Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Využití bioluminiscenčních, histologických a imunohistochemických technik při studiu lokalizace produktů genové exprese v tkáních hmyzu

Bakalářská práce

Lucie Pauchová

Školitelka: Mgr. Hana Sehadová, Ph.D.

České Budějovice 2019

Pauchová L., (2019): Využití bioluminiscenčních, histologických a imunohistochemických technik při studiu lokalizace produktů genové exprese v tkáních hmyzu. [Using of bioluminiscence, histology and immunohistochemistry in the localization of gene expression products in insect tissues. Bc. Thesis, in Czech] – 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The genes of enzymes catalyzing the bioluminescence reactions are commonly used as reporter genes in molecular biology. These markers are applied especially, in the studies of daily oscillation of gene expression products involved in the circadian clock. Here is reported an improved technique for monitoring the clock gene expression on the single neuron level in the brain of *Drosophila melanogaster* by using the bioluminescence marker.

A part from that another study is focused on localizing a newly identified neuropeptide TEFLa in different developmental stages of firebug *Pyrrhocoris apterus.* This neuropeptide was detected in the brain of larvae and adults, in the posterior region of the midgut of adults and in the gonades of larvae. Beside that, it was found in the region of amnion closure in embryos. Synthesis of TEFLa in the adults' gut is controlled by the circadian rhythms. Identification of TEFLa distribution helps to uncover the function of this neuropeptide.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem 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 systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, …… ……

Lucie Pauchová

Poděkování: *Ráda bych zde poděkovala vedoucí bakalářské práce Mgr. Haně Sehadové, Ph.D. za její cenné rady a čas, který mi věnovala při řešení daných problematik. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat dalším členům Střediska mikroskopie a histologie Entomologického ústavu Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích, jmenovitě paní Jitce Pflegerové a Ing. Romanu Neužilovi za vstřícnost a pomoc při získávání potřebných informací a podkladů.*

……

Lucie Pauchová

Obsah

1. Úvod ... 1
2. Detekce genové exprese pomocí reportérových genů ... 1
   2.1. Fluorescentní proteiny a jejich detekce ... 1
   2.2. Katalyzátory bioluminiscenčních reakcí a detekce jejich aktivity ... 3
   2.3. LuminoView 200 (LV 200) ... 5
   2.4. Výhody využití bioluminiscenčního značení ... 6
   2.5. Funkce genu *period* v mechanismu řídícím cirkadiánní hodiny *D. melanogaster* ... 9
3. Imunohistochemická detekce antigenu ... 11
   3.1. Princip ... 11
   3.2. Příprava protilátky ... 13
   3.3. Využití imunodetekce specifických antigenů ... 15
4. Cíle práce ... 16
5. Projekt 1: Zdokonalení techniky monitorování bioluminiscenčního signálu odrážející expresní aktivitu genů cirkadiánních hodin v mozku *Drosophila melanogaster* ... 17
   5.1. Materiál a metodika ... 17
      5.1.1. Použitá zvířata ... 17
      5.1.2. Příprava tkáně pro monitorování bioluminiscence ... 17
      5.1.3. Monitorování bioluminiscenčního signálu ... 18
   5.2. Výsledky ... 18
      5.2.1. Výběr vhodné linie octomilek ... 18
      5.2.2. Optimalizace přípravy vzorků ... 19
      5.2.3. Optimalizace snímaného obrazu ... 19
      5.2.4. Analýza obrazů ... 23
   5.3. Diskuze ... 27
6. Projekt 2: Imunodetekce proteinu TEFLa v *Pyrrhocoris apterus* ... 29
   6.1. Materiál a metodika ... 29
      6.1.1. Použitá zvířata ... 29
      6.1.2. Zpracování tkáně pro imunodetekci ... 29
      6.1.3. Imunodetekce ... 30
      6.1.4. Fotodokumentace a analýza obrazu ... 30
   6.2. Výsledky ... 31
   6.3. Diskuze ... 38
7. Závěr ... 40
8. Seznam zkratek ... 41

9. Seznam použité literatury 44
10. Příloha 48

1. Úvod

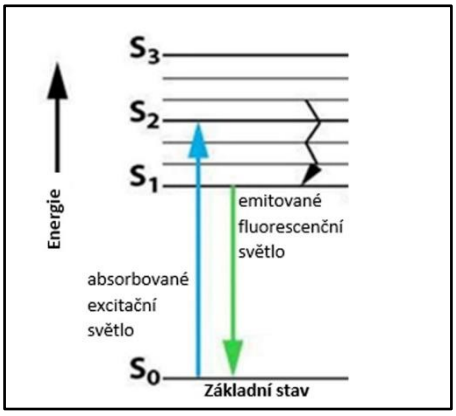
Řízení vývojových a fyziologických procesů v živých organismech vyžaduje zapojení příslušných genů. Aktivitu genu lze hodnotit podle přítomnosti a množství jeho transkriptů tj. messengerové RNA (mRNA) a proteinů. Řada technik běžně využívaných v molekulární biologii a genetice umožňuje stanovit aktivitu genu na úrovni jednotlivých orgánů a tkání. Řadíme sem zejména polymerázovou řetězovou reakci (PCR), která odhalí přítomnost transkriptu hledaného genu pomocí specifických úseků DNA tzv. primerů a dále její variantu, která nám umožňuje stanovit množství příslušné mRNA syntetizované v určitém časovém úseku tzv. real time PCR (RT-PCR). Přítomnost proteinu ve tkáni lze stanovit pomocí Western blottové analýzy, která za pomocí specifických protilátek detekuje hledaný protein na nitrocelulózové membráně, kam byly přeneseny všechny izolované tkáňové proteiny separované elektroforeticky na základě rozdílných molekulárních hmotností a trojrozměrné struktury. Pro lepší pochopení fyziologických pochodů v buňce je však nutná lokalizace genových produktů na buněčné a subbuněčné úrovni.

Metody zaměřené na detailní detekci transkriptů a proteinů přímo ve fixované tkáni označujeme jako *in situ*. Patří sem techniky *in situ* hybridizace a imunohistochemie, kdy první detekuje přítomnost mRNA pomocí specificky značené RNA či DNA sondy a druhá odhalí přítomnost proteinů pomocí značených protilátek. Další možností je připojit ke genu, jehož aktivitu sledujeme, genetickou značku tzv. reportérový gen, jehož genetická informace se přepisuje a překládá spolu se studovaným genem a vzniklý produkt lze posléze zviditelnit.

2. Detekce genové exprese pomocí reportérových genů

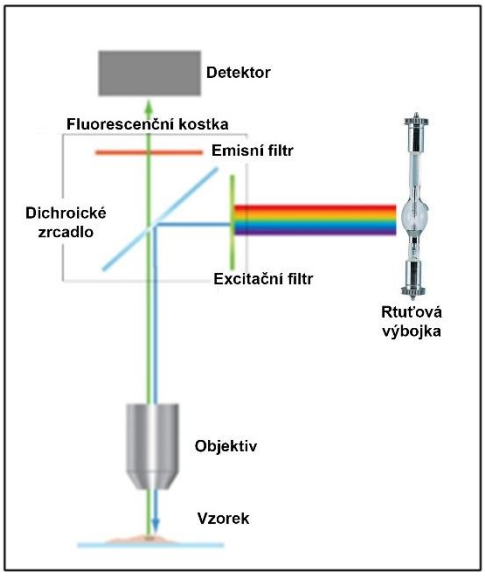
2.1. Fluorescentní proteiny a jejich detekce

Běžně užívanými reportérovými geny jsou geny fluorescentních proteinů. Těmi lze na genetické úrovni označkovat biologické makromolekuly, jako jsou bílkoviny a nukleové kyseliny, a jejich lokalizaci pak sledovat pomocí fluorescenčních mikroskopů. Fluorescentní proteiny patří do skupiny látek, tzv. fluoroforů, jejichž molekuly se absorbcí světla určité vlnové délky dostávají do excitovaného stavu a vzápětí vyzáří emisní světlo o vyšší vlnové délce a nižší energii (Obr. 1). Patří sem zejména zelený fluorescentní protein (GFP, ***G****reen* ***F****luorescent* ***P****rotein*) a jeho mutační varianty s odlišnými spektrálními vlastnostmi.



Obr. 1: Princip vzniku emisního záření. Jablonského diagram znázorňuje přechod mezi elektronově vibračními stavy molekuly. Po absorpci excitačního světla (*modrá šipka*) přechází elektrony ze základního stavu S_0 do excitovaných singletních stavů (S_1, S_2, S_3) a také do tripletních stavů. Část získané energie se ztratí ve formě vibrační relaxace a vnitřní konverze (*černá šipka*). K úplné deexcitaci dochází uvolněním emisního záření (*zelená šipka*), které ustává 10^{-8} s po vypnutí zdroje excitačního světla.

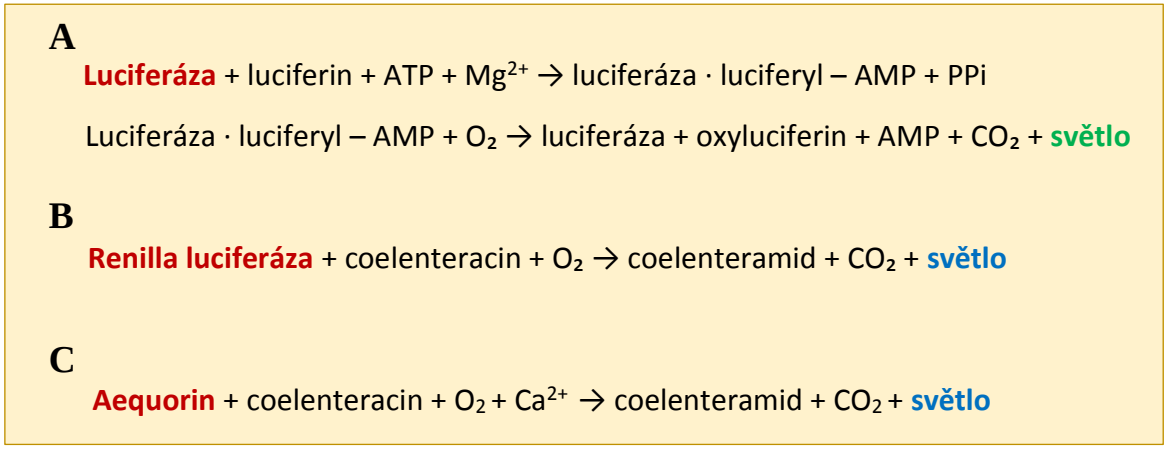
Princip fluorescenčních mikroskopů je založen na přítomnosti specifického excitačního a emisního filtru. Excitační filtr oddělí část světelného spektra nutnou k vyvolání fluorescence daného fluoroforu a emisní filtr selektivně propouští pouze vzorkem emitované světlo dále k detektoru (Obr. 2). Detekční zařízení klasického fluorescenčního mikroskopu snímá kromě signálu z roviny zaostření též signál z rovin nad a pod ní, pak hovoříme o tzv. „widefield fluorescenčních mikroskopech“. Zdrojem jejich osvětlení jsou rtuťové či xenonové výbojky, které kromě viditelného světla emitují i UV záření. Kvalitním zdrojem osvětlení je i LED dioda. Některé moderní verze fluorescenčních mikroskopů zavádí místo excitačních filtrů tzv. polychromát, který umožňuje navolit naprosto přesnou vlnovou délku excitačního světla. Verzí fluorescenčních mikroskopů jsou mikroskopy konfokální. Ty užívají systém konfokálních clonek na cestě excitačního i emisního záření k zajištění bodového osvětlení vzorku a k detekci světla pouze z roviny zaostření. Tak je docíleno vyšší rozlišovací schopnosti mikroskopu. Při plynulém proostřování objektu v ose Z získáme sérii optických řezů, jejichž skládáním lze vytvořit zvětšenou 3D projekci. Dostatečnou intenzitu bodového osvětlení zajišťují silné zdroje světla jako jsou lasery či laserové diody.



Obr. 2: Schéma epifluorescenčního mikroskopu, jehož klíčovou součástí je fluorescenční kostka. Ta obsahuje excitační filtr, emisní filtr a dichroické zrcátko, které odděluje excitační a emisní záření procházející stejnou optickou drahou. Dichroické zrcátko odráží světlo kratších vlnových délek, tj. emisi propouští na emisní filtr.

