teplota s vyznačenými prahy bodu tání a bodu podchlazení (SCP). Ohraničení vpravo indikuje rozsahy pro různé typy chladové tolerance. (Lee et al., 2010)

2) Migrace

Vzhledem k malé velikosti těla bývá tato strategie pro hmyz velice nesnadná a energeticky nevýhodná. Jednou z výjimek jsou můry (Lepidoptera: Noctuidae) nebo Americký druh denního motýla monarchy *Danaus plexippus* (Brower, 1995; Howard, 2009), který migruje až 3000 km.

3) Přežívání chladných období v tepelně pufovaném prostředí

Tuto strategii mohou využívat jen takové druhy, které se vyskytují v teplotně stabilním mikroklimatickém prostředí. Do této skupiny řadíme například subniveální chvostoskoky, roztoče nebo některé druhy brouků a dvoukřídlého hmyzu (Hagvar, 2010).

Většina druhů hmyzu však nedokáže využívat adaptivní strategie uvedené pod body 1) až 3), a proto se musí s podnulovými tělními teplotami nějakým způsobem vyrovnat. Tyto adaptivní strategie téměř vždy začínají vstupem do dormance, konkrétně buď: a) kviescence, při které zastavení vývoje vyvolávají přímo nepříznivé podmínky prostředí nebo b) diapauza, tj. stav, ve kterém je vývoj potlačen pod vlivem signálů z prostředí jako je fotoperioda neboli poměrná délka dne a noci (Danks, 1987). Diapauza je zejména v chladné temperátní oblasti severských zeměpisných šířek běžnou součástí životního cyklu a slouží také jako důležitý nástroj pro jeho synchronizaci (Bale et al., 1997; Danks, 2004). Adaptivní strategie, jež zahrnují vyrovnání se s hrozícím fázovým přechodem tělní vody za podnulových teplot (tedy s mrznutím vody), lze dále rozdělit takto:

4) Vstup do dormance a částečná až úplná dehydratace

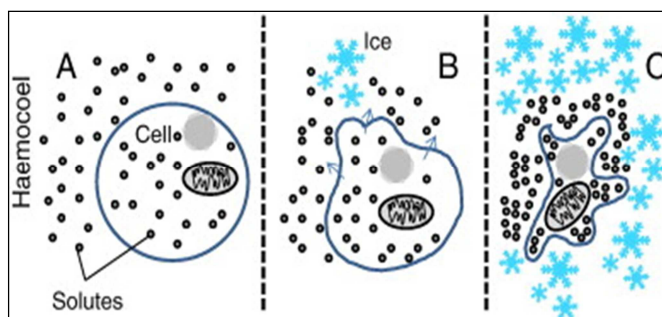
Drobní půdní bezobratlí s integumentem silně propustným pro vodu jsou náchylní k rychlým a někdy téměř kompletním ztrátám kapalné vody procesem sublimace, kdy se molekuly tělní vody odpařují a připojují se k okolním krystalům ledu. Nakonec dochází k téměř úplné desikaci organismu, takže žádný přechod do tuhé fáze (mrznutí) již nehrozí. Tato strategie byla poprvé popsána pro kokony žížal (Holmstrup et al, 1994).

5) Vstup do dormance a tolerance podchlazení („chilling tolerance“)

Jakmile se tělesná teplota hmyzu dostane pod 0°C, neznamená to, že okamžitě promrzne. Hemolymfa totiž obsahuje ionty, cukry, aminokyseliny a další soluty, čímž se rovnovážný bod mrznutí posouvá o 1,86°C na každý jeden osmol solutů a zároveň klesá i teplota bodu podchlazení (Lee, 2010). Hmyz, který tedy nedokáže tolerovat tvorbu ledu ve svých tkáních, tak zůstává v nepromrzlém, tzv. podchlazeném („supercooled“) stavu, v ojedinělých případech až při teplotách okolo -60°C (Miller, 1987).

6) Vstup do dormance a tolerance zmrznutí („freezing tolerance“)

Některé druhy hmyzu dokáží přežít tvorbu ledových krystalů v mezibuněčných prostorách. Intracelulární zmrznutí je téměř bez výjimky letální, přesto bylo pozorováno přežití v ojedinělých případech, například v buňkách tukového tělesa (Salt, 1962) nebo u hád'átka *Panagrolaimus davidii* (Wharton et al., 1995). Při extracelulárním mrznutí (Obr. 1.3) dochází k rychlé osmotické dehydrataci buněk na základě vyrovnávání koncentračních gradientů (Sinclair et al., 2010).



Obr. 1.3: Extracelulární formace ledu. (A) za normálních podmínek je osmolarita uvnitř a vně buňky udržována v rovnováze. (B) Při tvorbě ledových krystalů se konc. solutů v hemolymfě zvyšuje a voda je vytlačována vně buňky na základě rozdílu osm. gradientů. (C) S klesající teplotou se buňka stále více zakonzentrovává (Sinclair et al., 2010)

1.2.2. Fyziologické mechanismy pro přežití v podchlazeném stavu

Jak již bylo řečeno v úvodu, mechanismy, které umoužňují hmyzu přežívat nízké teploty, jsou vysoce komplexní. Od dob prvního bádání v oboru hmyzí kryobiologie (Salt, 1961) bylo popsáno několik různých mechanismů, zde uvádím pouze výčet nejdůležitějších:

- Zesílení kutikuly a změna její kvality

Pravděpodobným adaptivním významem této změny je prevence evaporačních ztrát vody během dlouhého zimního období. Zesílená kutikula může také bránit pronikání okolních krystalů ledu do těla a inokulaci mrznutí tělních tekutin.

- Biosyntéza a akumulace nízkomolekulárních kryoprotektantů

Veškeré soluty rozpuštěné v hemolymfě snižují rovnovážný bod mrznutí o 1,86°C na 1 Osmol/kg solutů (Lee, 2010). Běžné hodnoty osmolality jsou v rozmezí 400-600 mOsmol/kg u aktivních, nediapauzních jedinců v létě (Zachariassen, 1985). U diapauzních, částečně dehydratovaných a aklimovaných jedinců může dosahovat hodnot až >3000 mOsmol/kg (Zachariassen, 1980). Řadíme sem polyoly, jako je glycerol, sorbitol, mannitol nebo etylenglykol, cukry – glukóza a trehalóza a také volné aminokyseliny (Lee, 1991).

- Restrukturace membrán

Fyzikální vlastnosti lipidické dvojvrstvy, jako je její fáze a fluidita, jsou striktně závislé na teplotě. Ze základní funkční tekuté fáze, zajišťující optimální regulovanou propustnost a optimální funkci integrovaných proteinů, se vlivem nízkých teplot membrána dostává do tuhé fáze gelové (Košťál, 2010). Aby se tomuto fázovému přechodu zamezilo, dochází k procesům desaturace a zkrácení řetězců mastných kyselin v membránových fosfolipidech (Li et al., 1998), někdy také ke změně zastoupení etanolaminu a cholinu v hlavových částech fosfolipidů nebo ke změně zastoupení cholesterolu v membráně (Downer et al., 1981)

- Akumulace AFPs

AFP („anti-freeze proteins“), též označované jako THPs („thermal hysteresis proteins“) jsou proteiny, které zabraňují růstu zárodečných krystalů ledu pomocí adsorpce na povrch vznikajícího zárodečného krystalu a omezení přístupu a připojování dalších molekul vody do krystalické mřížky ledu (Duman, 1977; Duman et al., 2010).

- Aktivizace Hsp komplementu (viz kap. 1.3.2)

1.3. Nízkoteplotní stres – *Drosophila melanogaster*

Pokud mluvíme o stresu, a nemáme na mysli stres jako psychický stav vyvolaný psaním bakalářské práce, můžeme jej obecně chápat jako stav, při kterém dochází k narušení normálních funkcí biologických systémů, nebo stav, který snižuje fitness organismu (Hoffmann and Hercus, 2000; Bijlsma and Loeschcke, 1997). Stresorů existuje celá řada,

v základu jsou to ale faktory chemické, látky jako těžké kovy, polutanty aj. a fyzikální, z nichž nejvýznamější je teplota (Korsloot, 2004).

1.3.1. Strategie pro přežití chladu u octomilky *Drosophila melanogaster*

Drosophila melanogaster nemá s chladem velké evoluční zkušenosti. Jejím prapůvodním centrem rozšíření je tropická oblast rovníkové Afriky (Lachaise et al., 1988). Vývoj vajíček, larev a kukel se zastavuje již při poklesu teplot pod 10°C (Loeb et al., 1917), tehdy patrně nedochází ještě k poškození vnitřních struktur a jedinci umírají spíše na vyhladovění anebo na ztráty vody. K rychlému poškození chladem u larev však dochází již při teplotách nižších 6°C (Košťál et al., 2011a). Takový chlad patrně způsobuje narušení homeostatických procesů, především rovnováhu produkce a spotřeby ATP, a tím pádem všechny procesy, které jsou na stálé dodávce chemické energie závislé. Typicky pak dochází například k narušení iontové homeostázy a ztrátě elektrochemických potenciálů (Košťál et al., 2004), popřípadě také k nekontrolovanému hromadění toxických kyslíkových radikálů (Korsloot et al., 2004). Veškerá vývojová stadia neaklimovaných jedinců nepřežijí podchlazení na -5°C déle než na několik hodin (Czajka et al., 1990) a to přesto, že hodnota SCP byla stanovena až na -20°C. Dochází tedy k akutnímu poškození velmi nízkými teplotami. Pravděpodobnou hlavní příčinou akutního poškození je denaturace proteinů (Privalov, 1990) a fázové přechody membránových fosfolipidů. Zmrazení tkání u *Drosophily* (za jakékoli teploty) je všeobecně považováno za letální, ačkoliv se již podařilo při vhodném aklimačním režimu a po jistých farmakologických zásazích octomilku zmrazit (Košťál et al., 2012).

V temperátním habitatu je vhodnou strategií pro octomilku přežít v kviescenci či mělké diapauze po krátkou dobu za mírně nízkých teplot (okolo nuly) (Czajka et al., 1990), popřípadě pokračovat ve vývoji v tepelně pufovaném prostředí = oportunní přežívání v lidských příbytcích. Proč se tedy omezenými schopnostmi octomilky přežít v chladu vlastně vůbec zabývat?

Rod *Drosophila* zahrnuje až 1500 popsaných druhů (Thockmorton, 1975) a některé druhy jsou vysoce tolerantní vůči chladu, z nichž se nabízí například příbuzná muška *Chymomyza costata*, jejíž diapauzní larvy dokáží tolerovat dokonce i zmrazení a následně vystavení teplotám v kapalném dusíku (Košťál et al., 2011b). Dále například severský druh *Drosophila Montana* dokáže několik měsíců přežít v podchlazeném stavu (Vesala et al., 2011). Octomilka *D. melanogaster* rovněž nabízí velkou výhodu dokonalé znalosti

fyziologie (Crill et al., 1996) a genetiky (Adams et al., 2000), což se týká i komplementu šokových proteinů. Laboratorní model *D. melanogaster* nám tak dává možnost porovnávat ji s jejími příbuznými druhy a zjišťovat, proč je od nich ve své "ne-toleranci" chladu natolik odlišná.

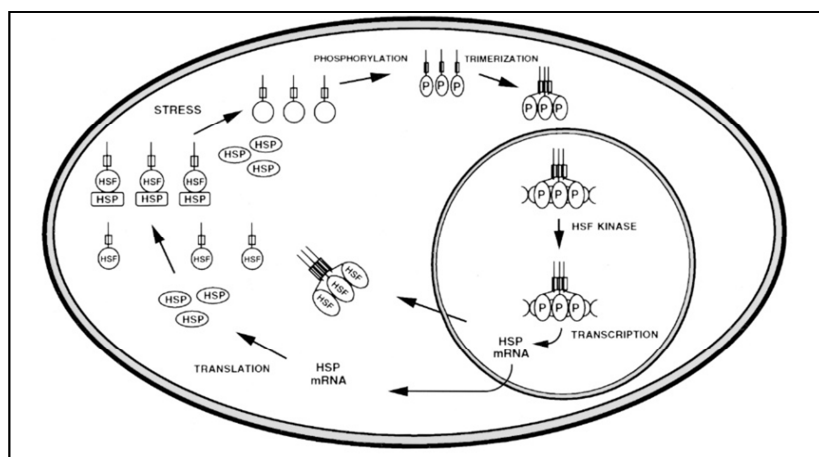
Propojenost mezi šokovými proteiny a chladem je zajímavé téma, které ovšem není u hmyzu a speciálně ani u modelu *Drosophila* doposud příliš dobře prostudováno (Burton et al., 1988; Yiangou et al., 1997; Goto et al., 1998; Nielsen et al., 2005; Qin et al., 2005; Sinclair et al., 2007; Udaka et al., 2010, Colinet et al., 2010). Tématem této práce je studium významu Hsps při vystavení chladu.

1.3.2. Obecná charakteristika Hsps

Šokové proteiny, takzvané „heat shock proteins“ (Hsps někdy také obecně nazývané „stress proteins“) byly poprvé objeveny náhodou právě u octomilek (Ritossa, 1962; 1996), původně pouze jako pozoruhodný pattern objevující se po tepelném šoku na puffech polyténních chromozomů slinných žláz. Od té doby se Hsps staly významným předmětem pro studie, jejichž poznatky jsou shrnuty v mnoha přehledových člancích (Craig, 1985; Burdon, 1986; Lindquist, 1986; Lindquist et al., 1988; Hartl, 1996; Feder et al., 1995; Kiang et al., 1998; Parsell et al., 1993; Feder et al., 1999, Morimoto et al., 1999, Sorensen et al., 2003).

Šokové proteiny (dále jen Hsps = protein, *hsps* = gen), které jsou podskupinou tzv. chaperonů (Gething, 1992) jsou jedny z evolučně nejzachovalejších skupin genů ve všech buňkách prokaryot i eukaryot (Kiang et al., 1998). Na úrovni nukleotidů jsou mezi těmito dvěma hlavními skupinami organismů homologní až z 50% (Plesofsky, 1996). Za normálních podmínek (za nestresových situací) mohou být konstitutivně přítomny a podílet se na sbalování a rozbalování proteinů, na metabolických procesech, buněčném růstu a vývoji (Korsloot et al., 2004). Ve stresem ovlivněných buňkách dochází k masivní up-regulaci inducibilních Hsps, jejichž primární funkcí je potom buď reparaace denaturovaných proteinů nebo jejich odbourání v proteosomových systémech (Feder et al., 1999, Parsell et al., 1993). Inducibilní šokové proteiny jsou tak obzvláště důležité pro volně žijící populace hmyzu, které jsou vystaveny proměnlivým teplotním podmínkám prostředí (Sorensen et al., 2003).

Mechanismus exprese (Obr. 1.4) probíhá primárně na transkripční úrovni a je přímo závislý na transkripčním faktoru zvaném HSF („heat shock factor“). Tento transkripční faktor obsahuje dva leucinové zipy a dále DNA vazebnou doménu (Craig et al., 1994). HSF přetrvává ve stabilním inaktivním komplexu při nestresových podmínkách spolu s HSPs, jejich afinita k denaturovaným proteinům za stresových situací destabilizuje komplex a vede k aktivaci HSF (Marchler et al., 2001). Leucinové zipy umožní HSF komplexu trimerizovat, a v této aktivní trimerické formě nasedá HSF na promotorové sekvence *hsp* genů a spouští jejich transkripci. (Korsloot et al., 2004).



Obr. 1.4: Mechanismus stresem vyvolané indukce v buňkách *Drosophily*. HSFs, vyskytující se v neaktivní formě v cytosolu jsou vázány HSP. Při stresu se oddělují od HSP, jsou fosforylovány protein kinázami (PKC) a ve formách trimerů se dostávají do jádra, kde dochází k další fosforylaci HSFs a následné transkripci a translaci. (Kiang et al., 1998)

1.3.3. HSPs u *Drosophila melanogaster*

Název většiny HSPs se ve většině případech skládá z předpony Hsp/Hsc a následného čísla (22,23,70,83...), které zpočátku označovalo jeho odhadovanou velikost v kDa (Lindquist et al., 1980). Dnes rozdělujeme stresové proteiny do čtyř rodin (Korsloot et al., 2004):

- 1) Sp90 – Hsp83
- 2) Sp70 – Hsp70Aa, Ab, Ba, Bb, Bbb, Bc; Hsc70-1, 2, 3, 4, 5; Hsp68
- 3) Small Hsps – Hsp67Ba, Bb, Bc; Hsp22, Hsp23, Hsp26, Hsp27, Hsp40
- 4) ubiquitin

Výčet těchto genů není patrně dosud kompletní. V posledních letech se s rozvojem technik molekulární biologie nachází další varianty, jejichž funkce bývá neznámá. Popis jednotlivých genů (Tab. 1.1) byl vypracován s použitím databází <http://flybase.org/> a

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> obsahující všechny doposud nalezené geny *Drosophila melanogaster*, spolu s podkladovými informacemi vědeckých publikací. V obrázkové příloze (7.1 - 7.22) jsou cytogenetické mapy zobrazující umístění genu na chromozomu, jeho transkript a kódující sekvenci (<http://flybase.org/>):

- Hsp83

Protein se vyskytuje v cytoplazmě, kde je konstitutivně přítomen, jeho exprese je ale také indukována tepelným stresem a nedostatkem glukózy (Lindquist et al., 1986) a během oogeneze (Lindquist et al., 1988). V buňkách, které jsou podřízeny steroidním hormonům se váže na specifické receptory (Korsloot et al., 2004). Při stresu chrání nativní proteiny proti denaturaci za asistence Hsp70 (Hartl et al., 1996).