2.2. Katalyzátory bioluminiscenčních reakcí a detekce jejich aktivity

Reportérovými geny mohou být i geny katalyzátorů chemických reakcí, které po dodání příslušného substrátu zviditelní svoji pozici. Množství vzniklého produktu pak odpovídá míře syntetické aktivity studovaného genu. Jedná se například o enzymy katalyzující bioluminiscenční reakce. Bioluminiscence je emise světla živými organismy, která je výsledkem specifických biochemických reakcí. Vlivem těchto reakcí jsou atomy substrátu uvedeny do excitovaného stavu a během návratu na jejich původní hladinu je vyzářena luminiscence. Mnoho organismů využívá luminiscenci při běžných fyziologických projevech. Například samečci světlušek *Photinus pyralis* čeledi Lampyridae světélkují během námluv, kdy zářením o určité vlnové délce k sobě lákají samičky svého druhu. Dalšími světélkujícími organismy jsou některé druhy bakterií, hub a hlubokomořských organismů. Patří sem například kolonie polypů *Renilla reniformis,* medúza *Aequorea victoria,* bakterie *Photorhabdus luminescens* nebo houby *Omphalotus nidiformis, Mycena chlorophos.*



Obr. 3: Příklady bioluminiscenčních reakcí u některých modelových organismů. Biochemická reakce u **(A)** světlušky *P. pyralis.*, **(B)** polypa *R. reniformis.*, **(C)** medúzy *A.victoria.*

Enzymy i jimi katalyzované biochemické reakce se u jednotlivých organismů liší. Nejlépe je mechanismus bioluminiscence prostudován u světlušky *P. pyralis,* kde se uplatňuje enzym luciferáza. Jedná se o monomer, jehož molekulová hmotnost je 61 kDa. Za přítomnosti kyslíku katalyzuje přeměnu luciferinu na vysoce excitovaný oxyluciferin za vzniku CO_2 a současné spotřeby ATP (Obr. 3). Při deexcitaci oxyluciferinu dochází k emisi světelného záření o vlnové délce 560 nm, což odpovídá zelené spektrální barvě (De Wet a kol. 1987). Luciferáza polypa *R. reniformis* je rovněž monomerická a její molekulová hmotnost je 36 kDa. Katalyzuje oxidativní dekarboxylaci substrátu coelenteracinu za přítomnosti rozpuštěného kyslíku, při které vzniká oxyluciferin a oxid uhličitý a současně je vyzařováno modré světlo,

jehož spektrální maximum je 480 nm (Obr. 3, Lorenz a kol. 1991). Dalším modelovým organismem je medúza *A. victoria*, jejímž katalyzátorem bioluminiscenční reakce je aequorin. Aequorin se naváže na coelenteracin a vytvoří tak za přítomnosti kyslíku komplex enzym · substrát. K vlastní oxidaci coelenteracinu dochází až po navázání vápníkových iontů na aequorin. Tím je uvolněna energie ve formě modrého záření. Svou afinitou k vápníkovým iontům je aequorin dobrým senzorem pro měření koncentrací intracelulárních vápníkových iontů (Brini a kol. 1995).

Schopnosti bioluminiscentních enzymů regulovat množství emitovaného světla využívá molekulární biologie ke studiu aktivity genů. Gen pro luciferázu či aequorin je připojen ke studovanému genu a spolu s jeho proteinem je syntetizován i daný enzym. Za přítomnosti vhodného substrátu (luciferinu či coelenteracinu) se množství nasyntetizovaného produktu odrazí v intenzitě emitované luminiscence. Zatímco kvantum pozorované emise lze měřit tzv. luminometry (Evans a kol. 2014), k určení přesné polohy buněk emitujících světlo musíme vzorek podrobit mikroskopické analýze.

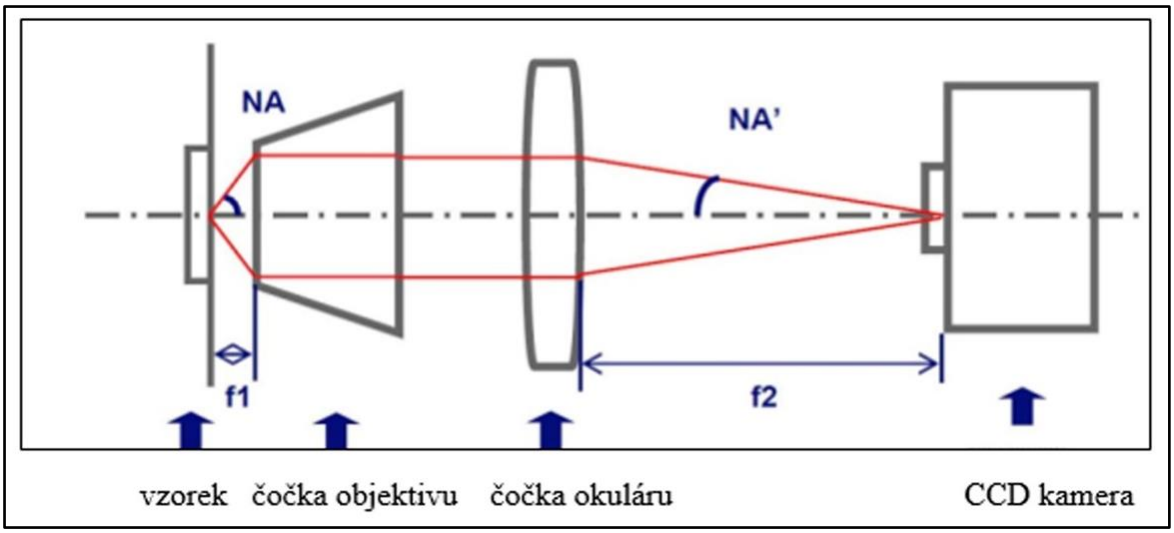
Silnější signály lze detekovat pomocí speciálně upraveného světelného mikroskopu, který je opatřen temnou komorou a vysoce senzitivní CCD (**C**harge-**C**oupled **D**evice) kamerou (Hattori a kol. 2016). Emitované fotony zde musí urazit dlouhou cestu přes několik zrcadel, než se dostanou na čip kamery, což vede ke značnému snížení intenzity signálu. Tuto nevýhodu vyřešila firma Olympus konstrukcí mikroskopu vhodného pro snímání i méně intenzivní bioluminiscence. Mikroskop LuminoView 200 (LV 200) byl zkonstruován s cílem pozorovat bioluminiscenci i na úrovni jediné buňky. Na jeho vývoji se podílel tým japonských vývojářů v čele se Sashiko Karaki, Ph.D., která prototyp mikroskopického systému nazvala pracovně Pluto. Obtížnost obrazového záznamu velmi slabého bioluminiscenčního signálu tím přirovnává k pozorování tak vzdálené planetky, jakou je právě Pluto.

www.olympuslife-science.com

Obr. 4: Luminiscenční mikroskop LV 200.

2.3. LuminoView 200 (LV 200)

Vysokou citlivost mikroskopu zajišťuje maximální zkrácení cesty emisního světla z objektu ke kameře (Obr. 5). Světlo prochází jen čočkou objektivu a speciální čočkou okuláru, která má vysokou numerickou aperturu a zajišťuje tak vyšší citlivost systému oproti optice standartního mikroskopu. Mikroskop neobsahuje žádné filtry, zrcátka nebo další čočky, které by zvyšovaly absorbci, a tak co nejvíce vzorkem vyzářeného světla dopadá do detekčního zařízení. LuminoView 200 produkuje mnohonásobně vyšší signální výstupy než tradiční systémy, proto je zde možné využívat jako detektor běžnou CCD nebo EM-CCD (**E**lectron **M**ultiplying - CDD) kameru místo fotonásobičů. Tyto kamery se vyznačují vysokou citlivostí a rozlišením až 1024 x 1024 pixelů s nízkým čtecím šumem. Kamery jsou termoelektricky chlazené, takže jsou ideální i pro dlouhodobé snímání signálů.



Obr. 5: Optická dráha snímané bioluminiscence ze vzorku do detekčního zařízení (CCD kamera). *f1* ohnisková vzdálenost objektivu, *f2* ohnisková vzdálenost okuláru, *NA* numerická apertura objektivu, *NA´* numerická apertura okuláru (www.olympus-lifescience.com).

Optika je uložena v izolovaném boxu, který slouží jako ochrana před vnějším osvětlením. Tento box však neslouží pouze jako světelná clona, ale umožňuje vytvoření ideálních životních podmínek pozorovaných organismů, popř. jejich tkání. Uvnitř boxu je inkubační komůrka (Obr. 6), kde je možné regulovat teplotu, vlhkost vzduchu a cirkulaci plynů (O_2, CO_2). Lze samostatně nastavit teplotu inkubační komory, jejího krytu, mikroskopického stolku i objektivu. Možnost udržení stálé teploty v oblasti objektivu zajišťuje konstantní citlivost objektivu i v jinak tepelně proměnlivém prostředí. Možnost

inkubace vzorků přímo v mikroskopu nám umožňuje průběžné monitorování vyzařované emise v průběhu dnů až týdnů.

Mikroskop je rovněž vybaven zdrojem světla (LED dioda) a fázovým kontrastem, což umožňuje zaostření na studovaný objekt a případné pořízení jeho snímku v procházejícím světle. Dále obsahuje integrované excitační a emisní filtrové kotouče ke snímání dvoubarevné luminiscence nebo fluorescence. Lze tedy vytvořit snímek souběžně zachycující luminiscenční signál, fluorescenční signál a obraz objektu v procházejícím světle. Takové kombinování je velice účinné pro lokalizaci a kolokalizaci proteinů.

Obr. 6: LV 200. Záběr na vnitřní vybavení a inkubační komůrku.

2.4. Výhody využití bioluminiscenčního značení

Hlavní výhodou vizualizace bioluminiscenčního signálu je produkce emitovaného světla bez působení externího světelného zdroje. Biochemická reakce produkující světlo, ale vyžaduje funkční metabolismus, proto lze signál monitorovat pouze v živých systémech. Mikroskop LV 200 lze využít jak k vizualizaci bioluminiscenčního signálu, tak k jeho kvantitativní analýze na úrovni jednotlivých buněk. Měření lze provádět jednorázově či dlouhodobě. Je tedy výhodné zejména k monitorování světelně senzitivního živého materiálu, na který má dlouhodobě působící světlo toxický efekt a tam, kde silná autofluorescence tkání znemožňuje použití excitačního světla při fluorescenčním značení. Luminiscenční signál je sice slabý, ale vzhledem k velkému poměru signálu k pozadí bez vybělování a fototoxických účinků, je tato metoda citlivější než fluorescenční značení.

Bioluminiscenční značení našlo široké uplatnění v mnoha oblastech molekulárně genetického výzkumu: (1) Rychlá tvorba a krátký poločas rozpadu bioluminiscentních enzymů z nich dělá ideální reportérové geny a umožňuje získat informaci o přesné poloze značeného proteinu a kvantifikovat jeho množství a oscilace v jeho syntéze na základě měnící se intenzity signálu. (2) Jelikož enzym luciferáza se aktivuje pouze za přítomnosti ATP, intenzita emitovaného světla odráží koncentraci ATP ve vzorku (Marciano a kol. 2017). Lze

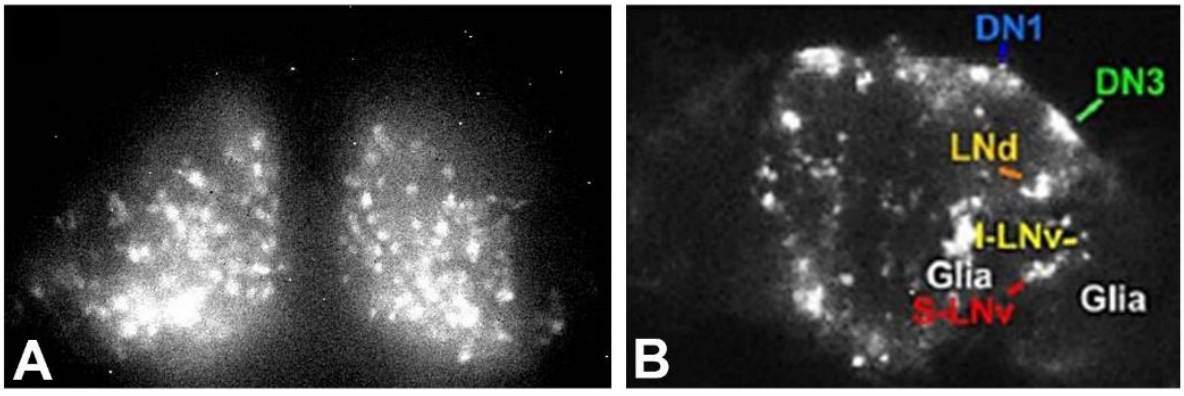
vytvořit kalibrační křivku známých koncentrací ATP vynesené oproti naměřené intenzitě luminiscence, podle které se mohou odečítat vzorky o neznámé koncentraci ATP. (3) Komponenty bioluminiscenční reakce *A. victoria*, kde je frakční poměr spotřeby aequorinu a s ním spojená intenzita emitovaného světla přímo úměrná množství přítomných vápenatých iontů, jsou využívány pro indikaci koncentrace vápenatých iontů ve vzorku (Brinini a kol. 1995).

Luminiscenční signál je sice slabý, ale vzhledem k velkému poměru signálu k pozadí bez vybělování a fototoxických účinků je tato metoda citlivější než fluorescenční značení.