- Hsp70

Toto je nejvýznamnější a nejvíce studovaná skupina stresových proteinů. V genomu je zastoupen šesti téměř identickými kopiemi (Lindquist et al., 1988)

Protein se vyskytuje v cytoplazmě, kde není konstitutivně přítomen, jeho exprese je drasticky indukována během stresu, největší abundance (až 1000x násobný nárůst; Solomon et al., 1991) bývá pozorována při „heat-shock response“ (Lindquist et al., 1986), up-regulace genu byla pozorována i po chladovém šoku (Sinclair et al., 2007). Při bylo dokázáno zvýšení termotolerance u embryí, larev i dospělců (Welte et al., 1993, Feder, 1996, Krebs et al., 1997, Krebs, 1999). Pod stresovými podmínkami se Hsp70 nachází zejména v jádře a na jaderné membráně (Lindquist et al., 1988). Jeho primární funkcí je podíl na znovuskládání denaturovaných proteinů zpět do nativní formy (Liang et al., 1997, Feder et al., 1999) a účast na degradaci poškozených proteinů (Lindquist et al., 1988). Uměle vyvolaná transkripce za nestresových podmínek snižuje schopnost buněčného dělení a růstu (Korsloot et al., 2004).

- Hsp68

Sekvence tohoto genu je z 85% shodná s *hsp70* a stejně tak jeho se up-reguluje po tepelném šoku (Craig et al, 1985), reakce je však opožděná a abundance produktu je mnohonásobně nižší (Palter et al. 1986). Předpokládá se, že tento gen hraje stejně jako *hsp70* důležitou roli pro termotoleranci (McCull et al., 1996).

- Hsc70-(1-5)

I když je prokázáno, že se indukují po stresu, Hscs jsou v buňce přítomny zejména konstitutivně, abundance vyvolaná stresem je oproti Hsp70 zanedbatelná (Rubin et al., 1993,

Palter et al., 1986). Obecně lze odvodit tři hlavní funkce, které Hscs plní za normálních podmínek (Korsloot et al., 2004): 1) Podíl na syntéze a skládání polypeptidů; 2) Asistence při shromažďování složených polypeptidů; 3) Funkce chaperonového prekursoru proteinů vnitrobuňkových membrán. Lokace v buňce se u této skupiny se liší gen od genu (Korsloot et al., 2004): Hsc70-1,2 a 4 nalezneme zejména v cytoplazmě, Hsc70-3 v endoplazmatickém retikulu, kde se váže na nově syntetizované a nekompletní proteiny (Kassenbrock et al., 1988) a Hsc70-5 v mitochondriích, kde se podílí na skládání mitochondriálních proteinů.

- Small Hsps

Malé šokové proteiny jsou na chromozómu (s výjimkou *hsp4*) lokalizovány na jednom místě, někdy se jejich sekvence navzájem překrývají (viz Obr. 7.15 v příloze). K nejdůležitějším patří Hsp22,23,26 a 27. Všechny tyto proteiny se vyznačují zachovalým regionem, tzv. α -krystalinní doménou (Mymrikov et al., 2011). Během vývoje vykazují stálou expresi, na úrovni tkání se však může jejich koncentrace lišit až 100x (Korsloot et al., 2004). V nestresované buňce jsou lokalizovány v cytoplazmě, avšak po šoku se mohou silně upregulovat a akumulovat okolo jádra (Arrigo et al., 1994), kde tvoří super-agregáty (Basha et al., 2012).

- Ubiquitin

Ubiquitin je malý regulační protein, jenž byl nalezen téměř ve všech tkáních u eukaryot, u prokaryot se nevyskytuje. Jeho primární funkcí je označování proteinů určených k degradaci či nasměrovat některé proteiny směrem k buněčným kompartmentům, kde mají plnit svou funkci (Hershko, 1998).

1.4. Cíle práce

Cílem této práce je:

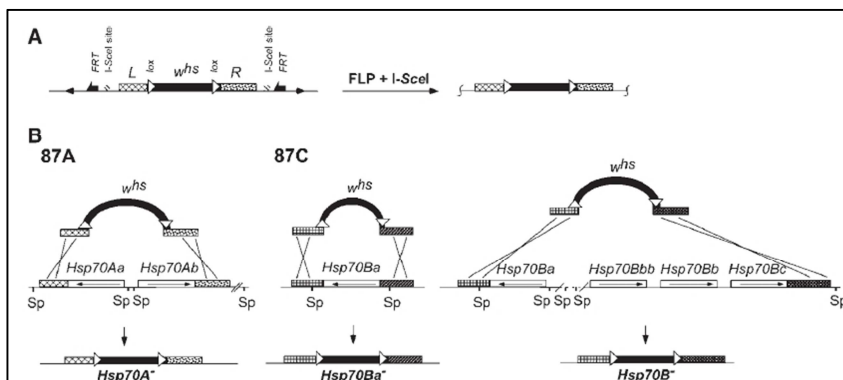
- Charakterizovat expresi komplemetu šokových proteinů octomilky *Drosophila melanogaster* vystavených subletálnímu chladu a ověřit potřebnost šokových proteinů Hsp70 pro reparaci chladového poškození.
- Porovnat expresi jednotlivých genů *hsp* komplementu a rozdíly ve fenotypu larev pro chladovou odolnost u divokého kmene *Oregon* (dále jen Hsp⁺) a mutanta *hsp-null* (dále jen Hsp⁻) postrádajícího všechny kopie genu Hsp70.

Tab. 1.1: Výčet šokových proteinů u *Drosophila melanogaster* a jejich charakteristika. Rodiny: Sp90 - zelená, Sp70 - modrá, „small“ - červená.

Gen	Inducibilní/ konstitutivní	Chromozom	Cytogenetické umístění	Transkripční varianty	počet bazí mRNA	Molekulová hmotnost proteinu [Da]
hsp83	inducibilní	3L	63B11-63B11	Hsp83-RA	717	81735
				Hsp83-RB	717	
hsp70Aa	inducibilní	3R	87A2-87A2	Hsp70Aa-RA	642	70160
hsp70Ab			87A3-87A3	Hsp70Ab-RA	642	70160
hsp70Ba			87B12-87B12	Hsp70Ba-RA	641	70181
hsp70Bb			87B14-87B14	Hsp70Bb-RA	641	70196
hsp70Bbb			87B14-87B14	Hsp70Bbb-RA	641	70253
hsp70Bc			87B14-87B15	Hsp70Bc-RA	641	70196
hsp68	inducibilní	3R	95D11-95D11	Hsp68-RA	635	69744
hsc70-1	konstitutivní	3L	70C9-70C9	Hsc70-1-RA	641	70686
				Hsc70-1-RC	555	61347
				Hsc70-1-RD	555	61347
hsc70-2	konstitutivní	3R	87D10-87D10	Hsc70-2-RA	633	69722
hsc70-3	konstitutivní	X	10E3-10E4	Hsc70-3-RA	656	72261
				Hsc70-3-RB		
				Hsc70-3-RC		
				Hsc70-3-RD		
hsc70-4	konstitutivní	3R	88E4-88E4	Hsc70-4-RA	651	71131
				Hsc70-4-RB		
				Hsc70-4-RC		
				Hsc70-4-RD		
				Hsc70-4-RE		
				Hsc70-4-RF		
hsc70-5	konstitutivní	2R	50E6-50E6	Hsc70-5-RA	686	74066
hsp67Ba	inducibilní	3L	67B2-67B2	Hsp67Ba-RA	445	46931
hsp67Bb	inducibilní	3L	67B2-67B2	Hsp67Bb-RA	111	12614
				Hsp67Bb-RB		
				Hsp67Bb-RC		
				Hsp67Bb-RD		
hsp67Bc	inducibilní	3L	67B2-67B2	Hsp67Bc-RA	199	22180
hsp22	inducibilní	3L	67B2-67B2	Hsp22-RA	174	19763
				Hsp22-RB		
hsp23	inducibilní	3L	67B3-67B3	Hsp23-RA	186	20629
				Hsp23-RB		
hsp26	inducibilní	3L	67B2-67B2	Hsp26-RA	208	22994
hsp27	inducibilní	3L	67B3-67B3	Hsp27-RA	213	23617
hsp40 (Dna-J-1)	inducibilní	3L	64E5-64E5	DnaJ-1-RA	334	37028
				DnaJ-1-RB	334	37028

2. Materiál a metodiky

2.1. Kmeny *Drosophila melanogaster*



Obrázek 2.1: Schéma pro targeting. (A) Regiony obklopující lokus delece (L a R) byly zaklonovány do P-elementu (B) Rekombinací s Hsp70A, Hsp70Ba a Hsp70B donory byly vytvořeny požadované delece. (Gong and Golic, 2004)

K našemu pokusu jsme použili dva odlišné kmeny octomilek: klasický laboratorní kmen Oregon, který ve svém genomu disponuje všemi kopiemi *hsp70*. Tento kmen budeme v této práci nazývat Hsp⁺. Dále

jsme použili transgenního mutantu s genotypem Df(3R)Hsp70A, Df(3R)Hsp70B (Obr. 2.1), který všechny tyto kopie údajně postrádá. Tento mutantní kmen vznikl cílenou genetickou manipulací laboratorního kmene *w*¹¹¹⁸ (Gong & Golic; 2004) a budeme jej v této práci nazývat Hsp⁻. Bylo ověřeno, že larvy 3. instaru tohoto kmene nemají schopnost up-regulovat expresi genu *hsp70* po tepelném šoku a zároveň mají sníženou toleranci proti vysokým teplotám, (39°C) (Gong and Golic, 2006). U kmene Hsp⁻ nebyla pozorována žádná kompenzační exprese jiného genu z komplementu šokových proteinů za chybějící expresi *hsp70* po tepelném šoku (Bettencourt et al., 2008). Další ověřování genómu kmene *w*¹¹¹⁸ však prokázalo, že se patrně nepodařilo dosáhnout zcela kompletní delece všech kopií *hsp70*. V genómu kmene *w*¹¹¹⁸ se udržuje velmi nízká hladina jedné z kopií a to patrně pouze jejího 3' - konce. Proto byla pozorována i velmi nízká hladina mRNA transkriptů pro *hsp70* po tepelném šoku (Bettencourt et al., 2008).

Pro náš pokus vybíráme larvy 3. instaru, o nichž je známo, že jsou tolerantější vůči dlouhodobému vystavení chladu, na rozdíl od larev 1. a 2. instaru (Rajamohan et al., 2008).

2.2. Chov a aklimační varianty

Dospělci Hsp⁺ i Hsp⁻ byli chováni za podobných podmínek v lahvičkách (cca 50 mL) obsahujících sterilní dietu složenou z kukuřičného šrotu, agaru, kvasnic a cukru, konzervovanou metylparabenem (Sigma). Chovy byly usdržovány standardně při 18°C s pravidelným světelným cyklem 12 h světlo: 12 h tma (12L:12D). Abychom docílili přesné

vývojové synchronizace byla používána vajíčka nakladená v intervalu 12 hod (světelná fáze dne) a pro pokus byly vždy využity larvy které měly finální velikost (ca. 95% finální hmotnosti "wandering" larev), ale ještě neopustily dietu za účelem nalezení vhodného místa pro pupariaci.

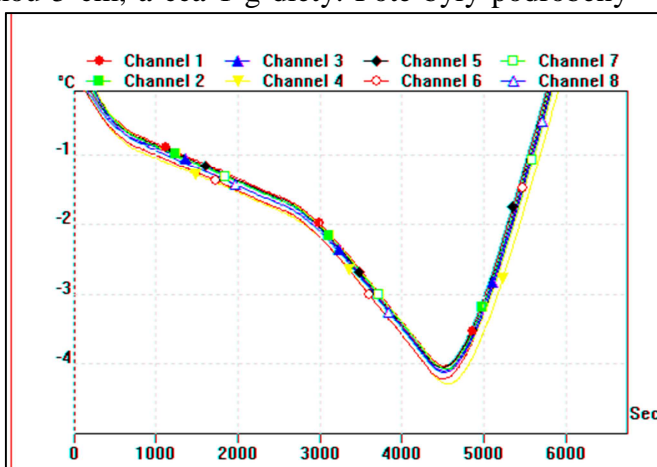
Pro analýzu genotypu jsme použili dospělé mušky z chovu. Pro analýzy fenotypu jsme použili larvy 3. instaru aklimované následujícím způsobem. Vajíčka byla nakladena v podmínkách chovu. Druhý den byla vajíčka (popřípadě časné 1. instary) přemístěna do konstantních teplot buď 25°C (varianta Dm25) nebo 15°C (varianta Dm15) a fotoperiody 12L:12D. Za těchto podmínek dosáhly larvy finální velikosti po přibližně po 5 dnech za teploty 25°C (u obou kmenů) nebo 12 dnech u kmene Hsp+ a po 15-16 dnech u kmene Hsp- za teploty 15°C. V poslední aklimační variantě (Dm 15→6) byly larvy finální velikosti ještě na další 2 dny přeneseny do konstantní teploty 6°C. V předchozí studii (Korbelová, 2011) bylo zjištěno, že různě aklimované larvy se výrazně liší svou chladovou odolností, přičemž larvy z aklimační varianty Dm 15C→6C měly nejvyšší chladovou odolnost a reagovaly na vystavení v chladu (0°C) zřetelnou up-regulací genu hsp70. Pro analýzu transkripce byly využity pouze larvy z aklimační varianty Dm 15C→6C.

2.3. Fenotyp: chladová odolnost

2.3.1. Krátkodobý chladový šok (-4°C)

Byly použity larvy z aklimační varianty Dm 15. Larvy (celkový počet 320 ks z každého kmene) byly vystaveny chladu ve skupinách po 20 ks. Skupiny byly umístěny do malých zkumavek s průměrem 1 cm a výškou 5 cm, a cca 1 g diety. Poté byly podrobeny teplotnímu protokolu uvedenému na Obr. 2.3 v termoregulačním přístroji *Huber® ministat 240*. Záznam průběhu teploty byl změřen loggerem *Pico® TC-08*, s použitím podpůrného programu *Pico® Technology Software (P-Tech)*.

Po vystavení teplotnímu šoku byly larvy přeneseny do konstantní teploty 18°C a fotoperiody 12L:12D pro zotavení po dobu 10 dní. Posuzovaným kritériem pro přežití byla schopnost dosažení pupariačního stadia.



Obrázek 2.3: Protokol chladového šoku. Jednotlivé kanály představují sondy zavedené do diety v každé z testovacích zkumavek.

2.3.2. Dlouhodobé vystavení mírnému chladu (0°C)

Byly použity larvy aklimační varianty Dm15→6. Celkový počet larev je uveden v Tab. 2.3. Tento test slouží ke zjištění hodnoty Lt_{50} , tj. určení takové délky chladové expozice, která způsobuje mortalitu u 50% jedinců. Skupiny larev po 20 ks byly umístěny do malých zkumavek s dietou (viz 2.3.1) a vloženy na led (0C) v polystyrenovém boxu do chladničky s teplotou okolo +4C. Časové expozice v chladu (Tab 2.3) byly vybrány na základě výsledků předchozího výzkumu (Košťál et al., 2011a). Posuzovaným kritériem pro přežití byla schopnost dosažení pupariačního stadia.

Tab. 2.3.: Jednotlivá vystavení 0°C a náležitý počet larev

čas vystavení 0°C [h]	n (Hsp ⁺)	n (Hsp ⁻)
0	200	200
30	740	800
48	200	200
72	200	240

2.4. Výběr a design primerů pro PCR reakce

Primery byly designovány s použitím programu *Geneious (Biomatters)*. Primery byly zkonstruovány firmou *Generi-Biotech*. Kvalita připravených primerů byla vždy ověřována jednak pomocí elektroforézy na agarovém gelu a dále analýzou teploty tání po proběhnutí qPCR reakce (podrobnosti viz dále).

Pro většinu genů byl designován pouze jediný pár primerů (Tab. 2.4.). Jelikož ale rodina genů *hsp70* je u octomilky početná a obsahuje různé geny s vysoce příbuznými sekvencemi, bylo pro gen *hsp70Aa* navrženo větší množství různých párů primerů. Cílem bylo vyhnout se případnému nasedání primerů na blízce příbuzné sekvence jiných genů. V příloze (Obr. 6.22) je zobrazen gen *hsp70Aa* se všemi páry použitých primerů.

Tab. 2.4: Seznam použitých primerů a délka jejich PCR produktu. Modře jsou označeny primery použité pro gDNA, zeleně pro cDNA, hvězdičkou nově designované primery. Neoznačené primery byly použity při doprovodných pokusech (neuveďeno).

gen	Forward/ Reverse	sekvence
<i>hsp70Aa</i>	F1	5'-GTGAAGCAGGCCGTGGAACAGG-3'
	F2*	5'-GCACTGGCCTTTCAAGGTTGTAAGC-3'
	F3*	5'-CTGGCCGTTATTCTCTATTTCGTTTTGTGAC-3'
	F4*	5'-CTCAGCGGAGACCAGAGCGGCAAG-3'
	F5*	5'-GTGAGTCCAAGAGATTTGCC-3'
	F6*	5'-GGCATATCTGGGCGAGAGCATC-3'
	F7*	5'-ACTCGTACTCCTCCTTCTCGGCGGTGG-3'
	R1	5'-TCTTGGTCATGATGGGGGAGCAGT-3'
	R2*	5'-CTCCTCGGGGGCAAATCTCTTGGA-3'
	R3*	5'-CAGCAGCAGGTCCTGGATCTTGCC-3'
	R4*	5'-CGCCAGATGAGTGACTION-3'
	R5*	5'-CTTGAACTCGTCCGCCAGATGAG-3'
<i>hsp68</i>	F1	5'-ATCGCCGCCCGCAATCAACTGG-3'
	R1	5'-CCGAGGAAGAAGAACTACA-3'
<i>hsp83</i>	F1	5'-GCACGCCAGCCGCATCTACC-3'
	R1	5'-TCAACCAGCGAGGGGGCATCT-3'
<i>hsc70-1</i>	F2*	5'-GAGATAACAACAGCCTGGGTAAG-3'
	R2*	5'-CTCAATGGTTGGACCCGAG-3'
<i>hsc70-2</i>	F2*	5'-TCGGAAACCGAACGCTCCAAGG-3'
	R2*	5'-TGGCACTCTTTCAGGTGACTC-3'
<i>hsc70-3</i>	F1	5'-ACCAGAACCGCCTGACGCCC-3'
	R1	5'-GGGATCGGCATCGGGATTCTGT-3'
<i>hsc70-4</i>	F1	5'-TGCCCTGGAGCGTTCGACCAA-3'
	R1	5'-GCATACCTCCGGGACCGCC-3'
<i>hsc70-5</i>	F1	5'-ATAAGCTTCTCGGTCCTTTACA-3'
	R1	5'-TATCGTGGACTATGCTCTCGCCC-3'
<i>hsp67Ba</i>	F1	5'-CAGCCGCCAAGGCCGTCAGAGGTAGA-3'
	R1	5'-GGCGAGAGTGAGCGAGAGCGAAGGAGT-3'
<i>hsp67Bb</i>	F1	5'-TGAAGTGGACAAGGCTCTAAATCTGGA-3'
	R1	5'-CACCACATTGCTGTATCCCTGACTTTTG-3'
<i>hsp67Bc</i>	F1	5'-AGCCGCGGTGGAGCCTCAAATAAG-3'
	R1	5'-GATCGTCTCGCGCTCCTCGTGTT-3'
<i>hsp40</i>	F1	5'-GCAGGGCAGCAGGATACAGGTGAA-3'
	R1	5'-CTAGTTGGGCAGCAGCTCGGACAG-3'
<i>hsp22</i>	F1	5'-CTCTCCTCGCCCTTTCACGCCTTCTTC-3'
	R1	5'-GGGTGAGGTTGTAGCCATCCTTGTGACG-3'
<i>hsp23</i>	F1	5'-TGCGCCAGCTGGAGAAACA-3'
	R1	5'-TCATAACCGGGTGGCAGAGC-3'
<i>hsp26</i>	F1	5'-CCAGGAGCCCCGAGCCCCATCTACG-3'
	R1	5'-CATCTCGCGCCGCAAAGCCAAAACCTG-3'
<i>hsp27</i>	F1	5'-ATTTGCTGGAGGATGACTTCGGTTTTG-3'
	R1	5'-GGTGGCCATGGCTTCTCTCGTA-3'
<i>rp49</i>	F1	5'-ATGCTAAGCTGTCGCACA-3'
	R1	5'-GAATCCGGTGGGGAGCAT-3'
<i>Tub1</i>	F1	5'-ACATCCCGCCCCGTGGTCTGAA-3'
	R1	5'-CTGCTCCTCCTCGAACTCGGCGTC-3'

2.5. Genomová DNA

Pro izolaci gDNA byla použita celá těla jednotlivých dospělců z chovů, samci (M) a samice (F) odděleně, pro oba kmeny (pracovní značení: +1M, +2F, +3F; -1M, -2M, -3F, -4F; kde + znamená kmen Hsp+ a kde - znamená kmen Hsp-; M, samec; F, samice). K izolaci jsme použili reagentie z pracovního kitu *DNeasy Tissue Kit (Qiagen GmbH)*. Použili jsme následující protokol:

- 1) Vybrané dospělé jsme uspali pomocí CO₂, umístili do Eppendorfových zkumavek (1,5 mL) a okamžitě usmrtili v tekutém dusíku.
- 2) Ke každému vzorku jsme přidali 180 µL ATL pufru a celkovou tkáň jsme rozstříhali nůžkami.
- 3) Připipetovali jsme 20 µL proteinázy K (*Qiagen GmbH*) a vzorky jsme přes noc inkubovali při 55°C v inkubátoru MC01-N (*Major Science*®).
- 4) Následující den jsme vzorky vortexovali na (*Biovortex VI, Biosan*) po dobu 20 s a přidali 200 µL AL pufru a okamžitě promíchali. Následně jsme vzorky inkubovali při 70°C po dobu 10 min.
- 5) Po inkubaci jsme vzorky vortexovali a přidali 200 µL 100% EtOH a vzorek promíchali.
- 6) Vzniklou substanci (600 µL) jsme přepipetovali do sběrné kolonky, tu jsme umístili na podtlakový odsávač (*Promega*®). Podtlakem byla odstraněna vodná fáze, DNA zůstala v kolonce.
- 7) Do kolonky jsme napipetovali 500 µL AW1 pufru a opět jsme odsávali.
- 8) Do kolonky jsme napipetovali 500 µL AW2 pufru a opět jsme odsávali.
- 9) Kolonku jsme umístili do 1,5 mL Eppendorffovy zkumavky a do kolonky jsme pipetovali 200 µL AE pufru, inkubovali 1 min při pokojové teplotě (dále jen r.t.).
- 10) Vzorky jsme centrifugovali na centrifuze *Universal 32 r (Hettich*®) při 10.000 g / 1 min / r.t..
- 11) Krok 9 a 10 jsme opakovali, ve výsledku jsme získali 400 µL vzorek DNA rozpuštěné v AE pufru.

Jelikož jsme použili velmi malé množství tkáně, předpokládáme, že koncentrace gDNA bude v AE pufru velice nízká. Proto jsme přidali následující kroky pro výsledné vysrážení gDNA v etanolu.

- 12) Ke každému vzorku jsme napipetovali 40 μL 3M octanu sodného.
- 13) Přidali jsme 800 μL 100% EtOH.
- 14) Centrifugovali jsme při 20.000 g / 5 min / 4°C.
- 15) Tekutou fází jsme odsáli, na dně zkumavky zůstala peleta.
- 16) Napipetovali jsme 500 μL 70 % EtOH.
- 17) Centrifugovali jsme při 20.000 g / 5 min / 4°C.
- 18) EtOH jsme důkladně vysáli a otevřené zkumavky jsme nechali cca 5 – 6 minut sušit.
- 19) Peletu jsme rozpustili v 22 μL DEPC vody (destilovaná voda obsahující diethylpyrokarbonát, který inaktivuje RNázy), z každého vzorku jsme odebrali 1 μL pro měření koncentrace. Ta byla provedena na spektrofotometru *NanoDrop 2000* (*Thermo scientific*®), záznam byl proveden za použití podpůrného programu *Nanodrop 2000*.
- 20) Vzorky byly naředěny (Tab. 2.5) na shodnou koncentraci ($c = 0,02 \text{ mg/mL}$) a uskladněny v mrazícím boxu při teplotě -80°C.

Tab. 2.5: Leveling vzorků gDNA. Původní vzorek +2M byl spotřebován při předchozích pokusech, podle něj (nejnižší konc) probíhal leveling

Vzorek	koncentrace gDNA [$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]	Abs 260/280	přidat vodu [μL]	výsledná koncentrace [mg/mL]
+1M	0,0570	1,72	38,9	0,02
+2F	0,1440	1,83	130,2	0,02
+3F	0,1458	1,84	132,1	0,02
-1M	0,0707	1,72	53,2	0,02
-2M	0,0391	1,76	20,1	0,02
-3F	0,1209	1,83	106,0	0,02
-4F	0,1497	1,79	136,2	0,02

- 21) Pro PCR analýzu jsme použili následující páry primerů (viz Tab 2.4):
 - Hsp70Aa F1 x R1
 - Hsp70Aa F5 x R4
 - Hsp70Aa F6 x R5
- 22) Všechny vzorky byly podrobeny PCR reakci v 20 μL reakcích dle následujícího protokolu (Tab. 2.6). Master Mix (MM) byl sestaven pro celkem 42 reakcí.:

Tab. 2.6: Master mix pro PCR.

	1 x [μL]	21x [μL]
DEPC voda	10,5	220,5
dNTP	1,6	33,6
10x buffer	2,0	42
HS ExTaq	0,1	2,1
Primer F	0,4	x
Primer R	0,4	x

cDNA	5	x
Σ	20	x

15 μ L MM bylo vždy připipetováno k vzorkům ve 200 μ L Eppendorfových zkumavkách obsahujících 5 μ L vzorku gDNA – celkově tedy 20 μ L reakce.

23) PCR reakce byla provedena na *Thermocycler T3000 (Biometra®)* při použití následujícího protokolu:

95°C	30 min	←	↑ 29x
94°C	30 s		
59°C	30s		
72°C	90s	→	
4°C	10 min		
15°C	∞		

24) Pro každou sérii produktů (celkem 3x) jsme si připravili 2% agarózový gel z 1 g agarózy, 1 mL TAE 50x pufru (obsahuje 40 mM Tris-HCl, 20 mM kys. octová, 1 mM EDTA pH = 8) a 49 mL vody.

25) Ke vzorkům jsme napipetovali 2 μ L *Loading Dye 6x (Promega)*. Vzorky byly spolu s markerem (*100 bp ladder, Lonza*) napipetovány na gel.

26) Rozdělení produktů probíhalo při napětí 100 V po dobu 20 minut, gely byly poté namáčeny po dobu 15 min v 0,02% roztoku Etidium bromidu v TE pufru (obsahuje 10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA) pro vizualizaci PCR produktů.

27) Gely byly vyfotografovány pod UV světlem (*W/UV Transluminator, UVP®*)

2.6. Transkripční analýza genů *hsp*

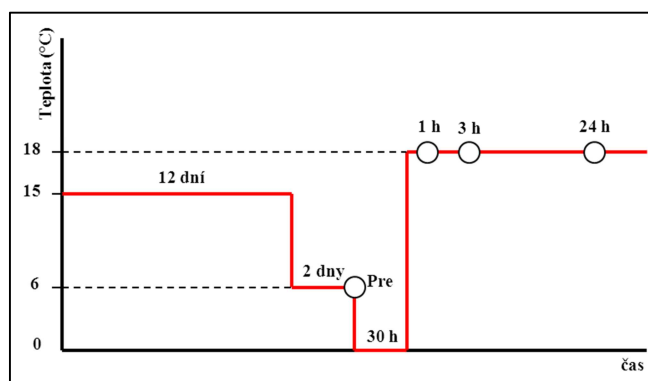
2.6.1. Výběr aklimace a vystavení chladu

Byly použity larvy aklimační varianty Dm 15→6, které byly následně vystaveny mírnému chladu (0°C) po dobu 30 hodin. Larvy byly odebírány z diety ve čtyřech různých časech (Obr. 2.5).

2.6.2. Izolace tRNA

1) Pracovali jsme na ledě ve sterilním prostředí.

2) Larvy byly očištěny v destilované vodě, usušeny a okamžitě usmrceny v tekutém dusíku.



Obr. 2.5: Čtyři vybrané varianty (kroužky) pro transkripční analýzu po aklimaci 15→6.

- 3) Ke vzorku jsme napipetovali 500 μL *RibozolTM RNA Extraction reagent* (*Amresco*®), celkovou tkáň jsme nejprve rozstříhali nůžkami, poté homogenizovali homogenizátorem.
- 4) Vzorky jsme nechali stát 10 min při RT, každých 10 min vortex.
- 5) Ke každému vzorku jsme napipetovali 200 μL chloroformu (stabilizovaný v amyleny; *Sigma*®) a okamžitě řádně promíchali po dobu 15 sec. Vzorky jsme poté ponechali 5 min při RT.
- 6) Mezitím jsme si připravili Eppendorfovy zkumavky (1,5 mL) s 200 μL isopropanolu.
- 7) Vzorky jsme centrifugovali při 15.000 g/15 min/4°C.
- 8) Po centrifugaci jsme odebrali 200 μL svrchní vodné fáze obsahující RNA do připravených zkumavek (krok 6) a vzorky mírně promíchali.
- 9) Vysrážení RNA probíhalo po dobu 30 min na ledě.
- 10) Centrifugovali jsme při 20.000/20 min/4°C.
- 11) Po centrifugaci jsme pipetou odsáli veškerou vodnou fázi, na dně zbyla peleta.
- 12) K usazené peletě jsme pipetovali 500 μL 75% EtOH (v DEPC vodě) a mírně promíchali.
- 13) Centrifugovali jsme při 20.000 g/5 min/4°C.
- 14) Důkladně jsme odsáli veškerou vodnou fázi a peletu jsme sušili po dobu 5-6 min.
- 15) Peletu jsme rozpustili v 11 μL DEPC vody. 1 μL vzorku jsme použili na měření koncentrace:

Měřili jsme na spektrofotometru *Varian UV Spectrophotometer*. Absorbanci při 260 nm jsme měřili pro 1 μL vzorku + 149 μL DEPC vody. K výpočtu koncentrace (Tab 2.5) jsme použili následující rovnici:

$$Abs_{260} \times 40 \times \text{faktor rozpustnosti (tj. 150)} / 1000 = \text{koncentrace } [\mu\text{g}/\mu\text{L}]$$

- 16) Vzorky byly následně uchovány v při -80°C před použitím pro cDNA syntézu.

2.6.3. cDNA syntéza

- 1) 5 μg alikvot každého vzorku jsme napipetovali do malé Eppendorfovy zkumavky (200 μL).
 - 2) Připravili jsme si Master Mix a připravili 20 μL reakce (Tab. 2.8) s použitím kitu *Reverse transcription system* (*Promega*):
 - 3) Inkubace reakce proběhla na *Thermocycler T3000* při použití následujícího protokolu
- | | |
|------|--------|
| 42°C | 45 min |
| 95°C | 5 min |

4°C

5 min

Tab. 2.7: Ředění vzorků tRNA na výslednou koncentraci 1 µg/µL

Vzorek	Abs 260	Abs 260/280	konc. [µg/µL]	přidat vodu [µL]	Vzorek	Abs 260	Abs 260/280	konc. [µg/µL]	přidat vodu [µL]
+ Pre a	1,3032	1,83	7,8192	68,2	- Pre a	1,5587	1,8154	9,3522	83,5
+ Pre b	2,0246	1,86	12,1476	111,5	- Pre b	1,2493	1,7911	7,4958	65,0
+ Pre c	0,9134	1,79	5,4804	44,8	- Pre c	1,8209	1,8311	10,9254	99,3
+ 1 a	1,1340	1,79	6,8040	58,0	- 1 a	0,1875	1,7606	1,1250	1,3
+ 1 b	1,1369	1,79	6,8214	58,2	- 1 b	1,0773	1,7842	6,4638	54,6
+ 1 c	1,3721	1,82	8,2326	72,3	- 1 c	1,2175	1,7952	7,3050	63,1
+ 3 a	1,8356	1,85	11,0136	100,1	- 3 a	1,4035	1,8030	8,4210	74,2
+ 3 b	1,1108	1,80	6,6648	56,6	- 3 b	0,6109	1,7585	3,6654	26,7
+ 3 c	1,2634	1,81	7,5804	65,8	- 3 c	1,3898	1,8056	8,3388	73,4
+ 24 a	1,0813	1,80	6,4878	54,9	- 24 a	1,2519	1,7960	7,5114	65,1
+ 24 b	0,5813	1,76	3,4878	24,9	- 24 b	1,0540	1,7718	6,3240	53,2
+ 24 c	1,7958	1,84	10,7748	97,7	- 24 c	1,3804	1,7982	8,2824	72,8

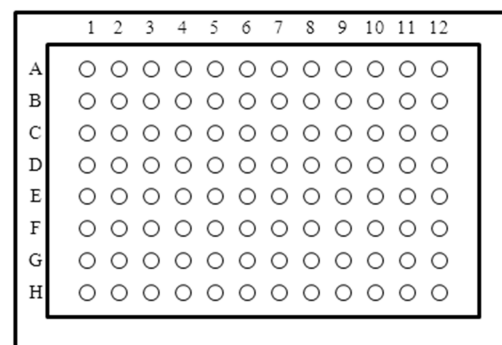
Tab. 2.8: MM pro reverzní transkripci.

	1x [µL]	24x [µL]
MgCl ₂	4	96
10x buffer	2	48
dNTP mix	2	48
RNasin	0,5	12
AMV-RT	0,8	19,2
Oligo (dT) ₁₅	1	24
DEPC voda	4,7	112,8
tRNA templát	5	x
Σ	20	x

- 4) Vzniklá jednovláknová cDNA byla zředěna 25x přidáním 480 µL DEPC vody.
- 5) Vzorky byly rozděleny na alikvoty a skladovány v -80°C před použitím pro qRT-PCR.

2.6.4. qRT-PCR

- 1) Naředěná cDNA byla rozpipetována na analyzační destičku *Biorad Hardshell*, která obsahuje 96 studniček (Obr. 2.6).
- 2) Ke každé reakci bylo vždy přidáno 15 µL Master Mixu (Tab 2.9) obsahující požadovaný pár primerů:



Obr. 2.6: Schéma destičky pro qRT-PCR. Vzorky byly pipetovány v dubletech (svisle) vždy ve třech opakováních (série a,b,c; vodorovně)

Tab. 2.9: MM pro qRT-PCR

	1x [μ L]	100x [μ L]
iQ Mix (<i>Biorad</i>)	10	1000
DEPC voda	4,2	420
cDNA templát	5	x
primer F	0,4	x
primer R	0,4	x
Σ	20	x

3) Destička byla analyzována kvantitativním zhodnocením relativní četnosti transkriptů cílových genů vůči četnosti transkriptů referenčních genů (podrobnosti viz dále). Reakce probíhaly na termocycleru *CI1000*, *CFX96 Real-Time system* s použitím podpůrného programu *Biorad CFX Manager*.

95°C 3 min
 94°C 15 s ←
 60°C 30s ↑40x
 72°C 30s →
 analýza bodu tání produktů reakce

Pro analýzu jsme vybrali primery uvedené v Tab. 2.4, pro gen *hsp70Aa* jsme vybrali pouze pár F7 x R5, protože tento vykazuje nejvyšší specifičnost pro sekvenci tohoto genu.

2.6.5. Agarózový gel

Následující vzorky jsme napipetovali na agarózový gel (postup viz výše) a zhodnotili.

+ Pre a	- Pre a
+ 1 a	- 1 a
+ 3 a	- 3 a
+24a	- 24 a

2.6.6. Výběr referenčních genů

Pro výběr referenčních genů bylo nutno si zvolit takové geny, jejichž transkripce je stálá a nezvyšuje se ani po dlouhodobém vystavení chladu (Ponton et al., 2011). Tuto podmínku splňují geny *rp49* a *β -tubulin* (viz Tab. 2.4), jejichž hladina četnosti zůstává konstantní i po dlouhodobém vystavení chladu (Korbelová, 2011).