V současné době se bioluminiscenční zobrazovací technika rozvíjí a nachází uplatnění i v medicínském výzkumu. Jelikož se jedná o šetrnou nefototoxickou metodu, dochází k jejímu neustálému vyvíjení a zdokonalování. Možnost zaznamenání bioluminiscenčního signálu vyzařovaného živými organismy v reálném čase umožňuje např. neinvazivní sledování anatomického umístění a růstu infekčních mikroorganismů, jako je například měření hustoty osídlení patogenních bakterií na zubních krčcích (Avci a kol. 2018). Dalším využitím je sledování běžných fyziologických procesů modelových organismů. Můžeme se setkat se studií, která monitoruje cyklus vlasového folikulu zviditelněného fúzí luciferázy s proteoglykanem nacházejícím se v jeho plazmatické membráně (Tamura a kol. 2018). Ke studiu šíření houbové infekce u myší byl použit kmen patogenní houby *Aspergillus fumigatus*, ve kterém je gen pro glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenázy fúzován s genem *Fluc* (Firefly luciferase - světluškí luciferáza). Myši byly tímto kmenem intranasálně infikovány a po intraperitoneální aplikaci D-luciferinu byl bioluminiscenční vizualizací sledován rozvoj a průběh infekce (Brock a kol. 2008). Poslední dobou se s bioluminiscenční detekcí setkáváme i v oblastech vědy pro životní prostředí a bezpečnost potravin. Například Karsi a kolektiv vyvinuli kmeny bakterií rodu *Salmonella*, které obsahovaly plazmid pAKlux1 a *lux* operon. Takto označenými bakteriemi různých kmenů zkoumali jejich přilnavost ke kuřecí kůži a následně hodnotili účinnost různých promývacích technik pro jejich nejdokonalejší odstraňování (Karsi a kol. 2008). Dále pak Maoz a kolektiv vygenerovali bioluminiscenční bakterii *Yersinia enterocolitica* s kompletním *lux* operonem (luxCDABE), který umožnil přímou bioluminiscenční detekci růstu *Y. enterocolitica* u sýrů skladovaných při 10 ° C (Maoz a kol. 2002). Luciferáza jako reportérový gen našla široké uplatnění zejména při studiu mechanismu cirkadiánních hodin. Díky jejímu připojení ke genům zahrnutým v řízení těchto hodin, lze snadno dlouhodobě monitorovat denní oscilace v jejich expresi. Transgen obsahující gen pro luciferázu se běžně využívá pro monitorování cirkadiánní aktivity genů v centrálním oscilátoru savců, který se nachází v suprachiasmatickém jádře (SCN) hypothalamu

a zahrnuje desítky neuronů. Pomocí LV 200 je snímána bioluminiscence v řezech SCN o tloušťce 20-30 μm. Vzhledem k velikosti savčích buněk je možné sledovat i lokalizaci genových produktů na úrovni jedné buňky zejména pak translokaci jejich proteinů z cytoplazmy do jádra, popřípadě jejich přítomnost v nervových drahách (Obr. 7A). Jiná je situace v mozku hmyzího modelového organismu octomilky obecné (*Drosophila melanogaster)*, kde je centrální oscilátor biologických hodin tvořen skupinami cca 150 neuronů, které se nachází v rozdílné dorsolaterální a anterioposteriorní pozici. Toto rozmístění vyžaduje použití objektivů s dlouhou pracovní vzdáleností a menším rozlišením, které snižuje možnost identifikace jednotlivých neuronů v rámci každé skupiny. Ve studiích zachycujících luminiscenční signál v mozku octomilky byla monitorována oscilace proteinu Period, jednoho z klíčových proteinů centrálního oscilátoru, na úrovni jednotlivých skupin neuronů bez možnosti identifikace jednotlivých buněk (Obr. 7B, Roberts a kol. 2015, Sehadová a kol. 2009).

Cílem předkládané práce bylo vyvinout techniku vhodnou k monitorování bioluminiscence v mozku hmyzu jako je *D. melanogaster*, kterou lze dosáhnout vysokého rozlišení, tj. možnosti snímat bioluminiscenční signál na úrovni jedné buňky. To vyžaduje použití objektivu s větším zvětšením, vysokou numerickou aperturou a přesné zaostření na jednotlivé skupiny neuronů, aby nedocházelo k rozptýlení bioluminiscenčního signálu při průchodu tkání.



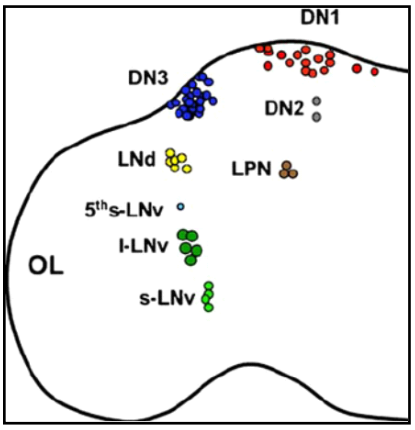
Obr. 7: (A) Myší SCN, ve kterém jsou buňky, v nichž je detekován hodinový gen *per2*, který je fúzovaný s luciferázou. Obrázek je pořízený mikroskopem LV 200 (www.olympuslife-science.com). **(B)** Celý mozek octomilky s *per* genem značeným luciferázou. Snímek je zachycen invertovaným světelným mikroskopem se CCD kamerou (Roberts a kol. 2015).

2.5. Funkce genu *period* v mechanismu řídícím cirkadiánní hodiny *D. melanogaster*

Většina organismů je řízena vnitřními biologickými hodinami, které jsou ovlivňovány rytmickými změnami vnějšího prostředí. Tyto pravidelné změny vyvolávají biorytmy v chování, metabolismu i genové expresi. Nejprostudovanějšími biorytmy jsou rytmy cirkadiánní, jejichž vnitřní perioda má délku 24 hodin a je ovlivněna zejména pravidelným střídáním dne a noci. Cirkadiánní rytmy jsou endogenní a to znamená, že přetrvávají i v neperiodických podmínkách, například v podmínkách konstantní tmy. Synchronizaci rytmů k prostředí zajišťují faktory vnějšího prostředí tzv. Zeitgebery, kam patří pravidelné střídání světla, tepla, atmosférických podmínek a stravování. Správný chod cirkadiánních rytmů zajišťují tři navzájem propojené úseky: (1) vstupní dráha, sloužící jako detektor vnějších vlivů, (2) centrální oscilátor, který vyhodnocuje signál přivedený vstupní drahou a rytmicky upravuje expresi hodinových genů, které pak následně regulují expresi genů na (3) výstupní signální dráze oscilátoru. Kromě centrálního oscilátoru se v těle nachází celá řada periferních oscilátorů. Nedávné studie u *D. melanogaster* prokazují závislost pouze některých periferních oscilátorů na oscilátoru centrálním (Pilorz a kol. 2018).

Molekulárním mechanismem řídícím chod cirkadiánních hodin jsou tři navzájem propojené zpětnovazebné genové smyčky. Geny zapojeny do těchto smyček označujeme jako hodinové geny. Patří k nim geny: *per (period), tim (timeless), clk (clock), cyc (cycle), sgg (shaggy), doubletime (dbt)* a *cry (cryptochrome;* Konopka, Benzer 1971). Součástí zpětnovazebné smyčky *per/tim* je gen *per* ovlivňující pravidelné denní změny v pohybové aktivitě octomilky. Jeho exprese je regulována transkripčními faktory CLK a CYC, které nasedají na regulační oblasti promotorů genů *per* a *tim*, tzv. E-boxy a tím stimulují jejich transkripci. K této aktivaci dochází v průběhu světelné fáze dne. Zatímco *per* a *tim* mRNA se postupně hromadí v cytoplazmě, PER a TIM proteiny se akumulují až během temné fáze dne, kdy vznikající protein TIM již není degradován světlem, váže se na PER a společně s kinázou DBT vytvoří stabilní komplex. Akumulace vrcholí v druhé polovině noci, kdy PER-TIM-DBT komplex po fosforylaci proteinu TIM vstupuje zpět do jádra a naváže se na CLK. Fosforylace CLK způsobuje odpadnutí heterodiméru CLK-CYC z regulační oblasti promotoru genů *per* a *tim*, čímž je zastavena transkripce (Zeng a kol. 1996). TIM je na denním světle degradován navázáním flavoproteinu CRY, který je rovněž vazbou destabilizován. Také dochází k fosforylaci a následné degradaci proteinů PER a CLK. Zatímco hladina PER klesá, CLK je opětovně syntetizován a jeho hladina zůstává konstantní i během dne.

Centrální oscilátor cirkadiánních hodin se nachází v mozku octomilky a sestává se přibližně ze 150 neuronů (Mendoza-Viveros a kol. 2017). Neurony můžeme podle umístění rozdělit na dorzální, dorsolaterální a ventrolaterální. V jedné mozkové hemisféře se nachází čtyři malé ventrolaterální neurony (s-LNv) a pátý ventrolaterální neuron (5^{th} s-LNv), pět velkých ventrolaterálních neuronů (l-LNv) a šest dorzolaterálních neuronů (LNd), dva dorzální neurony (DN2) a dvě početnější skupiny dorzálních neuronů (DN1, DN3), kterých je v každé hemisféře asi 50 a tři laterálně posteriorní neurony (LPN; Obr. 8, Nitabach, Taghert 2008).



Obr. 8: Schematické znázornění pozice neuronů cirkadiánních hodin v jedné polovině mozku octomilky *D. melanogaster*. *DN1, DN2, DN3* dorzální neurony (*modře, červeně, šedě*), *l-LNv* velké ventrolaterální neurony *(tmavě zeleně*), *LNd* dorzolaterální neurony (*žlutě*), *LPN* laterálně posteriorní neurony (*hnědě*), *s-LNv* malé ventrolaterální neurony *(světle zeleně*), *5^{th} s-LNv* pátý malý ventrolaterální neuron (*světle zeleně*), *OL* optický lalok, (Dubruille, Emery 2008).

Jednotlivé skupiny neuronů, popřípadě jejich podskupiny se liší svou funkcí: s-LNv jsou svou aktivitou důležité v konstantní tmě (Grima 2004), l-LNv jsou zodpovědné za dodání informace o světle do centrálního oscilátoru (Helfrich-Föster a kol. 2002). Dorzolaterální neurony společně s pátým malým ventrolaterálním neuronem se podílejí na řízení večerní aktivity v chování octomilek (Grima 2004). Dorzální neurony a LPN, zpracovávají informaci o teplotních cyklech v prostředí (Yoshi a kol. 2005).

Hodinové neurony spolu komunikují prostřednictvím neurotransmiterů. Jedním z nich je PDF (Pigment disperzní faktor) syntetizovaný všemi ventrolaterálními neurony, kromě 5-s-LNv. Hraje zásadní roli v regulaci rytmické denní pohybové aktivity (Kaneko a kol. 1997).

3. Imunohistochemická detekce antigenu

3.1. Princip

Další technika, kterou lze mapovat výskyt příslušných proteinů ve tkáních, je imunohistochemie. Její princip spočívá ve fixaci tkáňových antigenů v místě jejich výskytu a v následné detekci těchto antigenů pomocí specifické protilátky. Na rozdíl od lokalizace genetických markerů, které lze sledovat *in vivo* tj. v živých tkáních, imunohistochemické šetření provádíme ve tkáních fixovaných. Ať již zkoumáme jednotlivé orgány, tkáně, popřípadě jednotlivé buňky, fixací zajistíme, aby nepodléhaly autolýze neboli samonatrávení. K tomu dochází v důsledku ztráty životaschopnosti tkáně po jejím vytržení z organismu, kdy dochází zejména k deprivaci zásobení kyslíkem a k přerušení inervace. Existují různé způsoby fixace. Fyzikální fixace užívající extrémně vysokých a nízkých teplot se v imunohistochemii uplatňuje jen zřídka. Naproti tomu je široce užívána fixace chemickými činidly. Nejdůležitějšími vlastnostmi chemických fixačních činidel je rychlost průniku do tkáně a dále schopnost činidla zachovat nativní strukturu buněk a tkání.

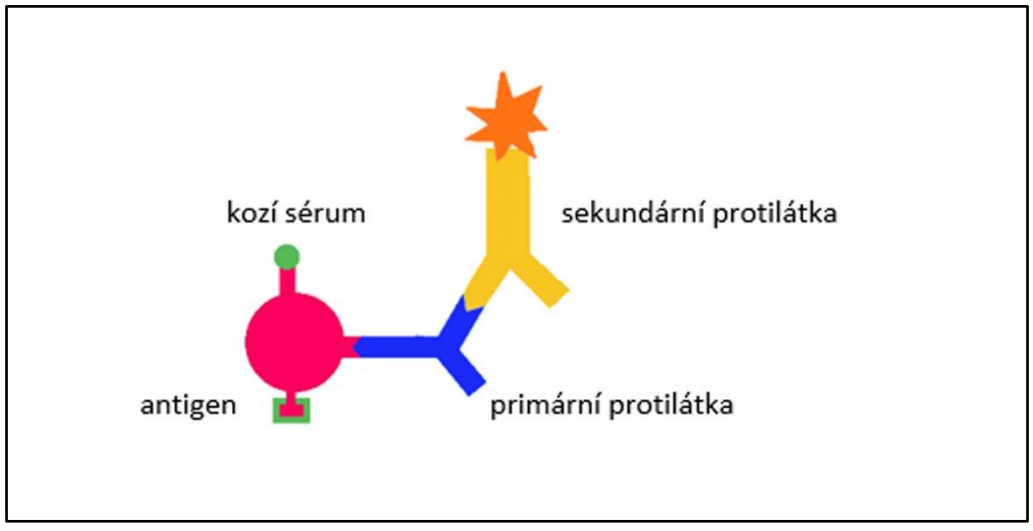
Chemická fixační činidla můžeme rozdělit do dvou základních skupin: (1) koagulující fixáže, jejichž primárním mechanismem je denaturace bílkovin a (2) nekoagulující fixáže, které místo koagulace spojují bílkoviny chemickou vazbou. Rozpustnost bílkoviny určuje uspořádání hydrofilních oblastí vně a hydrofóbních částí řetězců uvnitř jejich terciální struktury. Koagulační činidla ovlivňují rozpustnost bílkovin tak, že mění jejich sekundární a terciální strukturu. Odhalením hydrofobních oblastí bílkoviny zajištují její interakci s dalšími proteiny a stabilizují tak její strukturu. Míru srážení bílkovin udává síla koagulantu a koncentrace bílkoviny (https://www.lf3.cuni.cz/3LF-401.html). Mezi koagulující fixační činidla patří: methanol, ethanol, aceton, kyselina pikrová a kyselina dusičná. Nekoagulujícími fixážemi je oxid osmičelý a aldehydy (akrolein, glutaraldehyd, formaldehyd).

Fixované tkáně buď dále zpracováváme celé, pak hovoříme o tzv. totálních preparátech, nebo z nich zhotovíme kryo či paraplastové řezy jejich pokrájením na kryostatu či mikrotomu. Zhotovení paraplastových řezů vyžaduje zalití tkáně do parafínu. Parafín je nemísitelný s vodou, proto musí být tkáň nejprve odvodněna vzestupnou alkoholovou řadou a prosycena rozpouštědlem parafínu jako je např. benzen, toluen, xylen, které tkáň zároveň projasní. Poté je tkáň zalita parafínem rozehřátým na cca 60 °C. Při této teplotě je parafín tekutý a zároveň tkáň netrpí tepelným poškozením. Po průniku parafínu do vzorku se parafín nechá polymerizovat při pokojové teplotě a vzorek jím zpevněný může být nakrájen na řezy tenké

až 1 mm. Před vlastní imunohistochemickou detekcí tkáňového antigenu je nutno zhotovené řezy deparafinovat a opětovně zavodnit.

Hledaný tkáňový antigen můžeme detekovat jak v totálních preparátech, tak na tkáňových řezech pomocí specifické protilátky, tzv. primární protilátky, namířené proti jeho povrchovým strukturám, tzv. epitopům. Těsně před aplikací primární protilátky tkáň ošetříme tzv. normálním sérem, tj. sérem z jiného druhu zvířete, než ze kterého je získána primární protilátka. Normální sérum blokuje vazebná místa všech tkáňových proteinů a brání tak nespecifické vazbě primární protilátky k těmto proteinům. Tím je zvýšena pravděpodobnost vazby primární protilátky pouze na hledaný antigen tak, že blokovací sérum je vytěsněno pouze ze specifických epitopů tohoto antigenu, které pak mají zvýšenou afinitu k primární protilátce (https://www.lf3.cuni.cz/3LF-401.html).

Navázanou primární protilátku je nutno zviditelnit pomocí fluorescenční či enzymatické značky, která se naváže buď přímo na protilátku primární, nebo nepřímo na tzv. protilátku sekundární, která je namířena vůči imunoglobulínům zvířecího druhu, ze kterého byla získána primární protilátka (Obr. 9). Vzhledem k tomu, že jedním typem sekundární protilátky můžeme označit všechny primární protilátky produkované v jednom zvířecím druhu a k finanční náročnosti značení každé primární protilátky, se v imunohistochemické praxi spíše využívá nepřímá metoda značení.



Obr. 9: Princip nepřímé, tj. dvoustupňové imunohistochemické metody. Primární protilátka (*modře*), která se specificky naváže na antigen (*červeně*) je zviditelněna pomocí sekundární protilátky (*žlutě*) označené fluoroforem (*oranžově*). Normální sérum, které blokuje nespecifická vazebná místa (*zeleně*).

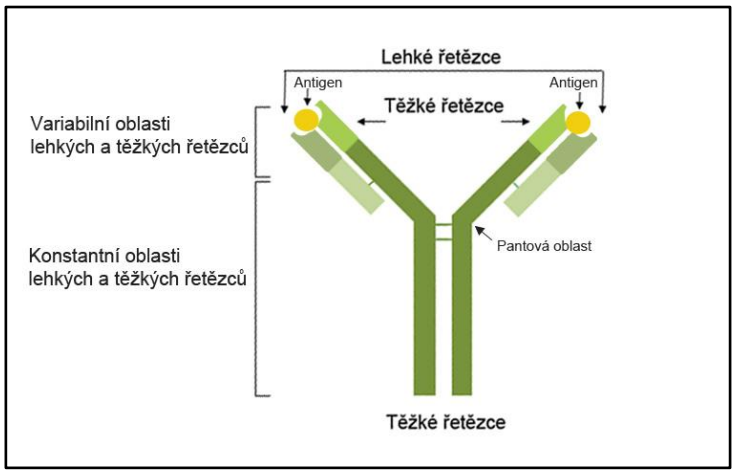
Ke značení protilátek se běžně využívají fluorofory. Většinou se jedná o aromatické sloučeniny obsahující velké množství elektronů, které se mohou snadno uvést do excitovaného stavu a poté se sami rychle vracejí zpět do energeticky nižších hladin. K tomuto návratu dochází v řádu maximálně několika nanosekund. Existuje velké množství fluoroforů, jejichž emisní spektra pokrývají téměř celé spektrum viditelného světla s přesahy do ultrafialové a infračervené oblasti. Jedná se například o deriváty rhodaminu, kumarinu a cyaninu, ale patří sem i proteiny jako již dříve zmiňovaný zelený fluorescentní protein.

Principem enzymatického značení je reakce enzymu s vhodným substrátem za vzniku barevného produktu. Nejčastěji užívanými enzymy ke značení protilátek jsou křenová peroxidáza (HRP) a alkalická fosfatáza (AP). V případě peroxidázy se používá jako vhodný substrát 3´,3´-diaminobenzidin tetrahydrochlorid (DAB), který se za přítomnosti peroxidu vodíku mění z původně rozpustného na stabilní nerozpustný hnědý produkt. Jeho zabarvení a intenzitu lze sledovat pomocí světelného mikroskopu a pokud se jedná o reakci v roztoku, pak ji lze měřit pomocí kolorimetru. Substráty HRP jsou i chemiluminiscenční substráty běžně užívané především při Westernblotové analýze, které se vlivem peroxidázy destabilizují a při jejich opětovné stabilizaci vyzáří světlo. Množství světla je pak přímo úměrné množství peroxidázy. Jako substrát alkalické fosfatázy se využívá nitroblue tetrazolium (NBT) / 5-bromo-4-chloro-3-indol fosfát (BCIP), jehož katalýzou vzniká modré barvivo. Ke značení protilátek se též využívá vitamín H-biotin, který je detekován díky jeho vazbě na proteiny avidin či streptavidin, z nichž každý může vázat 3 molekuly HRP. Množství vzniklého enzymatického produktu se tím ztrojnásobí a citlivost detekce rapidně vzrůstá.

3.2. Příprava protilátky

Protilátka se připravuje vpravením antigenu donorového organismu do organismu příjemce, kde spustí imunitní odpověď. Protilátky jsou imunoglobuliny tvořené plazmatickými buňkami, které diferencují z B-lymfocytů jako reakce na průnik antigenu do organismu. Souběžně s plazmatickými buňkami vznikají také paměťové buňky, které umožní organismu rychleji rozpoznat antigen v případě opětovné imunizace. Komerční příprava protilátek zahrnuje 3 až 4 imunizace vždy s odstupem několika, zpravidla dvou týdnů. Protože antigen vytváří velké množství epitopů, je tvořeno široké spektrum protilátek různými kmeny B-lymfocytů. Protilátku, která je namířena proti více druhům epitopů daného antigenu, označujeme jako *polyklonální.* Naproti tomu *monoklonální protilátky* jsou namířeny vůči jednomu epitopu daného antigenu. Lze je připravit fúzí příslušné plazmatické buňky a

myelomové buňky, která zajistí nepřetržité dělení vzniklého hybridomu a dostatečnou produkci protilátky.



Obr. 10: Struktura protilátky. Protilátka tvořena dvěma identickými lehkými řetězci (*šedá*) a těžkými řetězci *(zelená*) obsahujícími konstantní a variabilní domény. Variabilní domény obou řetězců vytváří vazebná místa pro specifický epitop příslušného antigenu. (https://labguide.cz/protilatky/).

Protilátka obsahuje dva identické těžké řetězce a dva identické lehké řetězce navzájem propojené disulfidickými můstky. Tyto řetězce se od sebe liší molekulovou hmotností a počtem aminokyselin a každý je složen z konstantní a variabilní domény (Obr. 10). Vzhledem k charakteru konstantní domény, rozdělujeme těžké řetězce do pěti skupin označovaných řeckými písmeny (α, δ, ε, γ, μ). Na základě tohoto dělení řadíme molekuly protilátek do tříd *IgA, IgD, IgE, IgG* a *IgM*. Variabilní oblast těžkých řetězců závisí na typu klonu B-lymfocytu, ze kterého protilátka vzniká. Variabilní domény lehkého a těžkého řetězce společně vytvářejí tzv. vazebné místo, které je klíčovým místem pro navázání antigenu. Každá protilátka tvoří dvě vazebná místa, kam se může antigen připojit (Obr. 10). K navázání antigenu do vazebného místa dochází prostřednictvím nekovalentních vazeb, kam patří elektrostatické vazby, hydrofobní síly, Van der Waalsovy síly a vodíkové můstky (Ribatti 2015).

3.3. Využití imunodetekce specifických antigenů

Detekce peptidů a proteinů imunohistochemickou metodou je běžný způsob, kterým lze vizualizovat jejich přítomnost přímo ve studované tkáni. Je oblíbenou lokalizační technikou v biologickém výzkumu i v medicínské diagnostice. Touto metodou jsou například lokalizovány různé typy neurohormonů nebo neuropeptidů v centrální nervové soustavě a těle různých modelových organismů. Znalost jejich distribuce pomáhá objasnit jejich funkci. Zatímco u hmyzího modelového organismu *D. melanogaster* je známá lokalizace i role celé řady neuropeptidů, u dalších zástupců hmyzu jsou zatím známé jen některé (Kodrík a kol. 2000).

Neuropeptidy patří k nejpočetnější skupině neuromediátorů a stále jsou objevováni další zástupci. Dělí se podle chemické struktury, funkce v organismu nebo podle tkáně, ve které převážně vznikají. Jejich nižší zastoupení je kompenzováno vyšší afinitou k jejich receptorům. V organismu jsou tvořeny z neaktivních prekurzorů, jejichž posttranskripční úpravy (štěpné oblasti v preprohormonu, terminální amidace, …) jsou tkáňově specifické. K syntéze prekurzorů dochází na ribozomech endoplazmatického retikula a jsou dále zpracovávány Golgiho aparátem. Ve váčcích Golgiho aparátu jsou cytoplazmou transportovány až do axonu, kde se exocytózou vylévají do synaptické štěrbiny. Neuropeptidy nejsou opětovně využívány vychytáváním a inkorporací do synaptických váčků, jako tomu je u běžných neuromediátorů.

Jedním z nově objevených a zkoumaných neuropeptidů je peptid TEFLa identifikovaný *in silico* metodou u ploštice ruměnice pospolné, *Pyrrhocoris apterus* (Doležel nepublikovaná data). O zařazení tohoto peptidu do neuropeptidové rodiny svědčí jeho aminokyselinová sekvence (TVGTEFL**G**KR), která obsahuje štěpná místa, před nimiž se nachází glycin, který může být amidován. Název TEFLa je odvozen od části aminokyselinové sekvence, ke které je přidáno písmeno (a) jako amidovaný glycin. Funkci TEFLa jako neuropeptidu potvrzují i výsledky RT-PCR analýzy jeho genové exprese, která odhalila přítomnost vysoké hladiny transkriptu v mozku. Cílem této práce bylo imunohistochemické potvrzení přítomnosti peptidu TEFLa v nervové tkáni a identifikace neuronů syntetizujících tento neuropeptid pomocí specifické protilátky namířené proti peptidu TEFLa včetně amidované formy.

4. Cíle práce

Záměrem mé bakalářské práce bylo seznámení se s technikami běžně využívanými v molekulární biologii k *in situ* lokalizaci genových produktů.

Cíl 1: Mým úkolem bylo studovat expresní aktivitu genů značených bioluminiscenčními genovými markery pomocí mikroskopu LuminoView 200 (Olympus), který je specializován k vizualizaci bioluminiscence. Měla jsem zdokonalit techniku monitorování bioluminiscenčního signálu v mozcích hmyzu tak, aby byl detekován na úrovni jednotlivých buněk. K tomuto účelu jsem měla k dispozici transgenní linii *D. melanogaster*, ve které je gen kódující luciferázu (katalyzátor bioluminiscenční reakce) exprimován spolu s genem *period* zahrnutým v kontrole cirkadiánních hodin.

Cíl 2: Imunohistochemickou metodou, která slouží k detekci specifických proteinů ve tkáni, jsem měla lokalizovat peptid TEFLa, nově identifikovaný neuropeptid u ploštice *P. apterus*. Měla jsem zmapovat lokalizaci tohoto neuropeptidu jak u dospělce, tak během embryonálního a larválního vývoje. A u dospělce dále stanovit možné ovlivnění jeho exprese cirkadiánními rytmy.

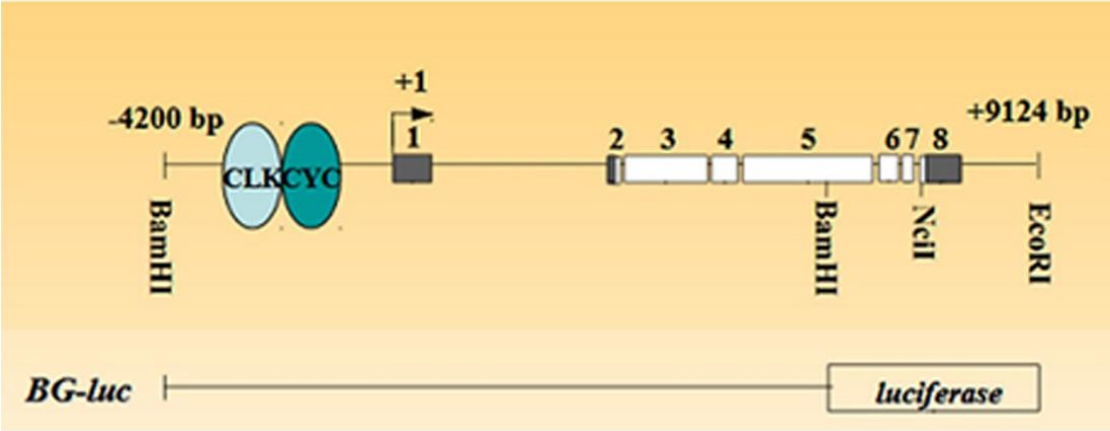
Kromě těchto dvou hlavních cílů, jsem se v rámci zdokonalení klasických histologických technik, podílela na projektu studie morfologie jedové žlázy lumčíka *Habrobracon hebetor*, kterou lze najít v příloze této práce.