2.7. Statistické vyhodnocení

Pro hodnocení výsledků experimentu krátkého chladového šoku (kap. 2.3.1) a dlouhodobého vystavení mírnému chladu (kap. 2.3.2) jsme nepoužili žádnou statistickou analýzu. V programu *Prism 5 (GraphPad software)* jsme vytvořili grafy porovnávající přežití dvou variant: Hsp⁺ a Hsp⁻

Při hodnocení výsledků transkripční analýzy (kap. 2.6) jsme si spočítali geometrický průměr hodnot C_T referenčních genů, kterou uvádíme jako referenční hodnotu (Ref) vzhledem k relativním četnostem transkriptu zkoumaného genu (X). Použili jsme statistický postup podle Pffafla (2001). Koeficient eficiency amplikace na jeden PCR cyklus (eff) je roven 1,85.:

$$(\text{eff Ref}^{\text{CTRef}}) / (\text{eff X}^{\text{CTX}})$$

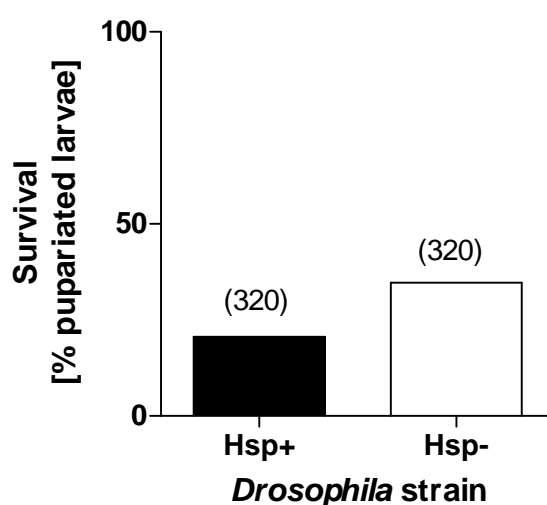
V programu *Prism 5 (GraphPad software)* jsme získaná data dále vyhodnotili pomocí 1) jednocestného ANOVA testu pro posuzování vlivu čtyř variant (Pre, 1, 3, 24) na relativní četnost transkriptu, 2) Bonferroniho testu pro určení statisticky významných rozdílů mezi těmito variantami.

3. Výsledky

3.1. Chladová odolnost

3.1.1 Krátkodobý chladový šok

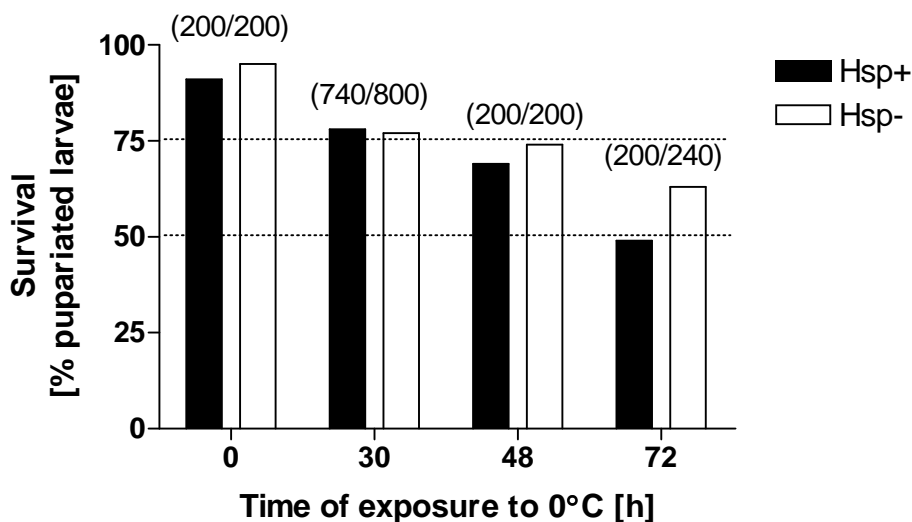
Přežívání larev octomilky *D. melanogaster* v podmínkách krátkodobého chladového šoku ($-4^{\circ}\text{C}/1$ hod) bylo neočekávaně vyšší u kmene Hsp⁻ nežli u kmene Hsp⁺. Zatímco u kmene Hsp⁻ přežilo až do stádia pupária celkem 34,7% jedinců z celkového počtu 320 jedinců, u kmene Hsp⁺ to bylo pouze 20,6% jedinců ze 320 (Obr. 3.1).



Obr. 3.1: Porovnání přežití Hsp⁺ a Hsp⁻ po vystavení krátkodobému chladovému šoku.. V závorce jsou uvedena příslušná n.

3.1.2 Dlouhodobé vystavení chladu

Přežívání larev octomilky *D. melanogaster* v podmínkách dlouhodobého vystavení mírnému chladu ($0^{\circ}\text{C}/30-72$ h) bylo srovnatelné u obou kmenů, ačkoli se opět projevovала tendence k vyššímu přežívání u larev kmene Hsp⁻ než u kmene Hsp⁺ (Obr. 3.2). Zhruba po třech dnech (72 h) vystavení mírnému chladu kleslo přežívání larev přibližně na 50% u obou kmenů.

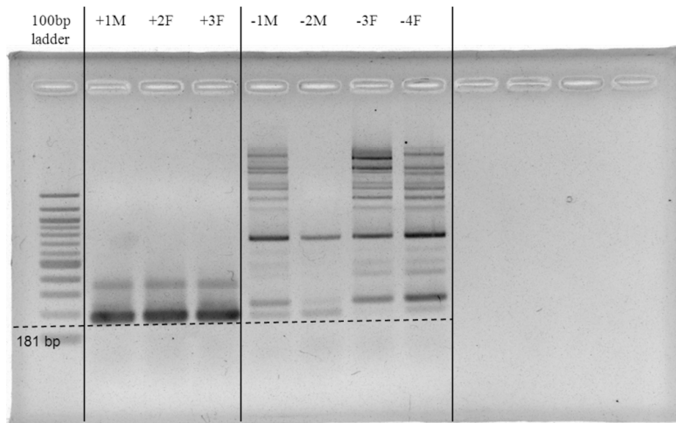


Obr. 3.2: Porovnání přežití Hsp⁺ a Hsp⁻ po vystavení dlouhodobému chladu. V závorce jsou uvedena příslušná n. Tečkovanou čarou jsou naznačeny hodnoty Lt₅₀ a Lt₂₅.

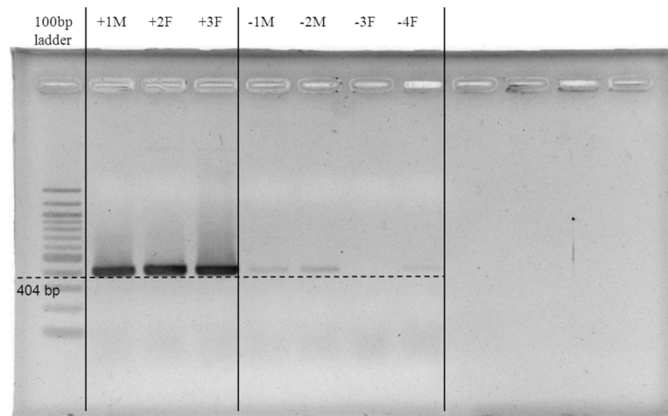
3.2. Genómová DNA

Všechny vzorky u Hsp⁺ vykazují produkci zřetelných a unikátních PCR produktů o očekávané délce při použití všech párů vybraných primerů. Agarózový gel ukazuje, že také některé vzorky připravené z kmene Hsp⁻ dávají vznik PCR produktům, jejichž délka se shoduje s očekávanou délkou produktu z genu *hsp70*, který by ovšem měl v genomu kmene Hsp⁻ zcela chybět. Tyto produkty byly lépe patrné při použití některých párů vybraných primerů (F1xR1 nebo F5xR4). Jiné páry primerů naopak neprodukovaly u kmene Hsp⁻ téměř žádné produkty očekávané délky (F6xR5). Zároveň je patrné, že tyto produkty se nacházejí pouze u některých jedinců, zatímco u jiných se netvoří (samice -3F) (Obr. 3.3, 3.4 a 3.5). Při použití primerů F1xR1 došlo k masívní produkci nespecifických PCR produktů.

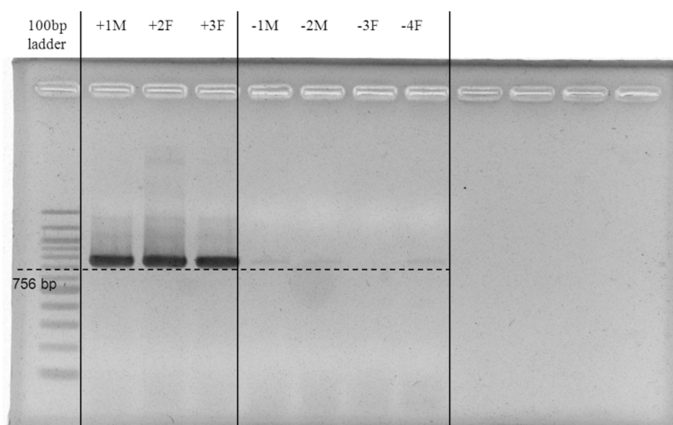
<u>Pár primerů</u>	<u>délka PCR produktu</u>
F1R1	181 bp
F5R4	404 bp
F6R5	756 bp



Obr. 3.1: **F1R1** PCR produkty pro Hsp^+ a Hsp^- . Hsp^- obsahuje velké množství náhodných produktů různých velikostí.



Obr. 3.2: **F5R4** PCR produkty pro Hsp^+ a Hsp^- . Hsp^- obsahuje nepatrné množství produktu souhlasícího s požadovanou délkou.



Obr. 3.3: **F6R5** PCR produkty pro Hsp^+ a Hsp^- . Hsp^- obsahuje nepatrné množství produktu souhlasícího s požadovanou délkou.

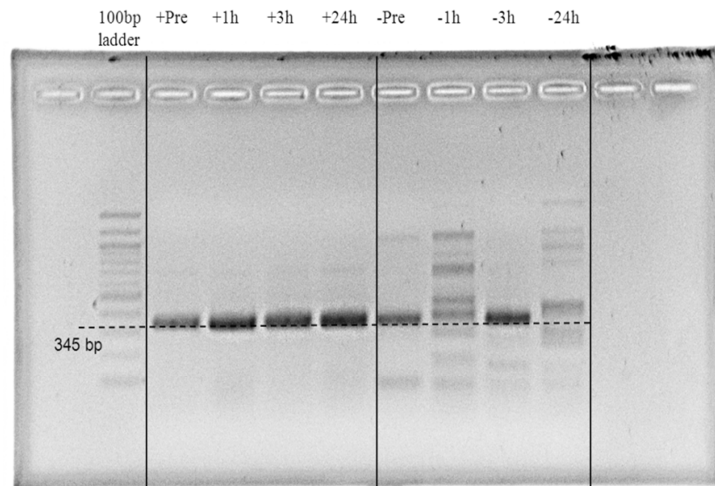
3.3. Transkripční analýza genů *hsp*

3.3.1. Gen *hsp70*

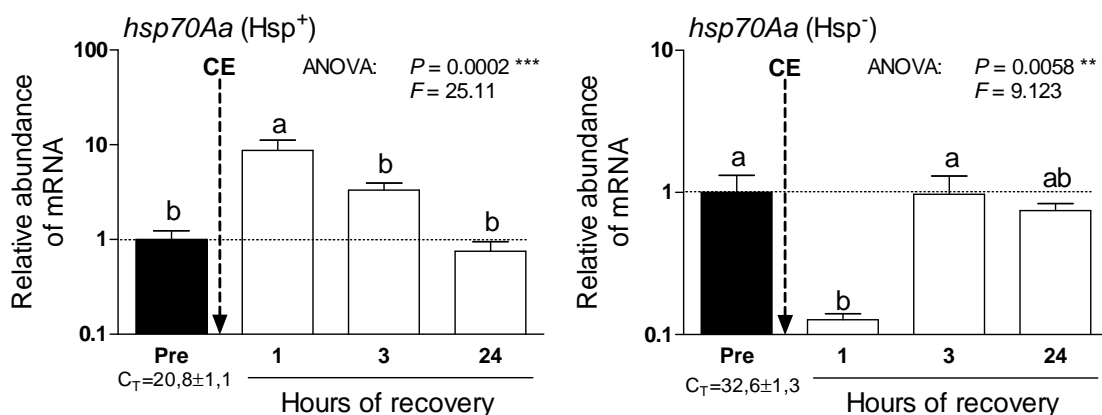
Patern qRT-PCR produktů na agarózovém gelu při použití páru primerů pro *hsp70* F7xR5 (očekávaná délka produktu 345 bp) ukazuje v zásadě podobný výsledek jako u analýzy genomové DNA (Obr. 3.6.). Opět vidíme zřetelné a unikátní produkty s odpovídající délkou při použití cDNA získané z kmene Hsp^+ . Při použití cDNA získané z kmene Hsp^- jsou produkty jen u některých vzorků (-Pre, -3h), u vzorku -1h se vytvořilo množství nespecifických produktů a u vzorku -24h se nevytvořily téměř žádné produkty (Obr. 3.6.). Je třeba zdůraznit, že gel ukazuje produkty po 40 cyklech qRT-PCR reakcí. Z tohoto gelu tedy nelze usuzovat o abundanci specifické templátové cDNA. K jejímu odhadu slouží výsledky kvantitativní PCR v reálném čase.

Výsledky qRT-PCR pro gen *hsp70* jsou uvedeny na Obr. 3.7. U kmene Hsp^+ pozorujeme signifikantní, zhruba 10-ti násobnou upregulaci relativní četnosti transkriptů pro gen *hsp70* po expozici chladu. Vidíme také typický časový průběh, kdy upregulace dosahuje

vrcholu v čase zotavení po chladové expozici zhruba 1 h, v čase 3 h již upregulace dohasíná a v čase 24 h již není vůbec patrná. Důležitý je rovněž údaj $C_T = 20,8 \pm 1,1^\circ\text{C}$ uvedený pod sloupcem Pre. Toto číslo udává průměrný kritický cyklus (\pm S.D.) qRT-PCR, při němž dochází ke startu exponenciálního nárůstu četnosti produktů. Kritický cyklus C_T nepřímo úměrně odpovídá množství templátové cDNA v reakci. U kmene Hsp⁻ je hodnota $C_T = 32,6 \pm 1,3^\circ\text{C}$, což je o 11,8 cyklů později. Z toho se dá odvodit, že průměrná četnost templátové cDNA je u kmene Hsp⁻ zhruba 1421x ($1,85^{11,8}$) nižší než u kmene Hsp⁺! Kromě tohoto dramatického rozdílu v četnosti templátové cDNA vidíme u obou kmenů zřetelně odlišný patern exprese. Zatímco u kmene Hsp⁺ je patrná upregulace *hsp70* v průběhu zotavení, u kmene hsp⁻ je vidět spíše dowregulace v čase 1 h, popřípadě žádné změny v ostatních časech.



Obr. 3.6: **F7R5** qRT-PCR produkty pro Hsp⁺ (+Pre až +24) a Hsp⁻ (-Pre až -24)



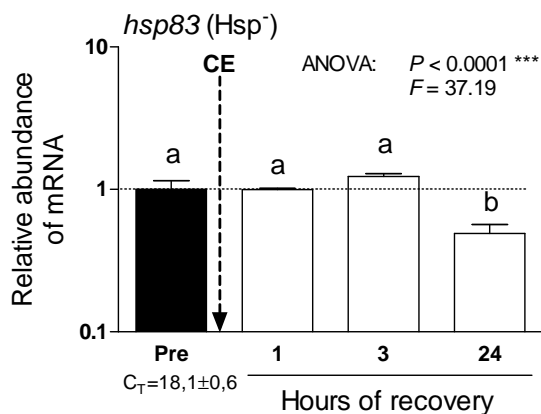
Obr. 3.7: Porovnání abundance transkriptu *hsp70Aa* u dvou kmenů *Drosophily*. Shodná písmena nad sloupečky označují skupiny, které se statisticky významně neliší. V každém grafu je uvedena hodnota P a F (dle ANOVA). Pod vzorkem Pre je vždy uvedena průměrná hodnota C_T s příslušnou odchylkou

3.3.2. Ostatní geny

Následující grafy obsahují data relativní četnosti transkriptu všech genů ostatních nadrodiny Hsp (Obr. 3.8 - 3.22)

1) Rodina Sp90

Hladina transkriptu *hsp83* se po zotavování se z dlouhodobé chladové expozice nezvyšovala.

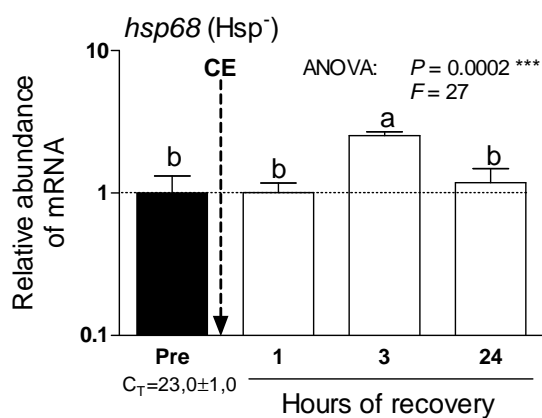


Obr. 3.8: Relativní četnost transkripce pro *hsp83*.

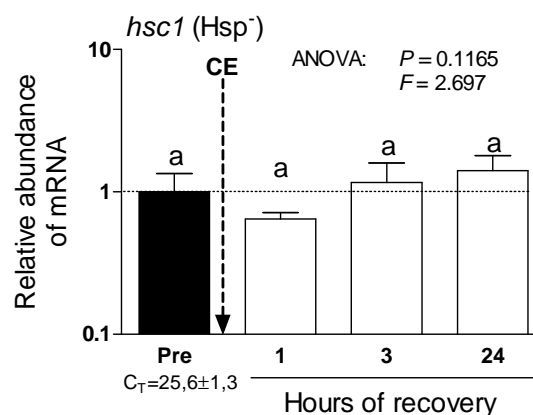
2) Rodina Sp70

Hladina transkriptu *hsp68* se mírně zvýšila cca 2,5 krát v době 3 hod. po vystavení chladu.

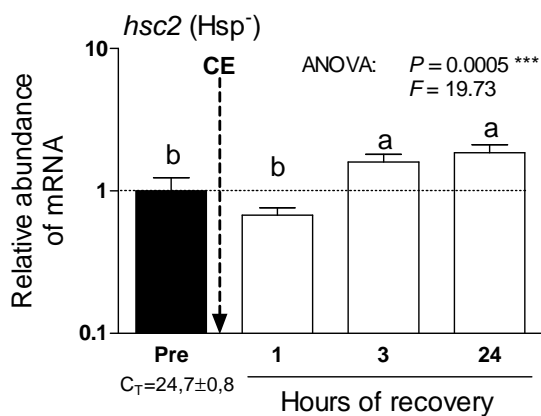
Hladina transkriptů *hsc1*, *hsc2* a *hsc3* se výrazně nezvyšovala, *hsc4* mírně v době 3 hod..



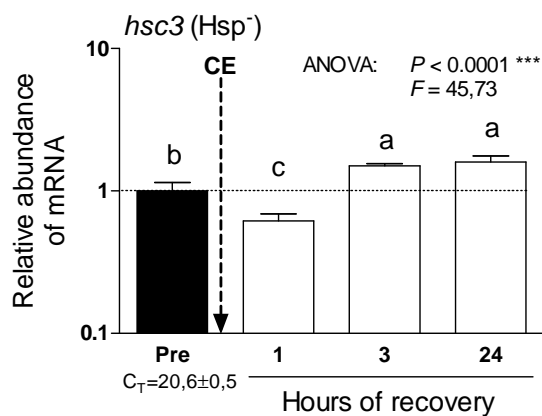
Obr. 3.9: Relativní četnost transkripce pro *hsp68*.



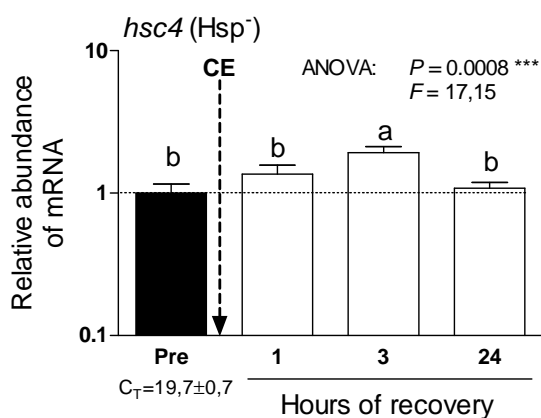
Obr. 3.10: Relativní četnost transkripce pro *hsc1*.



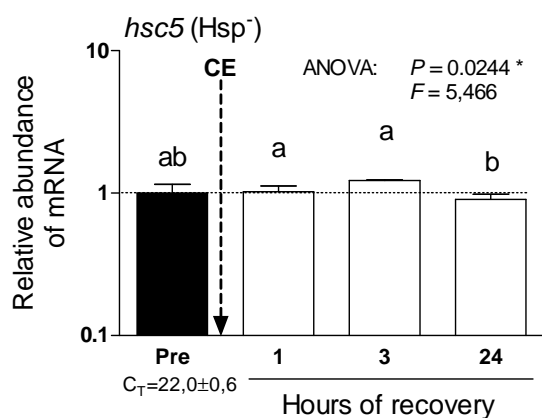
Obr. 3.11: Relativní četnost transkripce pro *hsc2*.



Obr. 3.12: Relativní četnost transkripce pro *hsc3*.



Obr. 3.13: Relativní četnost transkripce pro *hsc4*.



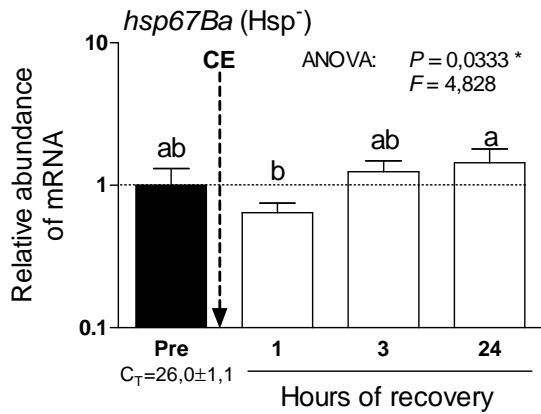
Obr. 3.14: Relativní četnost transkripce pro *hsc5*.

3) small Hsps

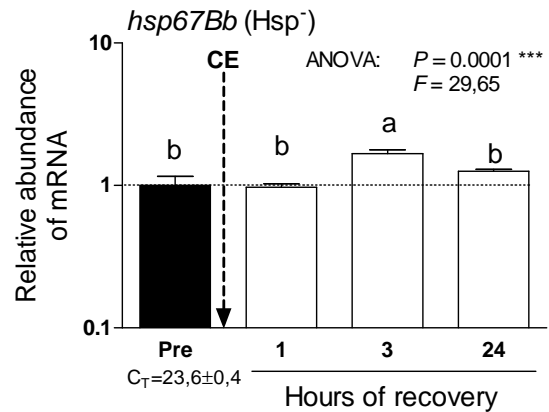
Hladina transkriptů *hsp67Ba*, *hsp67Bb* a *hsp67Bc* se výrazně nezvyšovala.

Hladina transkriptu *hsp22* se výrazně zvýšila v době 3 hod cca 12x a mírně se zvýšila u transkriptů *hsp23* 3x, *hsp26* 5x a *hsp27* 2x taktéž v době 3 hod.

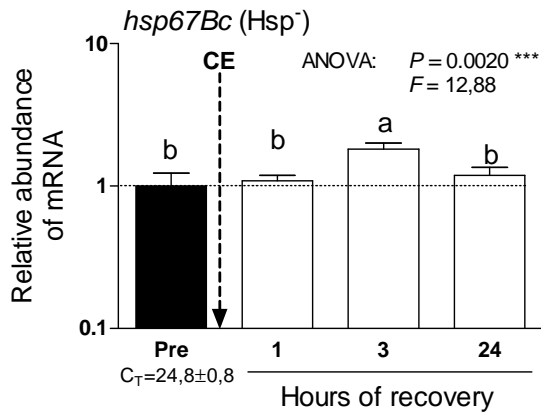
Hladina transkriptu *hsp40* se mírně zvýšila cca 2x v době 1 hod.



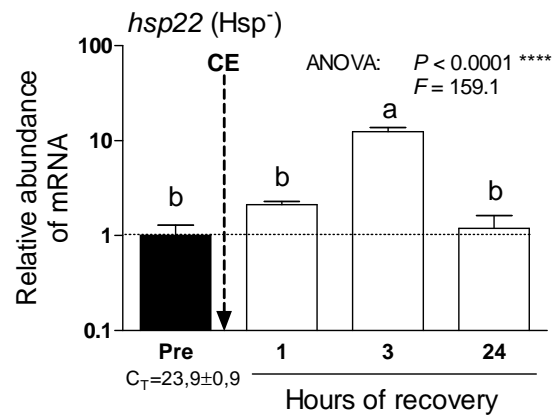
Obr. 3.15: Relativní četnost transkripce pro *hsp67Ba*.



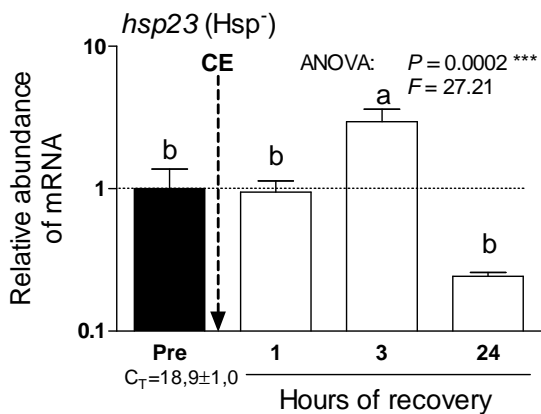
Obr. 3.16: Relativní četnost transkripce pro *hsp67Bb*.



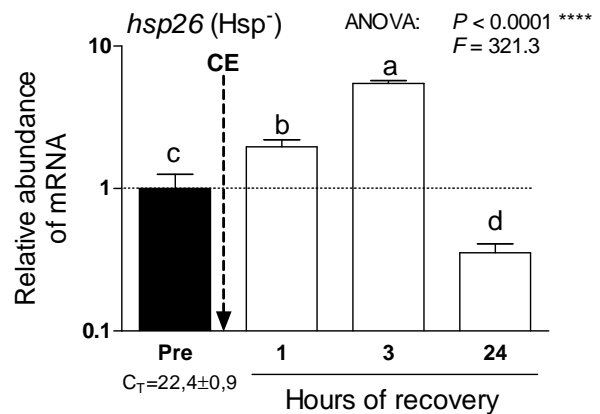
Obr. 3.17: Relativní četnost transkripce pro *hsp67Bc*.



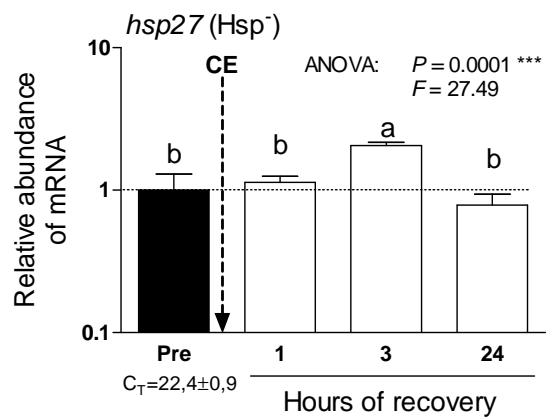
Obr. 3.18: Relativní četnost transkripce pro *hsp22*.



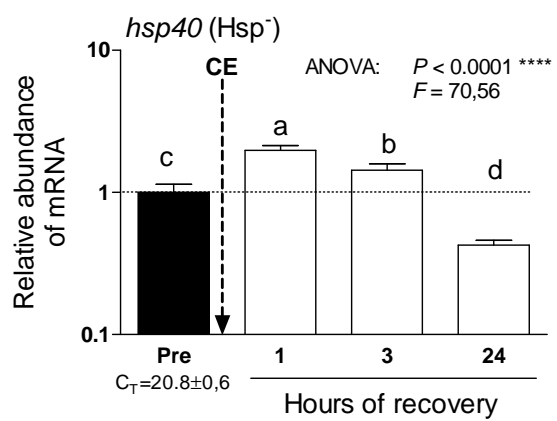
Obr. 3.19: Relativní četnost transkripce pro *hsp23*.



Obr. 3.20: Relativní četnost transkripce pro *hsp26*.



Obr. 3.22: Relativní četnost transkripce pro *hsp40*.



Obr. 3.21: Relativní četnost transkripce pro *hsp27*.

4. Diskuze

Cílem této práce bylo především připravit podmínky pro následující detailní experimenty. Zejména šlo o ověření absence všech kopií genu *hsp70* v genomu kmene Hsp⁻ octomilky *D. melanogaster*; dále o ověření absence transkripční odpovědi tohoto genu na chladový šok, a nakonec o posouzení možnosti, zda dochází (či nikoli) ke kompenzační upregulaci jiného genu z komplementu šokových proteinů náhradou za chybějící gen *hsp70*. Kromě toho jsme ověřovali, zda má delece genu *hsp70* u kmene Hsp⁻ vliv na jeho chladovou odolnost. Všechny tyto cíle se podařilo alespoň částečně splnit.

Na úrovni genomu jsme předpokládali téměř kompletní absenci genu *hsp70* u mutantního kmene Hsp⁻. Slovo téměř vyjadřuje situaci, kterou popisují již originální práce, ve kterých byl mutantní kmen Hsp⁻ připraven a otestován. (Gong et al., 2004; Bettencourt et al., 2008). Ve druhé z obou uvedených studií bylo totiž zjištěno, že deleci se nepodařilo provést zcela kompletně. V genomu Hsp⁻ byl nalezen zbývající fragment jedné kopie, patrně kratší než 1000 bp, a nacházející se blízko 3'-konce kódující sekvence. Naše výsledky rovněž potvrzují velmi slabou reakci specifických primerů na genomovou DNA u kmene Hsp⁻. Cílem dalších analýz bude přesná lokalizace zbytku *hsp70* genu pomocí série již připravených specifických primerů. Naše výsledky rovněž naznačují, že fragment genu *hsp70* nemusí být přítomen v každém jedinci Hsp⁻ kmene, ale že se může vyskytovat s určitou frekvencí v rámci celé populace. Pro naše další cíle je podstatné, že tento zbývající fragment vykazuje nulovou nebo jen velmi nízkou transkripční schopnost a není tedy zdrojem proteinového produktu.

Pro geny komplementu *hsp* existuje jeden velký specifický problém, a tím je vysoká příbuznost sedmi různých kopií *hsp70*, jedné kopie *hsp68* a navíc ještě 5 kopií *hsc70* sekvencí, které se shodují až z 96% (Feder et al., 1995). Je tedy velmi obtížné nalézt v sekvenci vhodné místo pro pár primerů, který by zcela specificky produkoval pouze a právě jediný PCR produkt ze svého specifického templátu. Ne zcela specifické primery tak mohou za určitých podmínek, zejména při nevhodně zvolené teplotě pro hybridizaci primerů s gDNA, nasedat na necílové geny a spouštět tvorbu nevyžádaných produktů (Hecker et al., 1996, Wu et al., 1999). Tento problém jsme se pokusili vyřešit alignováním sekvence genu *hsp70Aa* se všemi příbuznými geny v programu Geneious a následným výběrem co nejspecifičtějších párů primerů po celé délce genu.

Na transkripční úrovni jsme předpokládali téměř kompletní absenci transkriptu pro gen *hsp70* a zároveň žádnou upregulační odpověď na chlad. Slovo téměř opět vystihuje situaci již dříve popsanou ve studii Bettencourta et al. (2008), která ukázala, že jistá, velmi nízká úroveň transkripce genu *hsp70* se u kmene Hsp⁻ stále vyskytuje. V uvedené studii byl pozorován kritický cyklus polymerázové reakce qRT-PCR pro gen *hsp70* u kmene Hsp⁻ na hodnotě C_T přibližně okolo 33 (Bettencourt et al., 2008). To je ve velmi dobré shodě s našimi výsledky, kde jsme zjistili C_T = 32,6. Je logické, že pokud není v genomu přítomen gen, nebude se vyskytovat ani jeho transkript. Při qRT-PCR reakci jsme sice pozorovali amplifikaci určitých produktů i u kmene Hsp⁻, ale 1) abundance produktu o očekávané délce (pravděpodobně specifických produktů) byla u kmene Hsp⁻ k více než 1000-násobně nižší než u kmene Hsp⁺, 2) tyto „specifické“ produkty se netvořily u všech vzorků a patrně tedy jejich templáty nejsou přítomny u všech jedinců v populaci Hsp⁻, a 3) ostatní produkty byly nespecifické (tedy měly jinou než očekávanou délku).

V další, výsledkovým rozsahem nejobsáhlejší části práce jsme se zabývali relativními četnostmi mRNA transkriptů pro další geny (jiné než *hsp70*) *Hsp* komplementu u kmene Hsp⁻. Celkem jsem analyzovali transkripční odpověď na chladovou expozici u prakticky všech známých (protein kódujících) genů tohoto komplementu. Celou tuto část lze shrnout konstatováním, že žádný ze sledovaných genů nevykázal u kmene Hsp⁻ žádnou kompenzační upregulaci náhradou za chybějící gen *hsp70*. U některých genů byla pozorovatelná relativně slabá upregulace po vystavení chladu: např. u genů *hsp68*, *hsc4*, *hsp67b*, *hsp40* a zejména pak u všech tzv. "malých" šokových proteinů (*hsp22*, *hsp23*, *hsp26* a *hsp27*). Tyto upregulační odpovědi byly však zcela srovnatelné (pokud se týče výchozí hodnoty C_T i násobku zvýšení četnosti po chladové expozici) se situací u divokého kmene octomilky Hsp⁺ (Korbelová, 2012).

Navzdory prokázaným faktům: 1) téměř kompletní absenci genu *hsp70* v genomu; 2) téměř kompletní absenci jeho transkripční odpovědi na chlad; 3) absenci jakékoli kompenzační odpovědi na transkripční úrovni jiných členů komplementu Hsp, je fenotyp chladové odolnosti kmene Hsp⁻ stejný nebo dokonce mírně lepší nežli u kmene Hsp⁺. Larvy kmene Hsp⁻ prokázaly mírně lepší odolnost proti chladovému šoku (-4°C/1h) a shodnou odolnost proti chronickému vystavení mírnému chladu (0°C/24-72h).

Tyto výsledky lze interpretovat tak, že upregulace genu *hsp70*, která typicky následuje po vystavení chladu u kmene Hsp⁺ (Burton et al., 1988, Goto et al., 1988) není

potřebná pro reparaci chladových poškození. A to proto, že kmen Hsp^- nevykazuje žádnou upregulaci genu *hsp70* a přesto si udržuje normální chladovou odolnost. Prozatím tento závěr považujeme za předběžný. V současnosti se zabýváme expresí na úrovni Hsp proteinů. Velmi překvapivě, naše předběžné výsledky naznačují, že ačkoli není u kmene Hsp^- žádná pozorovatelná upregulační reakce na chlad na transkripční úrovni, existuje možnost, že upregulace "kompenzujícího" Hsp proteinu se odehrává na post-transkripční úrovni. Specifické protilátky proti Hsp70 proteinu ukazují na Western blotech zesílenou tvorbu neznámého proteinu o velikosti přibližně 70kDa (avšak odlišitelného svou délkou od "bandu" skutečného proteinu Hsp70 u kmene Hsp^+). Může se jednat o protein Hsp68 nebo o některou z verzí kognátního proteinu Hsc. V blízké budoucnosti se chceme zaměřit na identifikaci tohoto proteinu a objasnění jeho role při reparaci chladových poškození u larev octomilky *D. melanogaster*.