5. <u>Projekt 1:</u> Zdokonalení techniky monitorování bioluminiscenčního signálu odrážející expresní aktivitu genů cirkadiánních hodin v mozku *Drosophila melanogaster*

5.1. Materiál a metodika

5.1.1. Použitá zvířata

Pro všechny experimenty byli použiti samci z geneticky modifikované linie octomilky *Drosophila melanogaster, Pdf-RFP, BG-luc,* který obsahuje *period-luciferázový* transgen (*BG-luc60*; Stanewsky a kol. 1998, Obr.11) a *Pdf-RFP* transgen mající 0,6 kb Pdf regulační genomovou DNA fúzovanou s DNA kódující mRFP1 (červený fluorescentní protein, Shaner a kol. 2008). Tato linie byla poskytnuta prof. Ralfem Stanewsky, Univerzita v Münsteru, Německo. Octomilky byly chovány na standartním kukuřičném médiu při konstantní teplotě 25 °C ve světelném režimu 12 h světlo/12 h tma.



Obr. 11: Schematické znázornění struktury genu *period* a *period-luciferázového* transgenu u *BG-luc60*. Čísla *1-8* znázornění exonů, *+1* počátek translace, CLK/CYC vazebná místa pro CLK a CYC heterodimer, ležící v promotorové oblasti genu, *EcoR1, Neil1, BamH1* restrikční místa.

5.1.2. Příprava tkáně pro monitorování bioluminiscence

Mozky octomilek uspaných pomocí oxidu uhličitého byly vypreparovány v M3 živném médiu (Shields and Sang M3 Insect Medium, Sigma) tak, aby nedošlo k jejich poranění. Opatrně byla odstraněna retina, možná příčina nechtěného signálu, protože také exprimuje gen *period.* Poté byly mozky přemístěny do čistého živného média v zobrazovací mističce (zell-kontakt, Německo), která byla vložena do luminiscenčního mikroskopu.

Živné médium bylo připraveno ve sterilním prostředí, aby nedošlo k jeho bakteriální kontaminaci. Ke 4,3 ml hmyzího živného média, které napodobuje vlastnosti hemolymfy specifického hmyzu, v tomto případě octomilky, bylo přidáno 0,6 ml fetálního bovinního séra (Sigma), sloužící jako výživa pro vyjmuté orgány, 5 µl insulinu (Sigma) a také 5 µl luciferinu (Biosynth). Pro dlouhodobé experimenty bylo do média přidáno alespoň 50 µl antibiotikové směsi (Penicilinu/streptomycinu, Sigma) pro zvýšení bariéry bránící růstu bakterií.

5.1.3. Monitorování bioluminiscenčního signálu

Bioluminiscenční signál byl vizualizován mikroskopem LuminoView 200 (Olympus), který byl obohacen o spektrální filtry umožňující rovněž detekci fluorescence. Samotný obraz byl snímán Andor I Kon-M912 UM-CCD kamerou s vysokým rozlišením 1024 x 1024 pixelů při velikosti jednoho pixelu 13 x 13 µm. Jak mikroskop, tak kamera byly ovládány softwarem Xcellence (Olympus), ve kterém byly následně prováděny primární analýzy získaných dat.

5.2. Výsledky

5.2.1. Výběr vhodné linie octomilek

Pro detailní záznam bioluminiscenčního signálu v mozku octomilky bylo nezbytné umístit skupinu testovaných neuronů cirkadiánních hodin přímo do roviny ostrosti mikroskopu. Zviditelnění bioluminiscence vyzařované takto malými neurony vyžaduje delší expoziční čas v řádu desítek minut, proto je přesné zaostření na tyto neurony velice obtížné. Bylo proto nutné opatřit neurony dalším vhodným markerem, který by umožnil jejich zacílení. Na rozdíl od předchozích verzí LuminoView 200 (Olympus) je náš systém vybaven spektrálními filtry pro detekci fluorescence. K monitorování expresní aktivity genu *period* byla proto připravena stabilní linie octomilky *Pdf-RFP, BG-luc*, která nese dva transgeny. Jednak *period-luciferázový* transgen *BG-luc60* (Stanewsky a kol. 1998), jehož pomocí se míra exprese genu *per* odráží v množství produkované bioluminiscence a jednak transgen *Pdf-RFP*, který umožňuje zviditelnit neurony cirkadiánních hodin produkující pigment disperzní faktor (Pdf) tak, že spolu s tímto faktorem je produkován i červený fluorescentní protein (RFP, Shaner et al. 2004). Pdf je exprimován ve skupině laterálních cirkadiánních neuronů (LNv) s výjimkou 5-tého malého laterálního neuronu (5-s-LNv). RFP tedy značí 5 velkých (l-LNv) a 4 malé laterální neurony (s-LNv). Fluorescence emitovaná RFP tak umožňuje přesné zaostření luminiscenčního mikroskopu na tyto skupiny neuronů.

5.2.2. Optimalizace přípravy vzorků

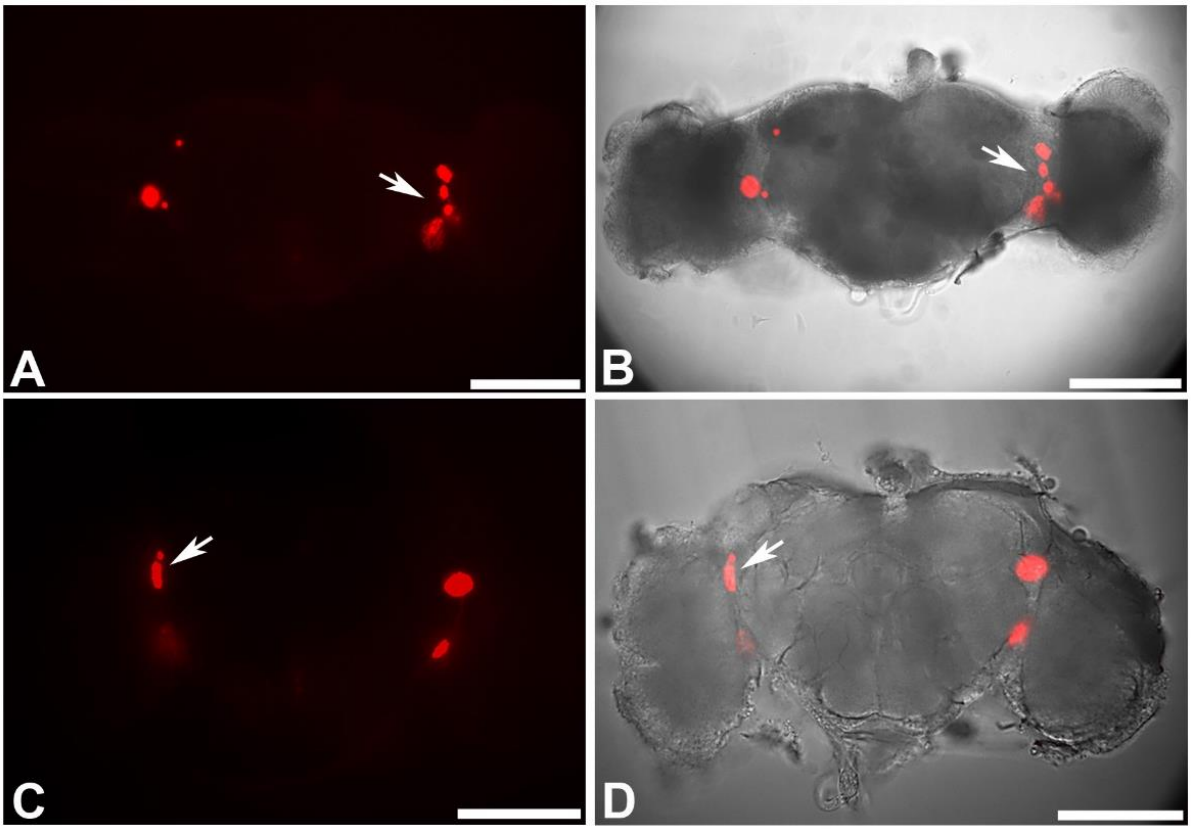
Pitva mozků a příprava živného média byla provedena podle standartního postupu přípravy mozků octomilek pro měření luminometrem (viz. Materiál a metody, Stanewsky a kol. 1998). Mozky v živném médiu byly dále umístěny do vizualizačních mističek, jejichž dno je tvořeno krycím sklíčkem, tudíž jsou vhodné k pozorování objektů invertovaným mikroskopem (zell-kontakt, Německo). Přestože se mozky podařilo umístit na dno mističky, sebemenší pohyb mikroskopického stolku způsobil rozpohybování tkáně, což znemožňovalo zaostření a dokonalé snímání. Pro stabilizaci tkáně na dně vizualizační mističky, bylo její dno ve sterilních podmínkách ošetřeno kapkou 0,01% poly-L-lyzinu (Sigma) a ponecháno zaschnout. Přestože mozky byly vlivem poly-L-lyzinu ukotveny na místě, během následné vizualizace byl opět zaznamenán výrazný pohyb tkáně. Tentokrát se jednalo o pohyb tkáně ve vertikální rovině, pracovně označen jako „sesedání“ tkáně, pravděpodobně způsoben vlivem vlastní tíhy mozku. Experimentálně bylo zjištěno, že k výraznému sesedání tkáně dochází zejména v prvních 12 hodinách po pitvě (Obr. 13 C, D). Připravené vzorky byly tedy umístěny do přístroje, kde v konstantní tmě setrvaly nejméně 12 h a bez další manipulace s nimi bylo započato snímání bioluminiscence až po uplynutí této doby.

Mouchy byly chovány nejméně 5 dní před počátkem experimentu ve světelných cyklech 12 h světlo/12 h tma při konstantní teplotě 25 °C. Mozky byly pitvány v čase ZT 16-21, tj. 16-21 hodin po rozsvícení světla, měření pak bylo započato o 12 hodin později, kdy mozky ležely v konstatní tmě, tj. devět hodin od počátku subjektivní světelné fáze cirkadiánního času (CT9). CT je počítán od počátku doby, kdy místo rozsvícení vzorky setrvávají v konstantní tmě.

5.2.3. Optimalizace snímaného obrazu

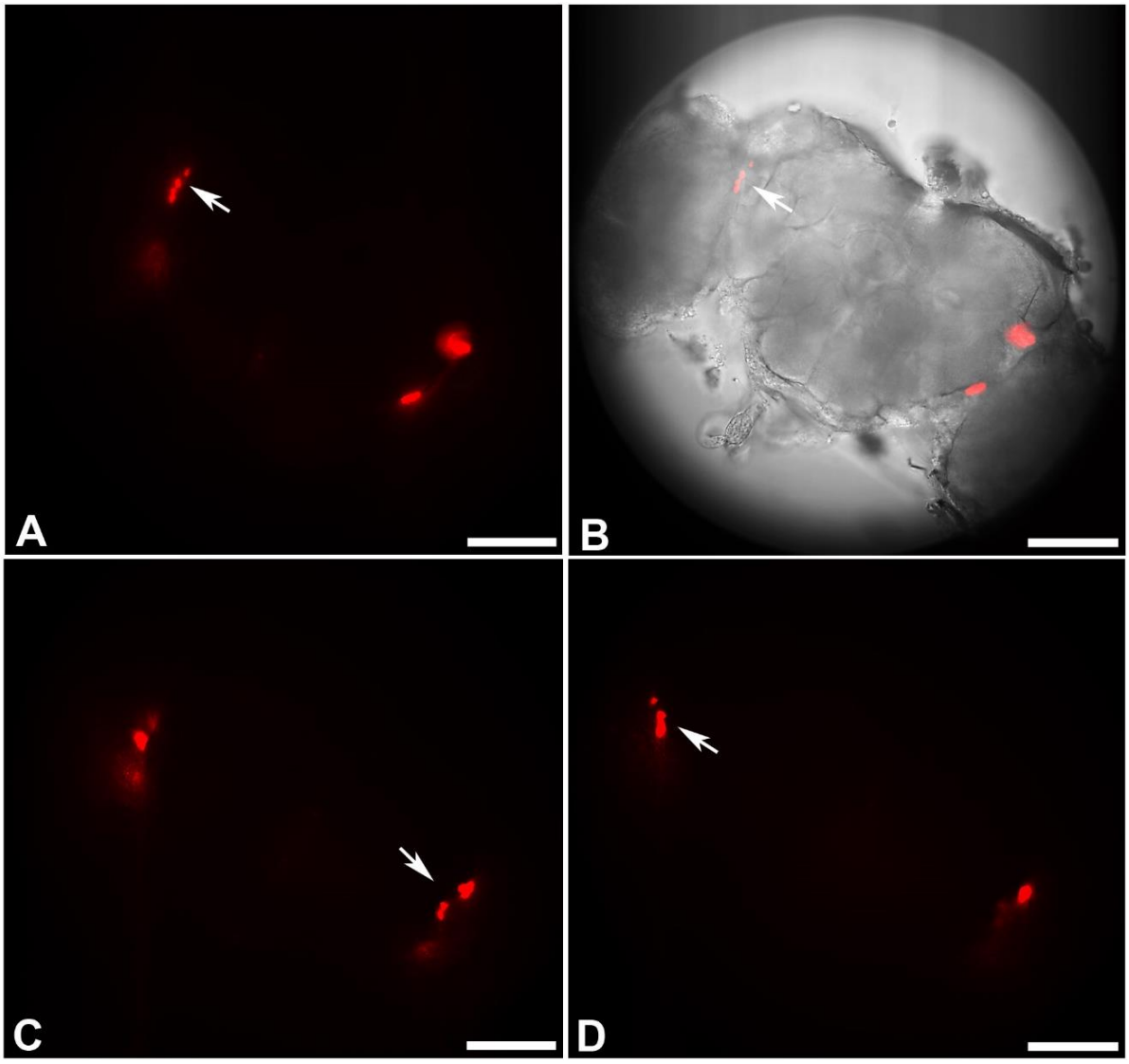
V předchozích studiích zaznamenávajících bioluminiscenci genu *period* v mozku octomilky byly použity objektivy s malým zvětšením 4x a 10x, které sice umožnily zachytit expresi genu ve všech hodinových neuronech najednou, ale s velice nízkým rozlišením, které neumožňovalo identifikovat jednotlivé buňky (Sehadová a kol. 2009, Roberts a kol. 2015). V některých případech dosahovaly CCD kamery malého rozlišení 512 x 512 pixelů. Náš LV 200 systém byl vybaven Andor I Kon-M912 UM-CCD kamerou s vysokým rozlišením 1024 x 1024 pixelů, ovládaný softwarem Xcellence (Olympus). Pro získání obrazu s vysokým rozlišením bylo nutno použít objektivy s větším zvětšením. Po pokusech s objektivy 20x a 40x, které poskytovaly obdobný obraz jako v uvedených publikacích, bylo přistoupeno k použití objektivu se zvětšením 60x a 100x. Jelikož neurony cirkadiánního oscilátoru leží v různých horizontálních vrstvách mozku, byl nejprve testován poloapochromatický objektiv

s dlouhou pracovní vzdáleností od 1,50 - 2,20 mm, se zvětšením 60x a numerickou aperturou 0,70, LUCPLFLN 60x ***(Long Universal Culture Plan Fluorite New).*** Poloapochromatické objektivy se vyznačují dlouhými pracovními vzdálenostmi a vynikajícím rozlišením a kontrastem pro snímání v procházejícím světle nebo při fluorescenčním snímání. Pomocí fluorescenční vizualizace bylo umožněno zacílení na Pdf-RFP pozitivní LNv a dosaženo poměrně kvalitního rozlišení (Obr. 12 A, B). Nicméně byl otestován i olejový apochromatický objektiv s mimořádně vysokým rozlišením, ale krátkou pracovní vzdáleností 0,10 mm, se zvětšením 60x a numerickou aperturou 1,45, PLAPON 60x O TIRFM ***(Plan Apochromatic, Oil Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy).*** Použitím tohoto objektivu bylo sice dosaženo ostřejšího zobrazení mozku v procházejícím světle, ale vzhledem k malé pracovní vzdálenosti nebylo možné dokonale proostřit na Pdf-RFP pozitivní LNv. Obraz bylo možné pořídit pouze tam, kde skupina LNv ležela v těsné blízkosti krycího skla (Obr. 12 C, D), přičemž se výsledný fluorescenční signál výrazně nelišil od signálu získaného objektivem LUCPLFLN 60x.



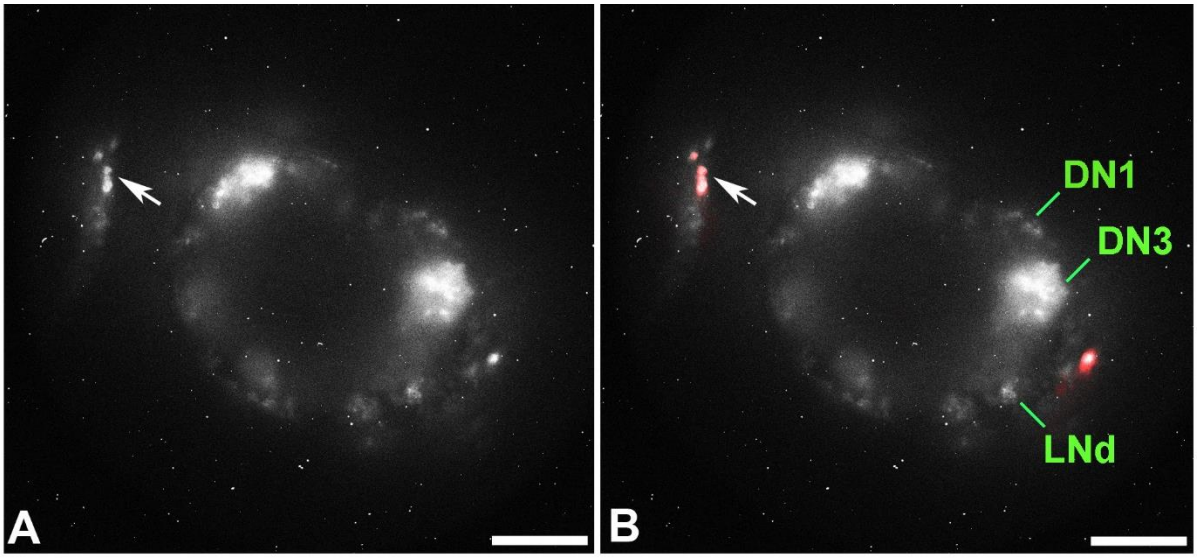
Obr. 12: Porovnání kvality snímků mozků *Pdf-RFP, BG-luc60* octomilek pořízených objektivy LUCPLFLN 60x (A, B) a PLAPON 60x OTIRFM (C, D) v LV 200. **(A, C)** Fluorescenční signál v Pdf-RFP pozitivních LNv. **(B, D)** Spojení fluorescenčního signálu s obrazem pořízeným v procházejícím světle. Šipka ukazuje na zaostřené skupiny LNv. Měřítko je 50 μm.

Vzhledem k tomu, že neexistuje objektiv LUCPLFLN se stonásobným zvětšením, byl k pokusu o dosažení ještě vyššího rozlišení použit apochromatický olejový objektiv s pracovní vzdáleností 0,12 mm, zvětšením 100x a numerickou aperturou 1,40, UPLSAPO 100x O (***U**niversal **P**lan **S**uper **A**pochromate **O**il*). Tímto objektivem bylo dosaženo nejlepšího rozlišení, přičemž bylo stále možno proostřit celou skupinu LNv. Proto byl použit ke snímání bioluminiscenčního signálu.

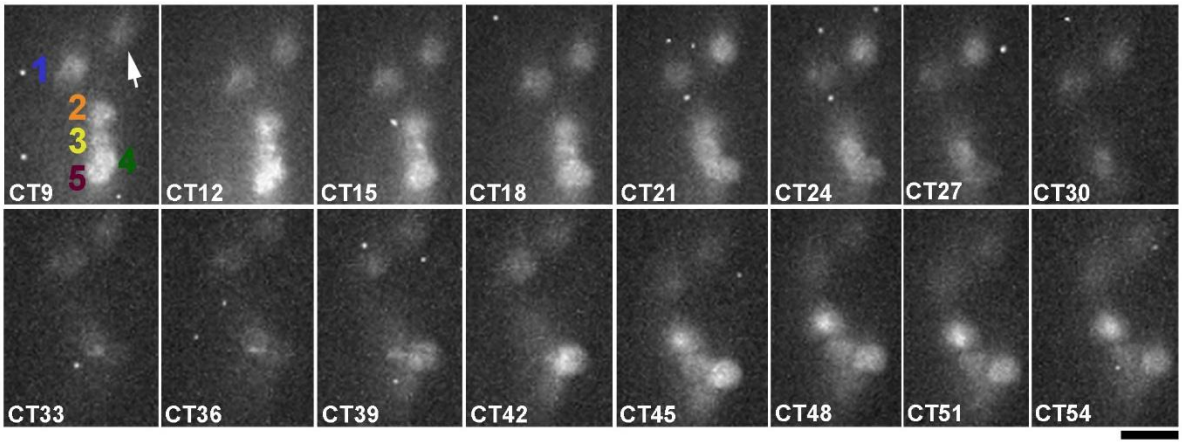


Obr. 13: Zobrazení mozků *Pdf-RFP, BG-luc60* octomilek objektivem UPLSAPO 100x O v LV 200. **(A)** Fluorescenční signál v Pdf-RFP pozitivních LNv. **(B)** Spojení fluorescenčního signálu s obrazem pořízeným v procházejícím světle. **(C, D)** Porovnání fluorescenčního signálu v Pdf-RFP pozitivních LNv ihned po umístění do mikroskopu (C) a po 12 hodinách v mikroskopu (D). Na snímcích je patrná změna pozice buněk vlivem „sesednutí" tkáně. Šipka ukazuje na zaostřené skupiny. Měřítko je 50 μm.

Experimentálně byla stanovena optimální expoziční doba pro snímání bioluminiscenčního signálu tímto objektivem na 30 minut (Obr. 14). S délkou expozice se zvyšoval poměr mezi signálem a šumem až k dosažení bílého signálu na tmavém pozadí. V porovnání s jinými objektivy lze říci, že s každým zvyšujícím se zvětšením objektivu 20x, 40x, 60x, 100x je nutno zvýšit dobu expozice o cca 5 minut k dosažení obdobné kvality signálu. Při menším rozlišení (binning 2) stačily poloviční expoziční časy, avšak na úkor kvality snímku. Binning 2 byl používán pouze při kontrole kvality signálu v testovaných mozcích před vlastním měřením. Pro dlouhodobé experimenty trvající několik dní byla po umístění mozků do mikroskopu nejprve zkontrolována přítomnost bioluminiscenčního signálu, poté byly mozky ponechány v přístroji dalších 12 h. Po uplynutí této doby započalo snímání bioluminiscence v hodinových intervalech pouze v jedné rovině zaostření, protože software Xcellence (Olympus) neumožňoval pořizovat snímky s různým proostřením v ose Z (Obr. 15 a LUMI_LNv.avi a LUMI_mozek.avi na přiloženém CD).



Obr. 14: Lokalizace bioluminiscenčního signálu v mozku *Pdf-RFP, BG-luc60* octomilek zobrazeném pomocí UPLSAPO 100x O objektivu v LV 200. **(A)** Bioluminiscenční obraz získaný 30min expozicí s rozlišením 1024 x 1024 pixelů. Šipka ukazuje na zaostřenou skupinu LNv. **(B)** Spojení bioluminiscenčního signálu s fluorescenčním signálem v LNv v mozku octomilky. *DN1, DN3* dorzální neurony 1, 3, *LNd* dorzální laterální neurony. Měřítko je 50 μm.



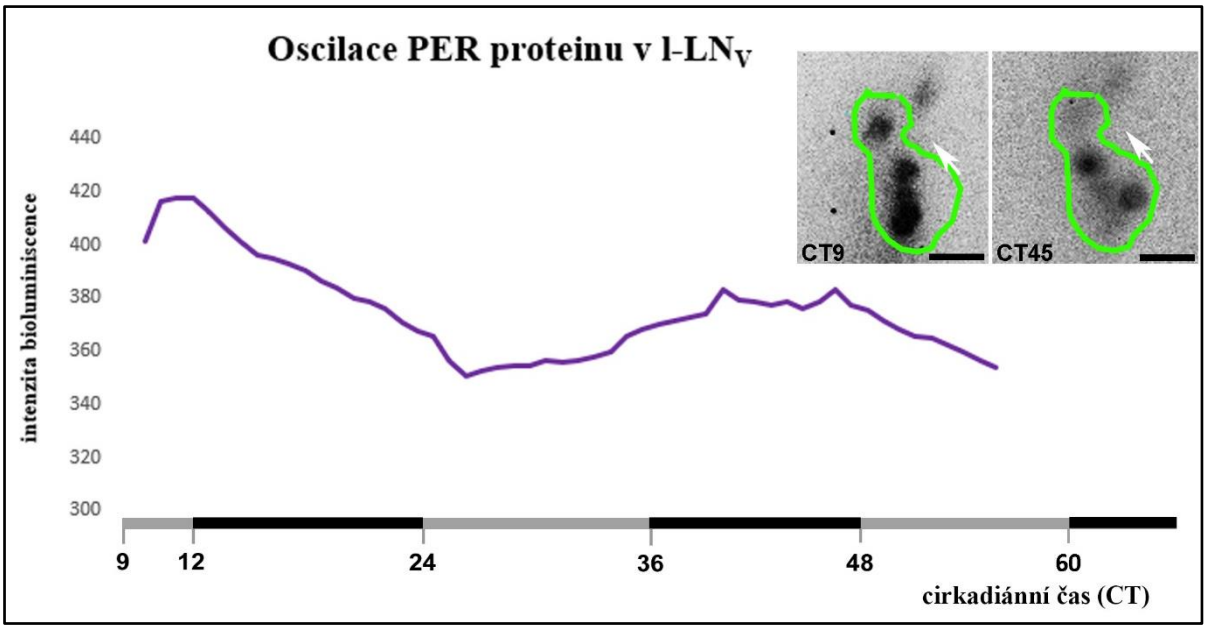
Obr. 15: Série snímků zachycující dynamiku PER proteinu v LNv buňkách v mozku *Pdf-RFP, BG-luc60* octomilky monitorovaném v konstantní tmě po dobu 54 hodin. Bioluminiscence byla zobrazena pomocí UPLSAPO 100x O objektivu v LV 200 a obraz byl získán 30min expozicí s rozlišením 1024 x 1024 pixelů. CT představuje cirkadiánní čas měřený od subjektivní světelné fáze. Čísla 1-5 identifikují jednotlivé buňky v rámci skupiny l-LNv. Šipka značí pátou s-LNv. Měřítko je 10 μm.