5. Závěry

- schopnost přežívání larev 3. instaru obou kmenů octomilky *Drosophila melanogaster* se po vystavení krátkému chladovému šoku i po dlouhodobému chladu nelišil.
- gen *hsp70* nebyl ve své plné délce, dle očekávání, v genomu přítomen.
- u mutantního kmene nebyla na úrovni transkripce pozorována žádná kompenzační exprese žádného genu z komplementu *Hsp*.
- ve fázi příprav se nachází další metoda pro důkladnější zkoumání vlivu absence genu *hsp70*, které by mohly odhalit nová fakta na úrovni translace
 - SDS-PAGE elektroforéza
 - Western blotting - pokud existuje kompenzace na úrovni proteinu, je možné ji při použití specifických protilátek odhalit
 - Coomassie staining
 - 2D - Elektroforéza

6. Literatura

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

AHRENS, C.D. (1995) *Meteorology Today: An Introduction to Weather, Climate, and the Environment*, 5th ed., p. 505; *The Guinness Book of Records*, pp. 63–64.

ARRIGO, A.P. and LANDRY, J. (1994) Expression and function of the low-molecular-weight heat shock proteins. In: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto, R.I., Tissières, A., and Georgopoulos, C., Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 335–373.

BALE, J.S. (1987) Insect cold hardiness: freezing and supercooling: an ecophysiological perspective, *J. Insect Physiol.* 33: 899–908.

BALE, J.S. (1993) Classes of insect cold hardiness. *Functional Ecology* 7: 751–753.

BALE, J.S., HODKINSON, I.D., BLOCK, W., WEBB, N.R., COULSON, S.J., and STRATHDEE, A.T. (1997) Life history strategies of Arctic terrestrial arthropods. In *The Ecology of Arctic Environments*, ed. Woodin, S.J. and Marquis, M. British Ecological Society Special Publication No. 13, Oxford: Blackwell, pp. 137–165.

BASHA, E., O'NEILL, H., VIERLING, E. (2012) Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem. Sci.* 37(3): 106–117.

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

BIJLSMA, R. and LOESCHCKE, V. (Eds) (1997) *Environmental stress, adaptation and evolution* (Basel: Birkhäuser Verlag).

BLOCK, W. (1991) To freeze or not to freeze? Invertebrate survival of sub-zero temperatures. *Functional Ecology* 5: 284–290.

- BROWER, L.P. (1995) Understanding and misunderstanding the migration of the monarch butterfly (Nymphalidae) in North America: 1857–1995. *Journal of the Lepidopterists' Society* 49: 304–385.
- BURDON, R.H. (1986) Heat shock and the heat shock proteins. *Biochem. J.* 240: 313–324.
- BURTON, V., MITCHELL, H.K., YOUNG, P., and PETERSEN, N.S. (1988) Heat shock protection against cold stress of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 8(8): 3550–3552.
- COLINET, H., LEE, S.F., and HOFFMANN, A. (2010) Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*. *FEBS J.* 277(1): 174–185.
- CRAIG, E.A. (1985) The heat shock response. *Crit. Rev. Biochem.* 18: 239–280.
- CRILL, W.D., HUEY, R.B., and GILCHRIST, G.W. (1996) Within and between generation effects of temperature on the morphology and physiology of *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 50: 1205–1218.
- CZAJKA, M.C., LEE, R.E. Jr. (1990) A rapid cold-hardening response protecting against cold shock injury in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 148: 245–254.
- DANKS, H.V. (1987) *Insect Dormancy: An Ecological Perspective*. Biological Survey of Canada (Terrestrial Arthropods), Ottawa.
- DANKS, H.V. (2004) Seasonal adaptations in Arctic insects. *Integrative & Comparative Biology* 44: 85–94.
- DOWNER, R.G.H. and KALLAPUR, V.L. (1981) Temperature-induced changes in lipid composition and transition temperature of flight muscle mitochondria of *Schistocerca gregaria*. *Journal of Thermal Biology* 6: 189–194.
- DUMAN, J.G. (1977a) The role of macromolecular antifreeze in the darkling beetle, *Meracantha contracta*. *Journal of Comparative Physiology B* 115: 279–286.
- DUMAN, J.G., WALTERS, K.R., SFORMO, T., CARRASCO, M.A., NICKELL, P.K., LIN, X., and BARNES, B.M. (2010) Antifreeze and ice-nucleator proteins In *Low temperature biology of Insects* (Lee, R.E., Denlinger, D.L.). Cambridge University Press. 390p.

- FEDER, M.E., PARSELL, D.A., LINDQUIST, S.L. (1995) The stress response and stress proteins. In *Cell Biology of Trauma*, ed. Lemasters, J.J., Oliver, C.: pp. 177–191.
- FEDER, M.E. (1996) Ecological and evolutionary physiology of stress proteins and the stress response: the *Drosophila melanogaster* model. *Phenotypic and Evolutionary Adaptation to Temperature* (eds Johnston, I.A. & Bennett, A.F.). Cambridge University Press, Cambridge.
- FEDER, M.E., HOFMANN, G.E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 243–282.
- GETHING, M.J., SAMBROOK, J. (1992) Protein folding in the cell. *Nature* 355(6355): 33–45.
- GONG, W.J. & GOLIC, K.G. (2004) Genomic deletions of the *Drosophila melanogaster* Hsp70 genes. *Genetics* 168, 1467–1476.
- GONG, W.J., GOLIC, K.G. (2006) Loss of Hsp70 in *Drosophila* is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration. *Genetics* 172: 275–286.
- GOTO, S.G., YOSHIDA, K.M., and KIMURA, M.T. (1998) Accumulation of Hsp70 mRNA under environmental stresses in diapausing and nondiapausing adults of *Drosophila triauraria*. *J. Insect Physiol.* 44(10): 1009–1015.
- GREVES, T. (1964) Temperature studies of termite colonies in living trees. *Australian Journal of Zoology* 12(2): 250–262.
- HAGVAR, S. (2010) A review of Fennoscandian arthropods living on and in snow. *European Journal of Entomology* 107(3): 281–298.
- HARTL, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571–580.
- HECKER KH, ROUX KH (1996) High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques* 20(3) : 478–485

- HERSHKO, A., CIECHANOVER, A. (1998) The ubiquitin system, *Annual Reviews Biochemistry* 67. 425–479.
- HOFFMANN, A.A., HERCUS, M.J. (2000) Environmental stress as an evolutionary force. *Bioscience* 50(3). 217–226
- HOLMSTRUP, M., BAYLEY, M., and RAMLOV, H. (2002) Supercool or dehydrate? An experimental analysis of overwintering strategies in small permeable arctic invertebrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 99: 5716–5720.
- HOLMSTRUP, M., WESTH, P. (1994) Dehydration of earthworm cocoons exposed to cold - a novel cold hardiness mechanism. *J. Comp. Physiol. B* 164, 312-315.
- HOWARD, E., DAVIS, A. (2009) The fall migration flyways of monarchs in eastern North America revealed by citizen scientists. *Journal of Insect Conservation* 13: 279–286.
- JAROSIK, V., HONEK, A. AND DIXON, A.F.G. (2002) Developmental rate isomorphy in insects and mites. *American Naturalist*, 160, 497–510.
- KASSENBRÖCK, C.K., GARCIA, P.D., WALTER, P., and KELLY, R.B. (1988) Heavy chain binding protein recognizes aberrant polypeptides translated in vitro. *Nature* 333: 90–93.
- KIANG, J.G., TSOKOS, G.C. (1998) Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology & Therapeutics* 80: 183–201.
- KORSLOOT, A., GETSEL, V.A.M., STRAALLEN, N.M. (2004) *Environmental stress and cellular response in Arthropods*, CRC Press, New York, 197 p.
- KORBELOVÁ, J. (2011) Transcriptional analysis of selected stress proteins in larvae of the fruit fly, *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Mgr. Thesis, in Czech., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. 39 p.
- KOŠŤÁL, V., VAMBERA, J., and BASTL, J. (2004) On the nature of pre-freeze mortality in insects: water balance, ion homeostasis and energy charge in adults of *Pyrrhocoris apterus*. *J. Exp. Biol.* 207: 1509–1521.

- KOŠŤÁL, V. (2010) Cell structural modifications in insects at low temperatures. In *Low temperature biology of Insects* (Lee, R.E., Denlinger, D.L.). Cambridge University Press. 390 p.
- KOŠŤÁL, V., et al. (2011a) Long-term cold acclimation extends survival time at 0°C and modifies the metabolomic profiles of the larvae of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 6:e25025.
- KOŠŤÁL, V., ZAHRADNÍČKOVÁ, H., ŠIMEK, P. (2011b) Hyperprolinemic larvae of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*, survive cryopreservation in liquid nitrogen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 108: 13041–13046.
- KOŠŤÁL, V., ŠIMEK, P., ZAHRADNÍČKOVÁ, H., CIMLOVÁ, J., ŠTĚTINA T. (2012) Conversion of the chill susceptible fruit fly larva (*Drosophila melanogaster*) to a freeze tolerant organism *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 109: 3270-3274.
- KREBS, R.A. and FEDER, M.E. (1997) Natural variation in the expression of the heat-shock protein Hsp70 in a population of *Drosophila melanogaster*, and its correlation with tolerance of ecologically relevant thermal stress. *Evolution* 51: 173–179.
- KREBS, R.A. (1999) A comparison of Hsp70 expression and thermotolerance in adults and larvae of three *Drosophila* species. *Cell Stress & Chaperones* 4: 243–249.
- LACHAISE, D., CARIOU, M.L., DAVID, J.R., LEMEUNIER, F., TSACAS, L., and ASHBURNER, M. (1988) Historical biogeography of the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Evol. Biol.* 22: 159–225.
- LEE, R.E. (1991) Principles of insect low temperature tolerance. In *Insects at Low Temperature*, ed. Lee, R.E. and Denlinger, D.L. New York and London: Chapman and Hall, pp. 17–46.
- LEE, R.E. (2010) A primer on insect cold-tolerance. In *Low temperature biology of Insects* (Lee, R.E., Denlinger, D.L.). Cambridge University Press. 390 p.
- LEE, R.E., DENLINGER, D.L. (2010) Rapid cold-hardening: Ecological significance and underpinning mechanisms (in *Low Temperature Biology of Insects*, ed. Denlinger, D.L. and Lee, R.E. Jr., Published by Cambridge University Press), p. 35–58.

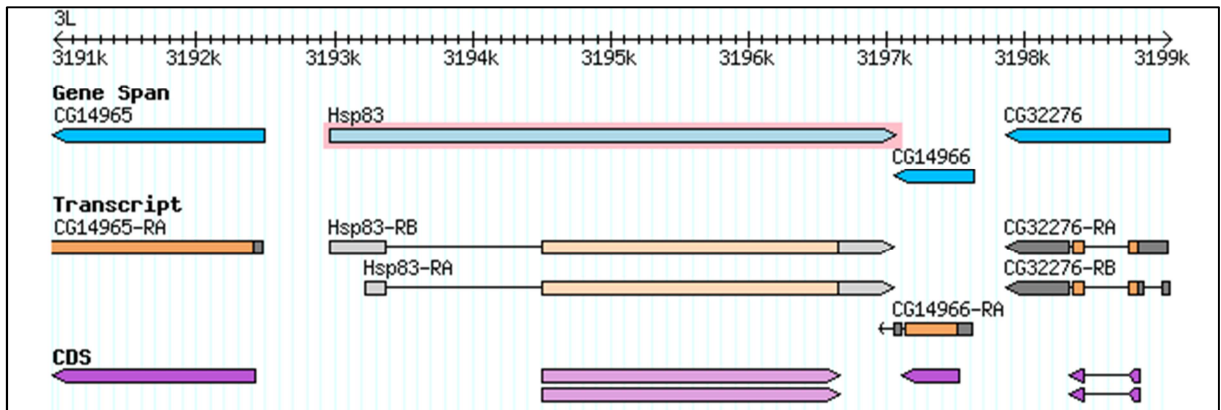
- LEE, R.E. Jr. (1989) Insect cold hardiness: to freeze or not to freeze. How insects survive low temperatures, *BioScience* 39: 308–312.
- LI, S., WANG, G., LIN, H., and HUANG, C.H. (1998) Calorimetric studies of phosphatidylethanolamines with saturated sn-1 and dienoic sn-2 acyl chains. *Journal of Biological Chemistry* 273: 19009–19018.
- LIANG, P., MACRAE, T.H. (1997) Molecular chaperones and the cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* 110: 1431–1440.
- LINDQUIST, S.L. (1986) The heat-shock responses. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 1151–1191.
- LINDQUIST, S., CRAIG, E.A. (1988) The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631–677.
- LOEB, J., NORTHROP, J.H. (1917) On the influence of food and temperature upon the duration of life. *J. Biol. Chem.* 32: 103–121.
- MARCHLER, G., WU, C. (2001) Modulation of *Drosophila* heat shock transcription factor activity by the molecular chaperone DROJ1. *EMBO Journal* 20: 499–509.
- MCCOLL, G., HOFFMANN, A.A., and McKECHNIE, S.W. (1996) Response of two heat shock genes to selection for knockdown heat resistance in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 143: 1615–1627.
- MILLER, L.K. and WERNER, R. (1987) Extreme supercooling as an overwintering strategy in three species of willow gall insects from interior Alaska. *Oikos* 49: 253–260.
- MORIMOTO, R.I., JOLLY, C., SATYAL, S., MATHEW, A., SHI, Y., and KITAGAWA, K. (1999) Molecular chaperones and the heat shock response. *Br. J. Cancer*, 80, S18.
- MYMRIKOV, E.V., SEIT-NEBI, A.S., GUSEV, N.B. (2011) Large potentials of small heat shock proteins. *Physiol. Rev.* 91(4): 1123–1159.
- NEDVĚD, O. (1998) Modelling the relationship between cold injury and accumulated degree days in terrestrial arthropods. *Cryo Letters* 19: 267–274.
- NIELSEN, M.M., OVERGAARD, J., SØRENSEN, J.G., HOLMSTRUP, M., JUSTESEN, J., and LOESCHCKE, V. (2005) Role of HSF activation for resistance to heat, cold and high-temperature knock-down. *J. Insect Physiol.* 51(12): 1320–1329.

- PALTER, K.B., WATANABE, M., STINSON, L., MAHOWALD, A.P., and CRAIG, E.A. (1986) Expression and localisation of *Drosophila melanogaster* Hsp70 cognate proteins. *Mol. Cell. Biol.* 6: 187–203.
- PARSELL, D.A., LINDQUIST, S. (1993) The function of heat-shock proteins in stresstolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review of Genetics* 27: 437–496.
- PLESOFSKY-VIG, N. (1996) The heat shock proteins and the stress response. In *The Mycota 3, Biochemistry and Molecular biology* (Brambl, R. and Mazlut, G.A., Eds.) Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 171–187.
- PONTON, F., CHAPUIS, M.P., PERNICE, M., SWORD, G., SIMPSON, S.J. (2011). Evaluation of potential reference genes for reverse transcription qPCR studies of physiological response in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 57: 840–850.
- PRIVALOV, P.L. (1990) Cold denaturation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25: 281–305.
- QIN, W., NEAL, S.J., ROBERTSON, R.M., WESTWOOD, J.T., and WALKER, V.K. (2005) Cold hardening and transcriptional change in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* 14(6): 607–613.
- RAJAMOHAN, A., SINCLAIR, B.J. (2008) Short-term hardening effects on survival of acute and chronic cold exposure by *Drosophila melanogaster* larvae. *J Insect Physiol* 54:708–718
- RITOSSA, F. (1996) Discovery of the heat shock response. *Cell Stress Chaperones* 1: 97–98.
- RITOSSA, F.M. (1962) A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571–573.
- RUBIN, D.M., MEHTA, A.D., ZHU, J., SHOHAM, S., CHEN, X., WELLS, Q.R., PALTER, K.B. (1993) Genomics structure and sequence analysis of *Drosophila melanogaster* Hsc70 genes, *Gene* 128: 155–163.
- SALT, R.W. (1961) Principles of insect cold-hardiness. *Annual Review of Entomology*: 55–74.

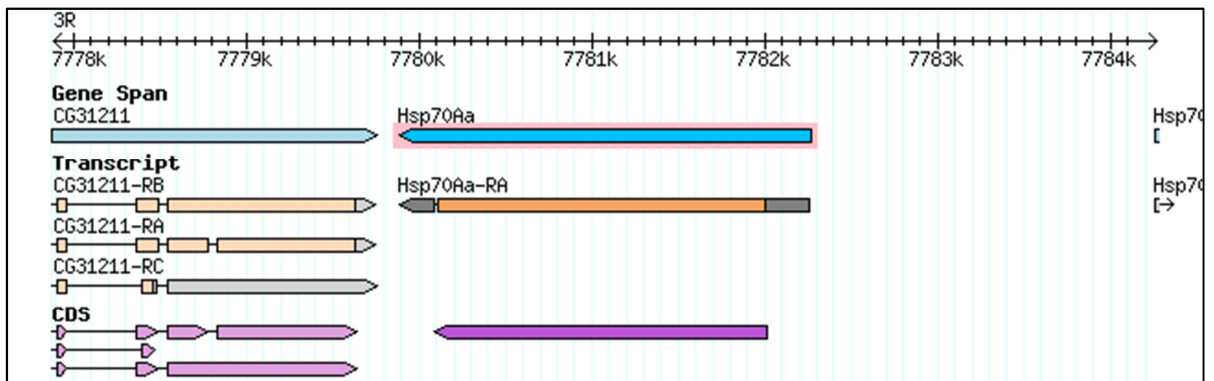
- SALT, R.W. (1962) Intracellular freezing in insects. *Nature* 193: 1207–1208.
- SEJERKILDE, M., SØRENSEN, J.G., LOESCHCKE, V., 2003. Effects of cold and heat hardening on thermal resistance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 49, 719–726.
- SINCLAIR, B.J., GIBBS, A.G., and ROBERTS, S.P. (2007) Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* 16(4): 435–443.
- SINCLAIR, B.J. and RENAULT, D. (2010) Intracellular ice formation in insects: unresolved after 50 years? *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 155(1): 14–18.
- SOLOMON, J.M., ROSSI, J.M., GOLIC, K., MCGARRY, T., LINDQUIST, S. (1991) Changes in hsp70 alter thermotolerance and heat-shock regulation in *Drosophila*. *The New Biologist* 3: 1106–1120.
- SORENSEN, J.G., KRISTENSEN, T.N., LOESCHCKE, V. (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters* 6(11): 1025–1037.
- STABENTHEINER, A., PRESSL, H., PAPST, T., HRASSNIGG, N., CRAILSHEIM, K. (2003) Endothermic heat production in honeybee winter clusters. *J. Exp. Biol.* 206: 353–358.
- STABENTHEINER, A., KOVAC, H., BRODSCHNEIDER, R. (2010) Honeybee colony thermoregulation regulatory mechanisms and contribution of individuals in dependence on age, location and thermal stress. *PloS One* 5(1) Volume 25, Issue 6: 604–611.
- THROCKMORTON, L.H. (1975) The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. *Handbook of Genetics: Invertebrates of Genetic Interest*, ed King, R.C. (Plenum, New York), pp. 421–469.
- UDAKA, H., UEDA, C., and GOTO, S.G. (2010) Survival rate and expression of heat-shock protein 70 and Frost genes after temperature stress in *Drosophila melanogaster* lines that are selected for recovery time from temperature coma. *J. Insect Physiol.* 56(12): 1889–1894.
- VESALA, L., HOIKKALA, A. (2011) Effects of photoperiodically induced reproductive diapause and cold hardening on the cold tolerance of *Drosophila montana*. *Journal of Insect Physiology* 57: 46–51.