Za účelem snímání obrazu v ose Z, bylo testováno ovládání systému mikroskop-kamera softwarem MicroManager 1.4. (https://micro-manager.org), který umožňoval proostřování do různých rovin. Za použití tohoto softwaru byly však získány snímky s velice špatnou kvalitou, tzn. slabý signál se ztrácel ve vysokém šumu pozadí. Kvalita snímku tedy záleží nejen na typu mikroskopu, ale odvíjí se i od konfigurace systému software-kamera, tzn. závisí na tom, jakým softwarem je kamera ovládaná. Další program, který byl testován za účelem proostřování tkáně v ose Z, byl software MetaMorph (Molecular Devices), který umožňoval snímání bioluminiscence v ose Z s obdobnou kvalitou jako software Xcellence (Olympus). Program byl zapůjčen pouze ke krátkodobému testování.

5.2.4. Analýza obrazů

Série bioluminiscenčních snímků, získaná dlouhodobým měřením, byla podrobena následné analýze, která byla zaměřena na stanovení časové změny intenzity signálu v LNv a to v l-LNv a v 5-s-LNv ležící v rovině zaostření. Při detailním studiu byl zaznamenán pohyb jednotlivých neuronů v rámci této skupiny, který znemožňoval automatické propočtení změny intenzity bioluminiscenčního signálu softwarem Xcellence (Olympus) na úrovni jedné buňky. Program umožňuje označit oblast zájmu ROI (***R**egion **O**f **I**nterest*) v jednom obrazu ze série a pak propočítá intenzitu bioluminiscenčního signálu v této oblasti v celé sérii snímků a hodnoty převede do Excelu, kde je lze graficky zpracovat. Tímto způsobem je možno stanovit oscilaci bioluminiscenčního signálu pro celou skupinu buněk (Obr. 16). Vzhledem

k částečné migraci buněk ji navíc nelze přesně ohraničit, ROI musí zahrnovat i oblast původně bez signálu, kam buňky postupně domigrují, proto je výsledná hodnota intenzity signálu zkreslena částečným zahrnutím okolního pozadí.

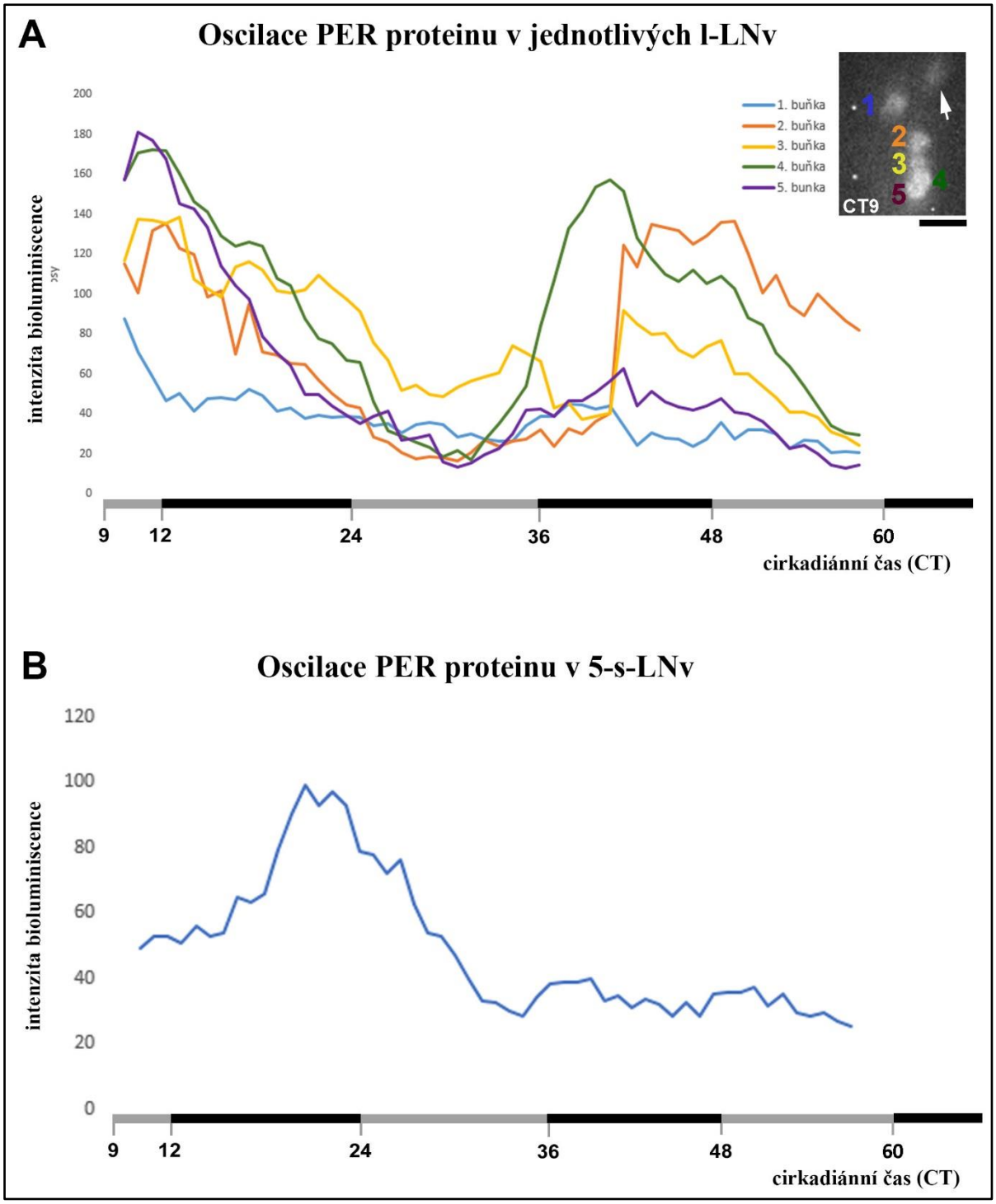


Obr 16: Graf znázorňující oscilaci PER proteinu v LNv v mozku *Pdf-RFP, BG-luc60* octomilky měřenou programem Xcellence. Hodnoty osy x představují cirkadiánní čas (CT), kdy šedá značí subjektivní den a černá subjektivní noc. Osa y znázorňuje intenzitu signálu ve stupních šedi. Příklad ohraničení ROI (*zeleně*) na snímku ukazujícím srovnání pozice l-LNv na počátku (CT9) a v průběhu měření (CT45). Šipky značí 5-s-LNv. Měřítko je 10 μm.

Cílem studie však bylo stanovit oscilace bioluminiscenčního signálu v rámci jednotlivých buněk, proto byla zvolena alternativní analýza v softwaru ImageJ (https://imagej.nih.gov). V tomto programu byla v každém snímku měřena intenzita signálu odrážející průměrnou hodnotu odstínu šedi (mean gray value) v oblasti buňky, od které byla vždy odečtena intenzita pozadí, tj. okolí buňky, a výsledné hodnoty byly zaznamenány v Excelu a vyneseny do grafu (Obr. 17).

Závěry o oscilaci proteinu PER v jednotivých buňkách byly odvozeny z dat získaných až v průběhu druhého dne měření, kdy došlo k poklesu velice intenzivního bioluminiscenčního signálu, typického pro první den. Tento výrazný signál byl zapříčiněn přítomností čerstvého luciferinu v médiu. Získaná data ukazují, že oscilace v množství PER proteinu vykazují v jednotlivých l-LNv rozdílný průběh (Obr. 17A). PER protein v nich osciluje s rozdílnou fází i amplitudou, přičemž intenzita signálu ve dvou z pěti l-LNv nevykazuje žádnou oscilaci, ve dvou dalších l-LNv osciluje se stejnou fází, ale rozdílnou

amplitudou a u poslední buňky dochází k fázovému předstihu maximální hodnoty intenzity signálu o dvě hodiny vpřed. Intenzita signálu v páté s-LNv během prvního dne měření postupně zeslabuje a nadále zůstává konstantní (Obr. 17B). U všech neuronů vykazujících dynamickou změnu v expresi PER proteinu bylo dosaženo maximálních hodnot v průběhu 2. fáze subjektivní noci, což odpovídá typickému chování PER proteinu zjištěnému v předchozích studiích jak měřením bioluminiscenčního signálu v rámci jedné skupiny (Roberts a kol. 2015), tak postupným měřením intenzit fluorescenčního signálu ze vzorků sbíraných ve čtyřhodinových intervalech v rámci celého dne (Hardin a kol. 1990). Vzhledem k opakovaným potížím způsobených kontaminací média a zejména pak úmrtím mozkové tkáně se dařilo dlouhodobě monitorovat bioluminiscenční signál u 5 ze 30 mozků, přičemž u dvou měření proběhlo déle než 48 hodin.



Obr. 17: Grafy znázorňující oscilace PER proteinu v jednotlivých LNv v mozku *Pdf-RFP, BG-luc60* octomilky měřené programem ImageJ. **(A)** Oscilace bioluminiscence v l-LNv. Čísla 1-5 v ilustračním obrázku značí jednotlivé buňky a šipka pátou s-LNv. **(B)** Oscilace bioluminiscence v 5-s-LNv. Hodnoty osy x představují cirkadiánní čas (CT), kdy šedá značí subjektivní den a černá subjektivní noc. Osa y znázorňuje intenzitu signálu ve stupních šedi. Měřítko je 10 µm.

5.3. Diskuze

Snímání bioluminiscenčního signálu se ukazuje jako šetrná neinvazivní technika, čím dál častěji využívaná k detekcím genové exprese. Její předností je možnost snímání signálu bez působení excitačního světla a vyšší citlivost daná vysokým poměrem signálu vzhledem k pozadí. Je vhodná k dlouhodobému monitorování změn expresní aktivity genu, která podléhá jak vývojovým, tak časovým změnám. A právě využití této techniky při studiu oscilace genových produktů zahrnutých v kontrole cirkadiánních rytmů jak u hmyzu, tak u savců, vyžaduje její neustálé zdokonalování. V mnoha případech nahrazuje časově náročné odběry vzorků v rámci řady dnů, na kterých je dále prováděna RT-PCR nebo imunohistochemická detekce studovaných antigenů následována analýzou výsledků.

Tato práce byla zaměřena na optimalizaci přípravy preparátů a způsobu snímání bioluminiscence v mozcích hmyzu. Pro přípravu preparátů se ukázalo jako kritické ošetření dna zobrazovacích mističek polylyzinem a vyvarování se bakteriální kontaminaci média. Pro životaschopnost tkáně a s tím spojená délka monitorování bioluminiscence závisela na stupni poškození mozku během pitvy. Přesnost měření vyžadovala alespoň dvanáctihodinovou rekonvalescenci tkáně po pitvě a její tzv. sesednutí na dno misky, aby setrvala ve fixované pozici. Pro samotné snímání bioluminiscenčního signálu se nejlépe osvědčilo použití apochromatického olejového objektivu UPLSAPO 100x O s pracovní vzdáleností 0,12 mm, kterým bylo docíleno dobrého rozlišení a zároveň bylo možno doostřit do téměř celé tloušťky mozku (cca 100 μm). Nicméně pro dosažení stejné kvality zobrazování jak dorzálních, tak laterálních skupin neuronů v mozku by bylo vhodné provést měření v mozcích s různou anterioposteriorní orientací. Jelikož není na trhu dostupný objektiv se stonásobným zvětšením a dlouhou pracovní vzdáleností využitelný pro biologický materiál, pro docílení vyšší hloubky ostrosti v rámci jednoho mozku bylo nutno použít objektiv s dlouhou pracovní vzdáleností 1,50 - 2,20 mm, jako je LUCPLFLN 60x. Naprotitomu se vůbec neosvědčil tirfový objektiv PLAPON 60x OTIRFM s pracovní vzdáleností 0,10 mm, který znemožňoval dokonalé zaostření.

V rámci dlouhodobého monitorování bioluminiscenčního signálu byla zaznamenána migrace neuronů v rámci studované skupiny, která mohla být způsobena pokračujícím „sesedáním“ tkáně, avšak s nižší intenzitou než během prvních dvanácti hodin po pitvě. Tento výrazný posun neuronů znemožnil přesnou analýzu časových změn intenzity bioluminiscence v rámci jedné buňky v programu Xcellence. Tento nedostatek byl prozatím vyřešen pracnou analýzou v programu ImageJ, ve kterém byly intenzity signálu určeny pro každý snímek a buňku zvlášť.