- WELTE, M.A., TETRAULT, J.M., DELLAVALLE, R.P., and LINDQUIST, S. (1993) A new method for manipulating transgenes: engineering heat tolerance in a complex, multicellular organism. *Current Biology* 3: 842–853.
- WHARTON, D.A. and FERNS, D.J. (1995) Survival of intracellular freezing by the antarctic nematode *Panagrolaimus davidi*. *J. Exp. Biol.* 198(6): 1381–1387.
- WU DY, UGOZZOLI L, PAL BK, QIAN J, WALLACE B (1991) The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* 10: 233–238.
- YIANGOU, M., TSAPOGAS, P., NIKOLAIDIS, N., and SCOURAS, Z.G. (1997) Heat shock gene expression during recovery after transient cold shock in *Drosophila auraria* (Diptera: Drosophilidae). *Cytobios*, 92(369): 91–98.
- ZACHARIASSEN, K.E. (1980) The role of polyols and nucleating agents in cold-hardy beetles. *Journal of Comparative Physiology B* 140: 227–234.
- ZACHARIASSEN, K. E. (1985) Physiology of cold tolerance in insects. *Physiological Reviews* 65: 799–832.

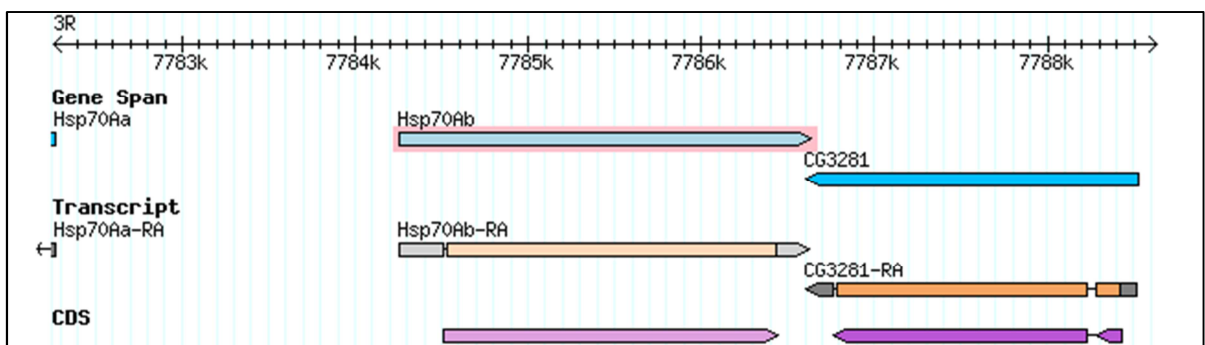
7. Příloha



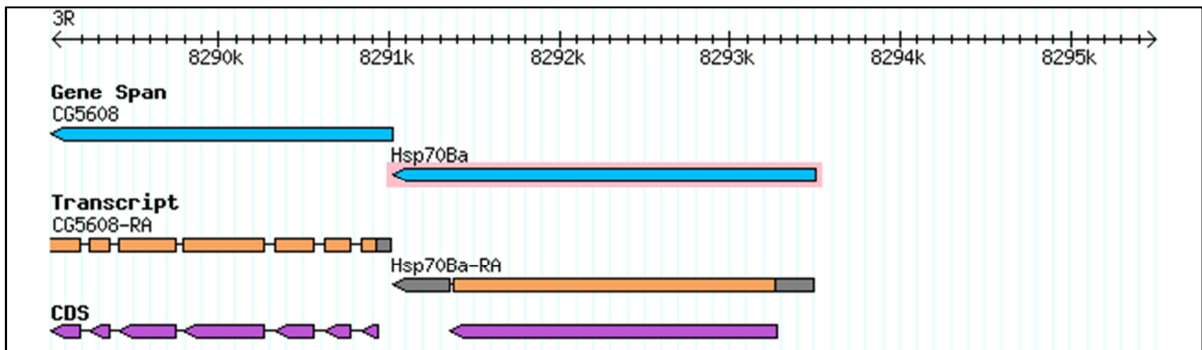
Obr. 7.1: Hsp83



Obr. 7.2: Hsp70Aa



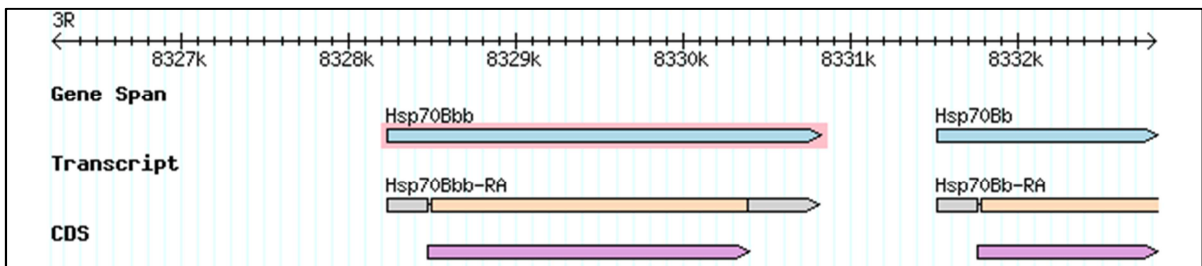
Obr. 7.3: Hsp70Ab



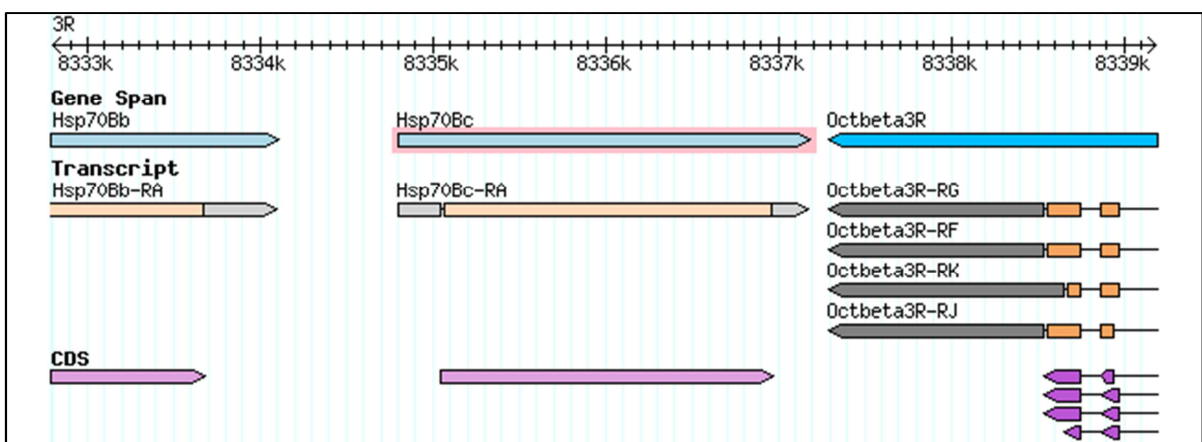
Obr. 7.4: Hsp70Ba



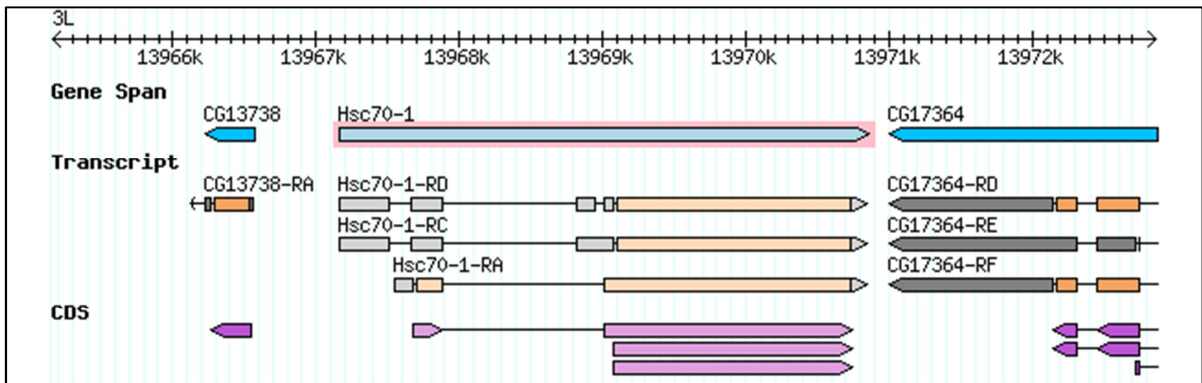
Obr. 7.5: Hsp70Bb



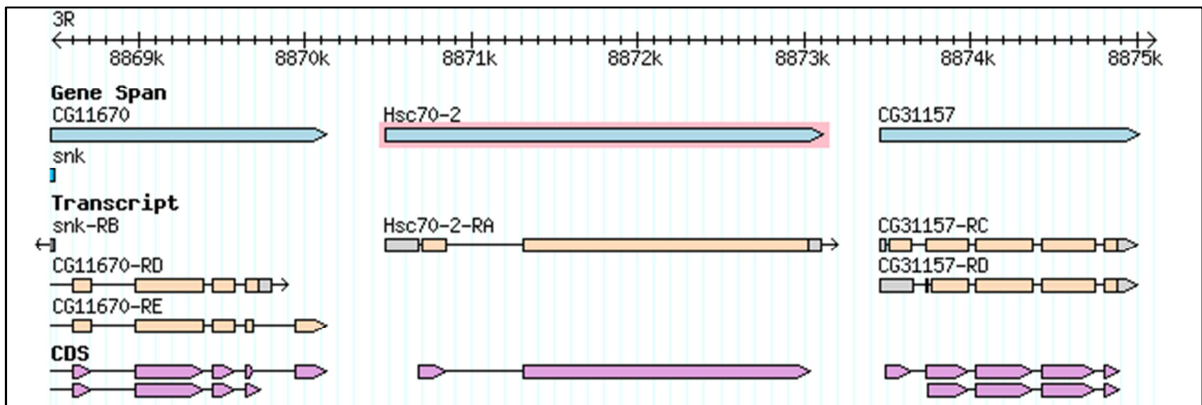
Obr. 7.6: Hsp70Bbb



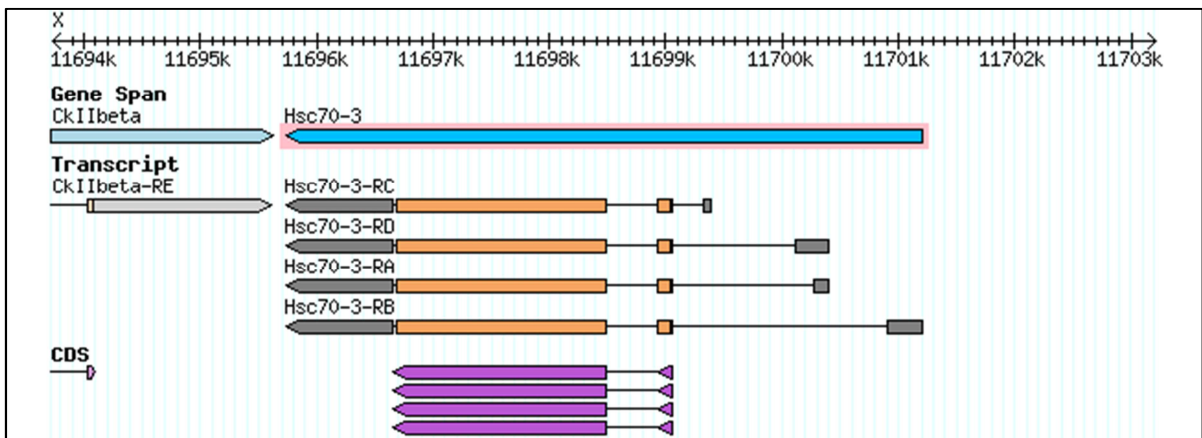
Obr. 7.7: Hsp70Bc



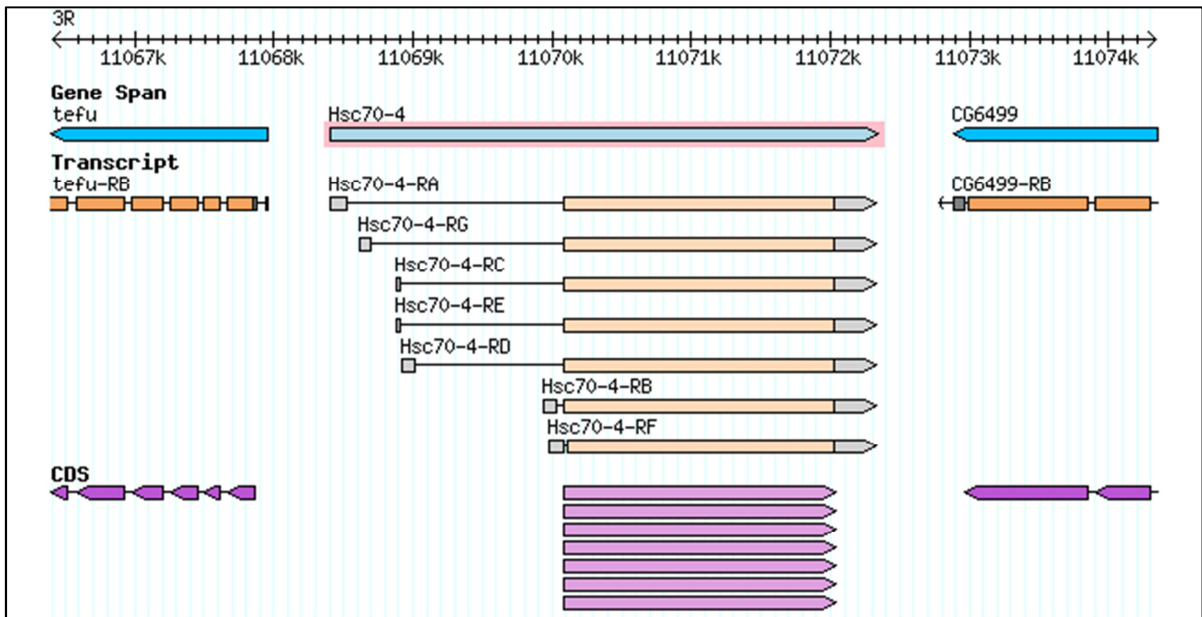
Obr. 7.8: Hsc70-1



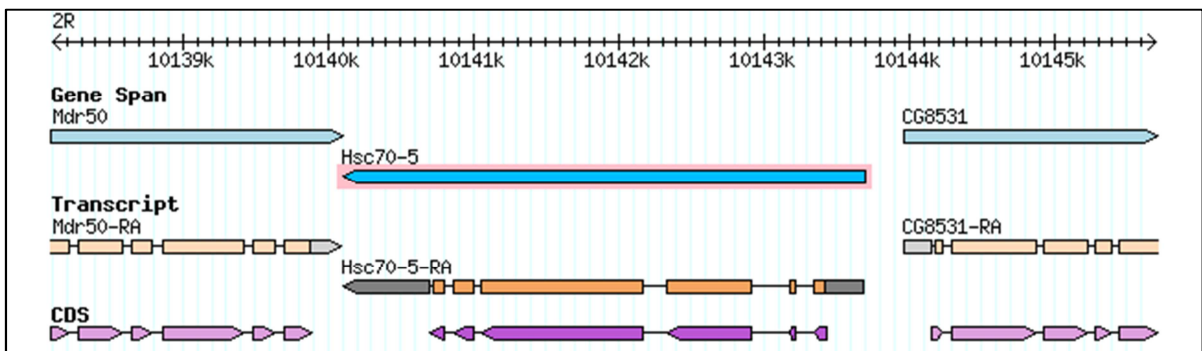
Obr. 7.9: Hsc70-2



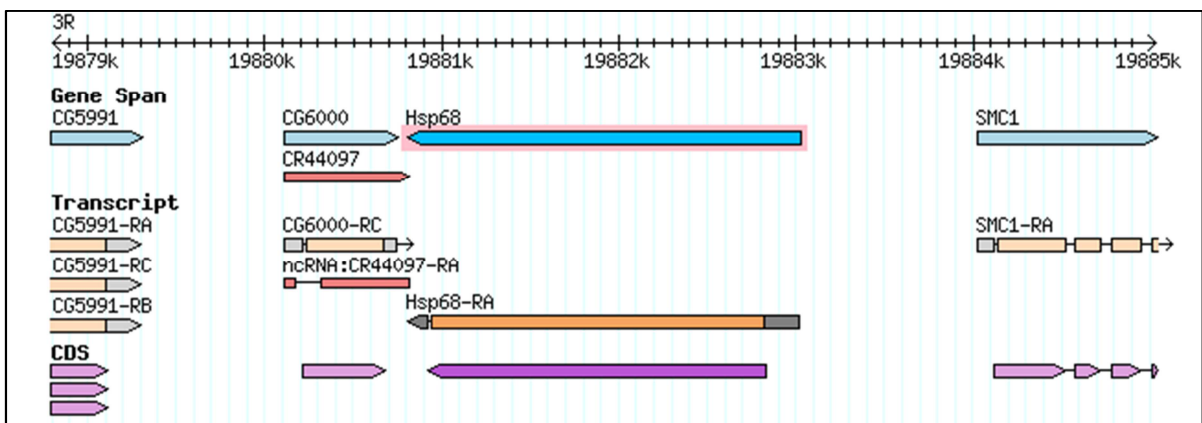
Obr. 7.10: Hsc70-3



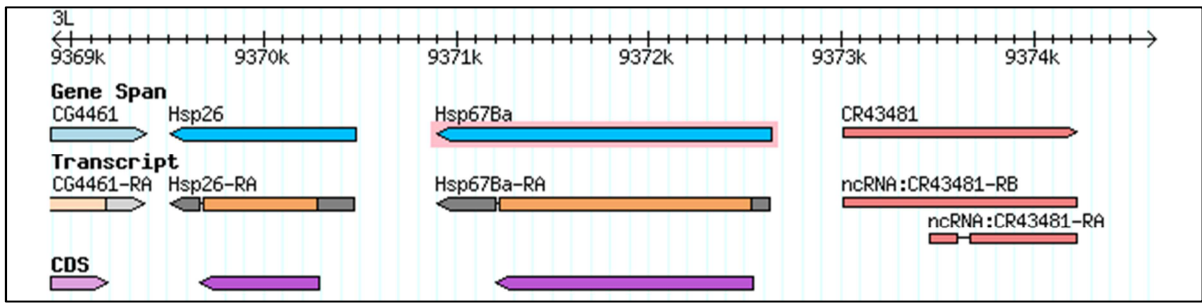
Obr. 7.11: Hsc70-4



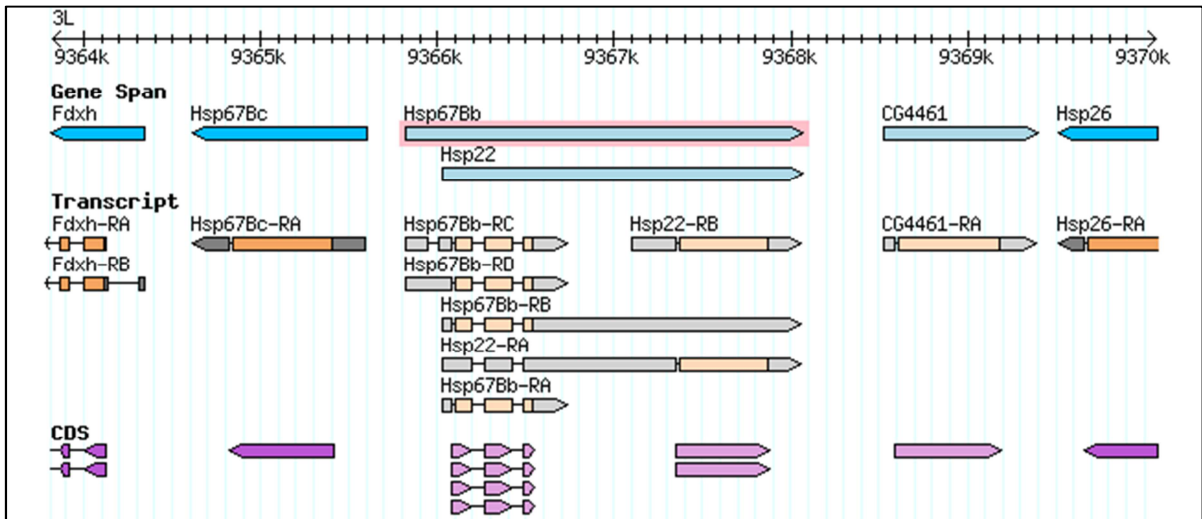
Obr. 7.12: Hsc70-5



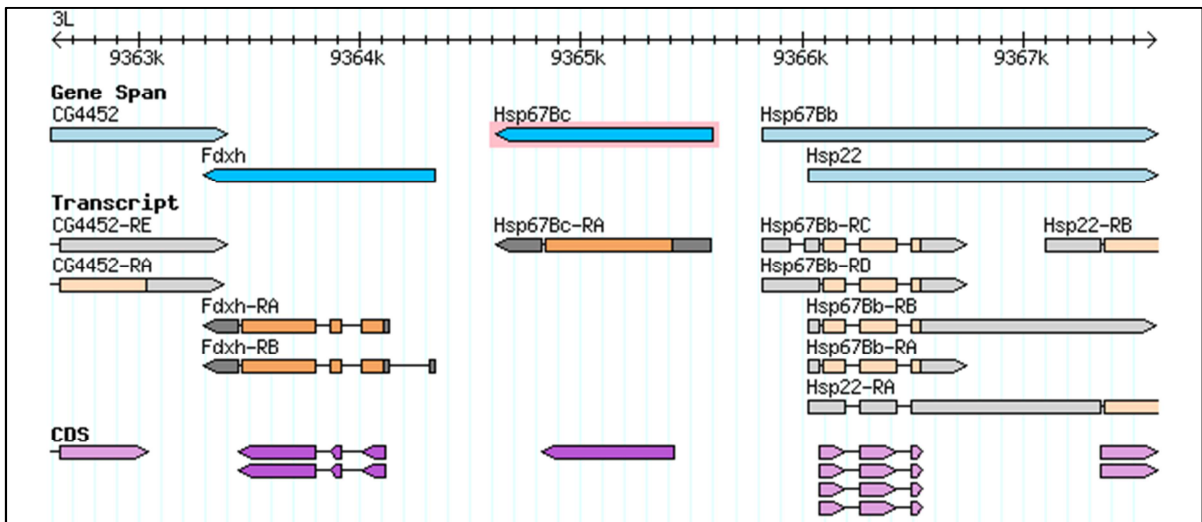
Obr. 7.13: Hsp68



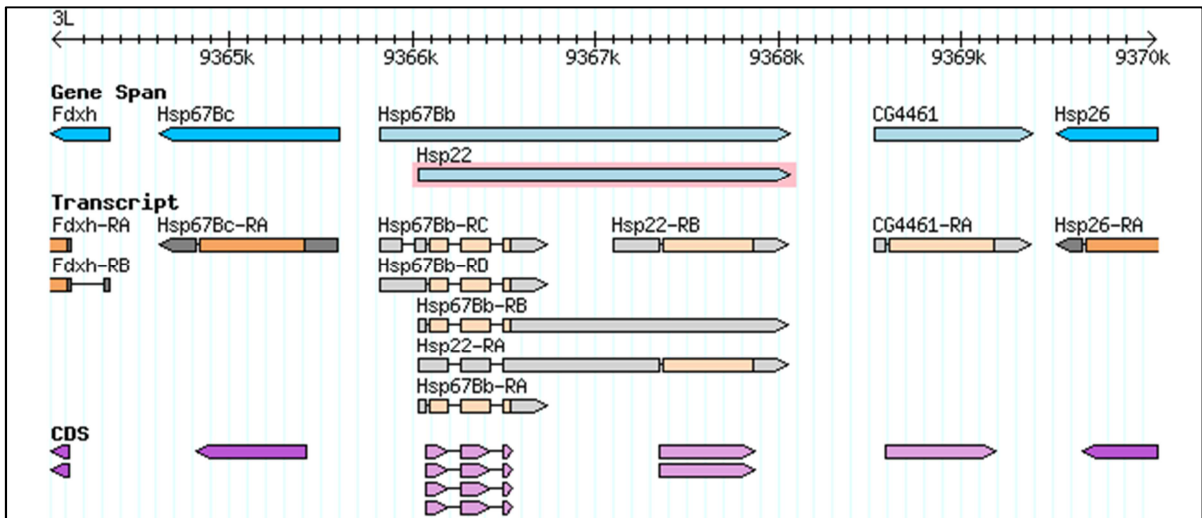
Obr. 7.14: Hsp67Ba



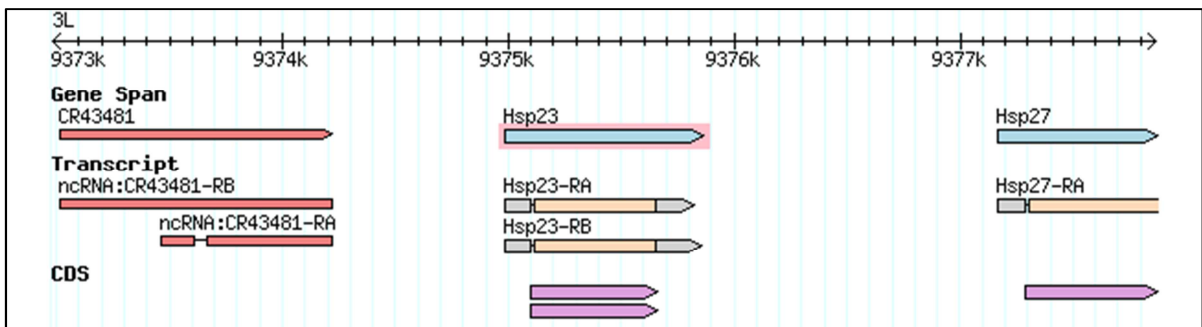
Obr. 7.15: Hsp67Bb



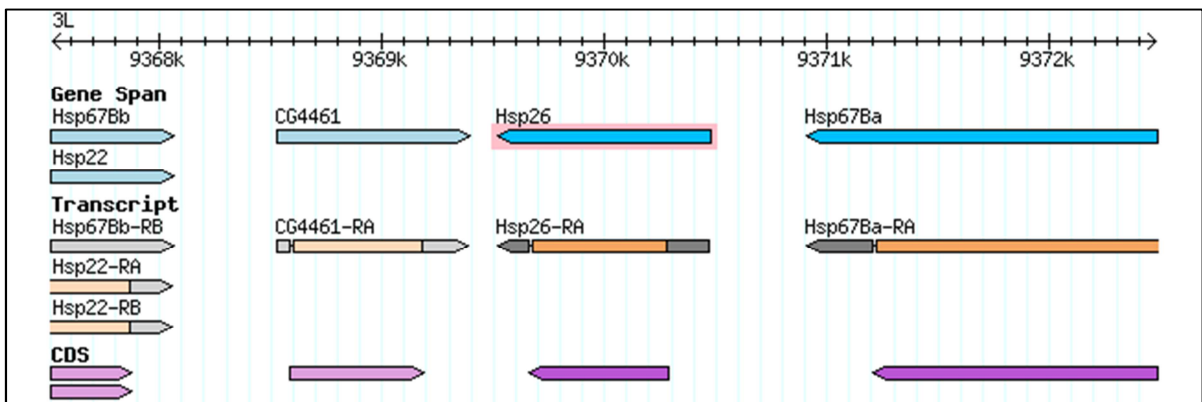
Obr. 7.16: Hsp67Bc



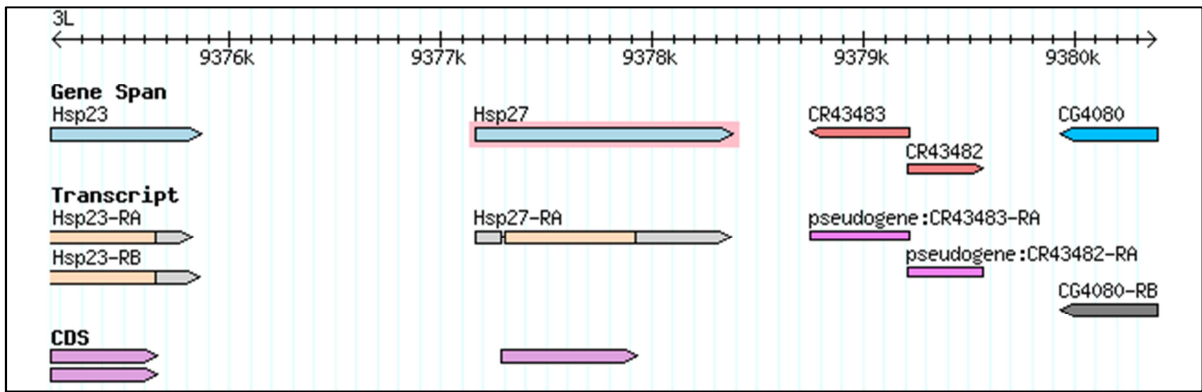
Obr. 7.17: Hsp22



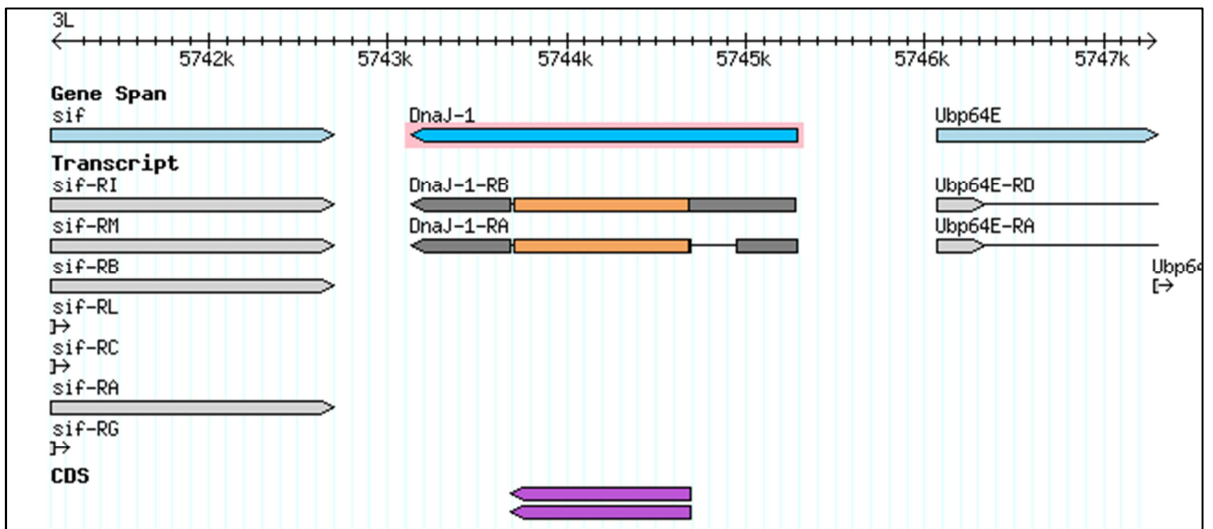
Obr. 7.18: Hsp23



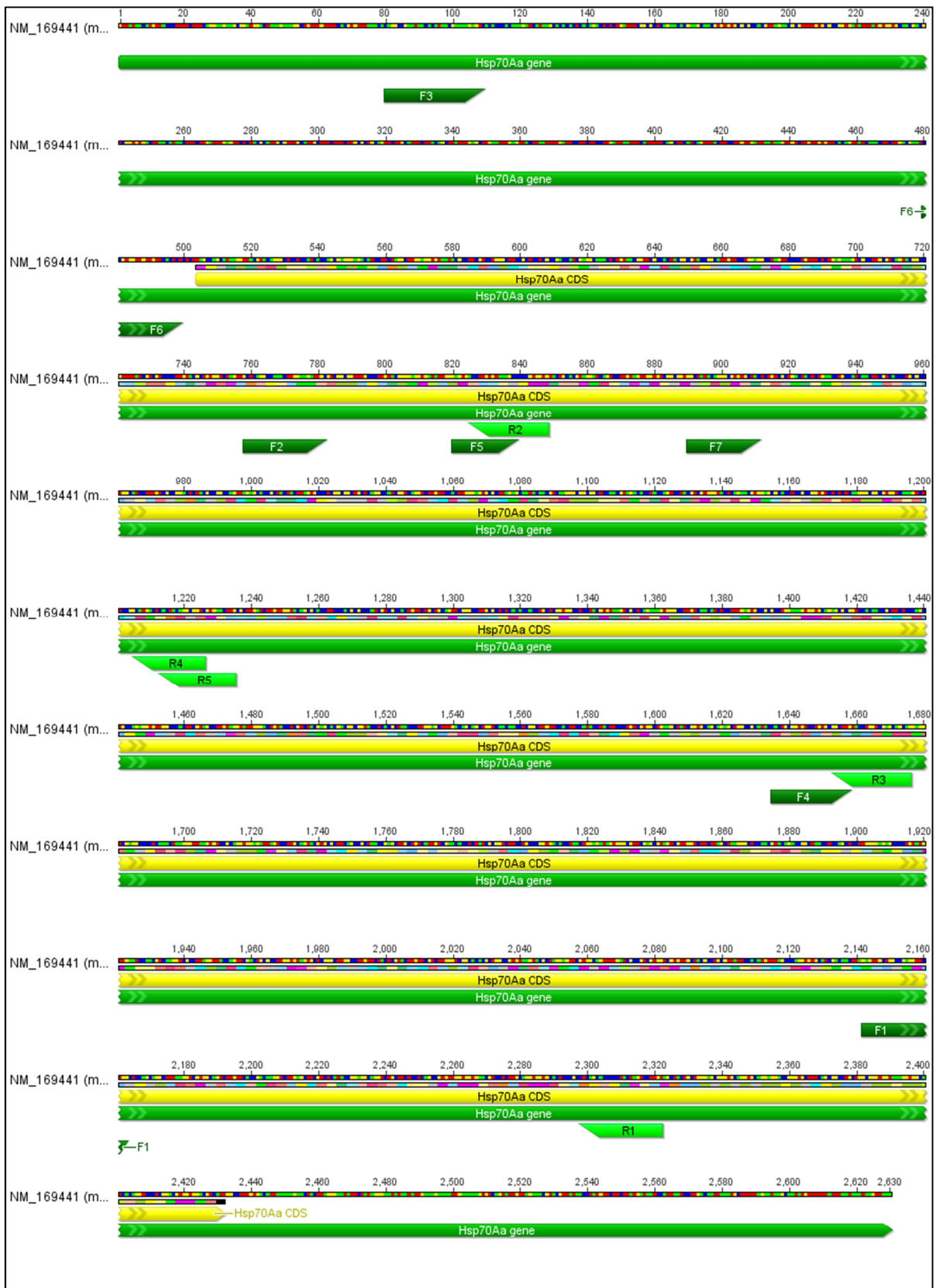
Obr. 7.19: Hsp26



Obr. 7.20: Hsp27



Obr. 7.21: Hsp40 (DnaJ-1)



Obr. 7.22: *hsp70Aa*, rozsah genu, jeho kódující sekvence a umístění primerů