Během testování softwaru vhodného k ovládání systému mikroskop-kamera pro monitorování bioluminiscence v ose Z jsme zaznamenali, že kvalita snímaného signálu záleží na tom, kterým softwarem je kamera ovládána. Software MicroManager 1.4 v kombinaci s kamerou Andor I Kon-M912 UM-CCD se ukázal být zcela nevhodný. I při vylepšení binningu a prodloužení expozičního času se nepodařilo nasnímat kvalitní bioluminiscenční obraz. Další testovaný program MetaMorph se vyznačoval nejen dobrou kvalitou snímků, ale umožňoval proostření v ose Z. Měření v osách Z nebyla zatím provedena, protože v průběhu tohoto projektu nebyl zmiňovaný software dostupný (zapůjčen jen na krátkodobé testování). Nicméně v této době již Středisko histologie a mikroskopie Entomologického ústavu Biologického centra Akademie věd v Českých Budějovicích disponuje tímto softwarem.

Přestože je dlouhodobé snímání bioluminiscenčního signálu na úrovni jedné buňky v mozcích hmyzu technicky náročné, je proveditelné a umožňuje získat velice detailní informace o expresi zkoumaných genů, kterých nelze docílit uplatněním jiných technik.

6. Projekt 2: Imunodetekce proteinu TEFLa v *Pyrrhocoris apterus*

6.1. Materiál a metodika

6.1.1. Použitá zvířata

Pro imunohistochemické experimenty byly použity tkáně nymf a dospělců divokého typu ploštice ruměnice pospolné, *P. apterus*. Jedinci byli chováni v inkubátorech při teplotě 25 °C a fotoperiodě 12 h světla /12 h tmy a byli krmeni plody lípy srdčité a vodou.

6.1.2. Zpracování tkáně pro imunodetekci

Fixace tkání nymf a dospělců

Z CO_2 anestetizovaných nymf a dospělců ploštic byly v 0,01 M fosfátovém pufru (PB), pH 7,4 vypitvány jednotlivé tkáně a fixovány 4% roztokem paraformaldehydu 1-2 h při pokojové teplotě. Posléze byly promyty 3x 15 min v PB.

Sběr a fixace embryí

Vzhledem k obtížnosti zpracování a přípravy embryí k imunodetekci je zde uveden detailní postup. Před sběrem embryí z různých vývojových stádií se oplozené samice nejprve nechaly vyklást, pak byly přeneseny do nových misek s trochou potravy, jejichž dno bylo pokryto filtračním papírem, a po jednodenním kladení byla odebrána čerstvá embrya. Po 1, 3 a 5 dnech embryonálního vývoje se byly embrya sebrány do ependorfek a dechorionizována 30% hydroxidem draselný (KOH) po dobu cca 7 min, za neustálého pozorování pod stereomikroskopem. Jakmile začal chorionový obal průhlednět, bylo KOH nahrazeno 2% chlornananem sodným (NaClO), který dále působil na chorionový obal. Odstranění chorionu bylo pozorovatelné po cca 3 minutách, kdy se embrya začala lepit na stěnu ependorfky. Pak se embrya několikrát promyla v 0,01 M PB. Odstranění vitelinní membrány a souběžná fixace byla provedena za použití roztoku obsahující 1,7% formaldehydu a 33% n-Heptanu v PB. Po aplikaci tohoto roztoku byly ependorfky s embryi ponechány 30 min na třepačce. Po uplynutí této doby byla odstraněna horní fáze roztoku, tvořena n-Heptanem a přidáno 500 µl vychlazeného 100% methanolu a embrya byla silně zvortexována. V dalším kroku byla odstraněna spodní fáze roztoku, byl přidán 1 ml vychlazeného 100% methanolu a embrya byla opět 3x-5x vortexována. Poté byly vzorky 3x 10 min promyty vychlazeným 100% methanolem. Před imunodetekcí musela být embrya znovu zavodněna sestupnou

methanolovou řadou (90%, 70%, 50%, 30% methanol, každý po 2 min), a nakonec promyta v PB.

6.1.3. Imunodetekce

Pro vysycení nespecifických vazebných míst bylo na fixované tkáně pomyté v PB aplikováno 5% kozí sérum v PB obohaceném o 0,5% Triton X-100 (blokovaní médium), a to nejméně po dobu 2 h při pokojové teplotě. Následně byly vzorky inkubovány s krysí primární protilátkou anti-TEFLa (Moravian Biotech) ředěnou v poměru 1:200 v blokovacím médiu po dobu 3-4 dnů ve 4 °C. Nenavázaná primární protilátka byla vymyta 3x 15 min PB s 0,5% Tritonem X-100 (PB-T). V kontrolním experimentu byla primární protilátka nahrazena kozím sérem. Dále byla aplikována kozí sekundární protilátka namířená proti krysím imunoglobulínům značená fluoroforem Alexa 594 a Alexa 488 (Alexa fluor 594 Goat anti-rat IgG a Alexa fluor 488 Goat anti-rat IgG, Life Technologies, Invitrogen) ředěná 1:200 v blokovacím médiu po dobu 1-2 dnů ve 4 °C. Po promytí vzorků 3x 15 min v PB-T a 1x 5 min v PB byly zhotoveny trvalé preparáty zalitím tkání do montovacího média (Vectashield, Vector laboratories). Pro malé tkáně byla sklíčka opatřena několika výztužnými kroužky, které bránily rozmačkání tkáně po přiložení krycího skla.

Pro zviditelnění tkáňových struktur embryí byla obarvena jádra pomocí DAPI za použití zalévacího média Fluoroshield s DAPI (Sigma) nebo pomocí roztoku (40 μg/ml PB) propidium jodidu (TermoFisher).

6.1.4. Fotodokumentace a analýza obrazu

Fotodokumentace TEFLa pozitivního signálu byla provedena pomocí konfokálního mikroskopu FluoView 1000 (Olympus). Pro pořízení snímků zachycující celý orgán byl použit objektiv UPLSAPO 10x (***U**niversal **P**lan **S**uper **A**pochromatic*) a výsledná 3D fotografie byla vytvořena složením série snímků různě proostřených v ose Z v programu Imaris verze 6.3.1. (Bitplane). Pro získání detailních záběrů byl použit objektiv UPLSAPO 20xO (***U**niversal **P**lan **S**uper **A**pochromatic*) a jednotlivé dílčí snímky byly do výsledného obrazu poskládány za použití programu XuvStitch (http://www.xuvtools.org/doku.php). Konečná grafická úprava snímků byla zhotovena v programu Adobe Photoshope (Adobe Systems).

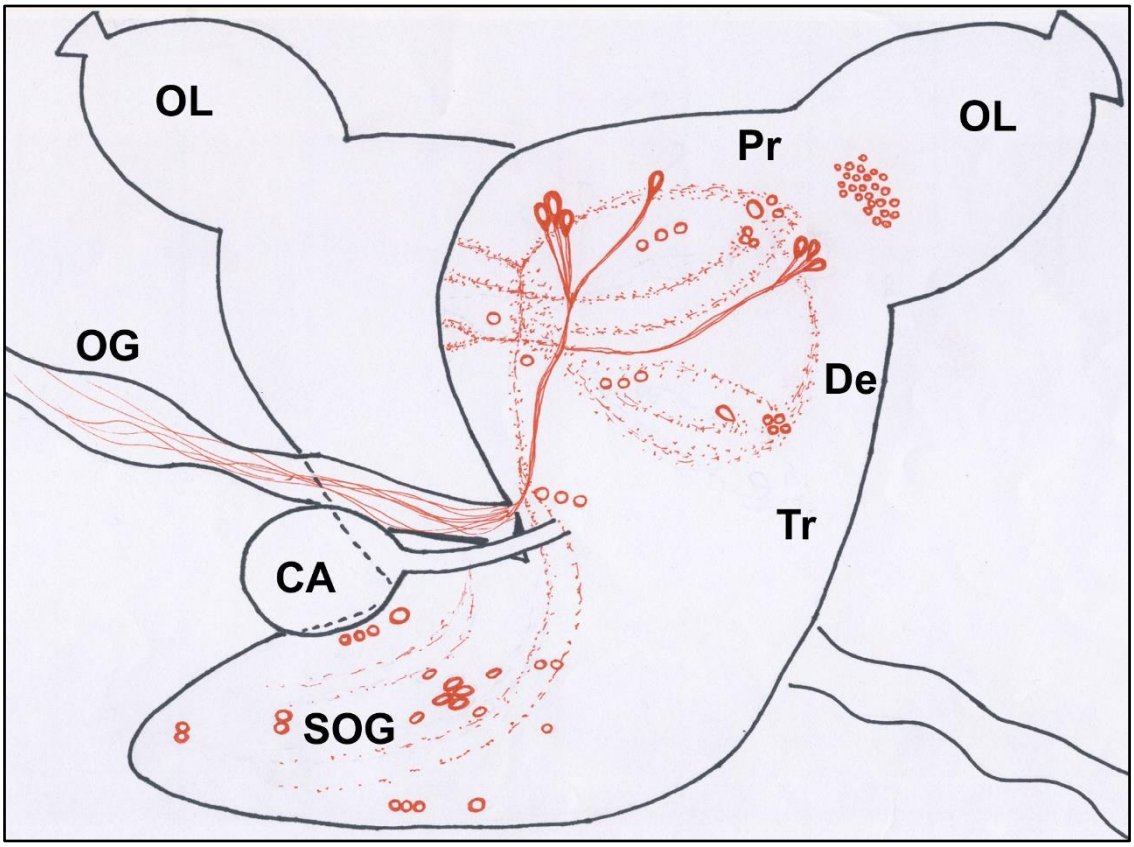
6.2. Výsledky

Imunoreaktivita s anti-TEFLa protilátkou v hlavovém gangliu dospělce

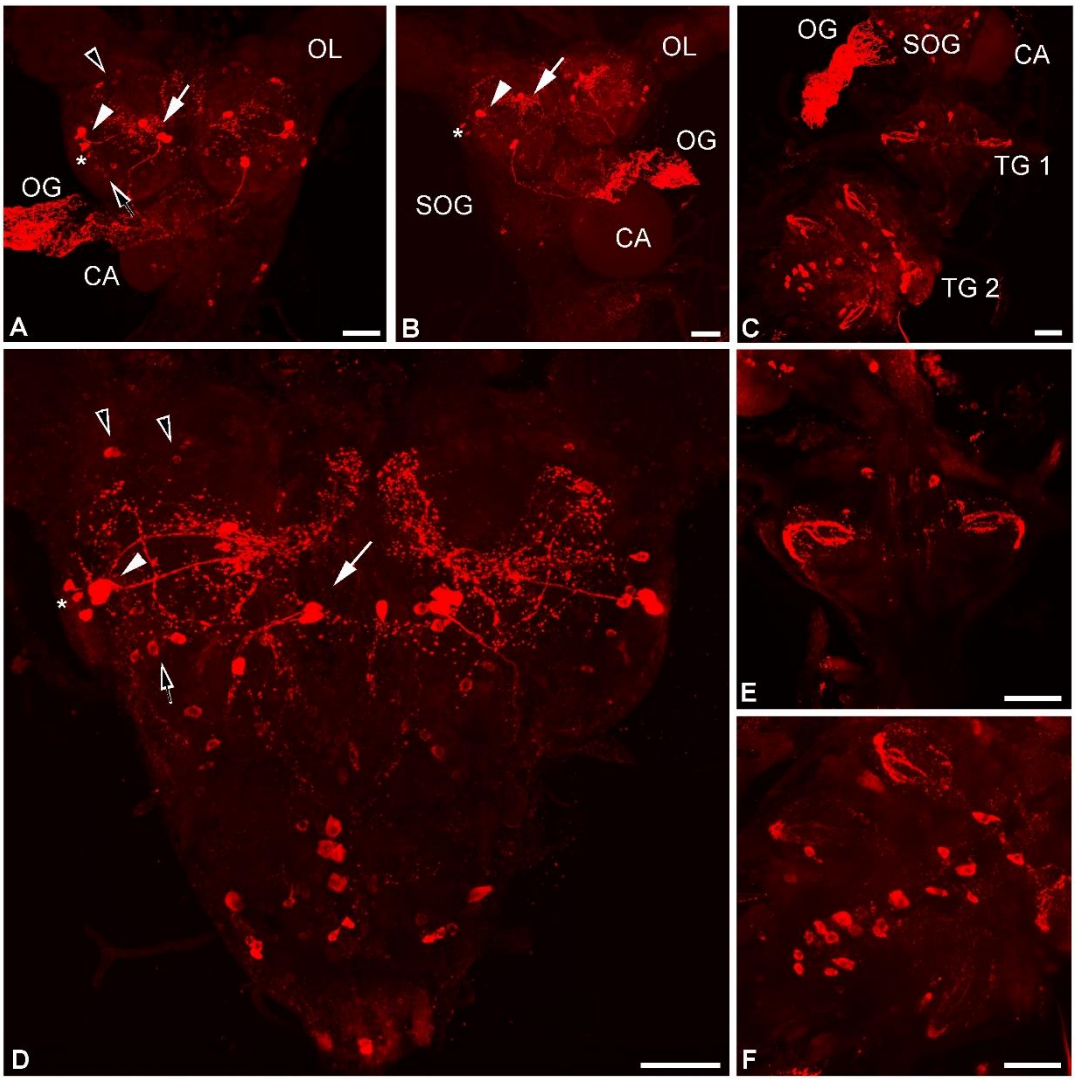
Protilátkou proti neuropeptidu TEFLa byly v centrálním mozku a suboesophageálním gangliu (SOG) u dospělce detekovány desítky neuronů, jejichž nervové procesy vytváří hustou síť zejména v rámci protocerebra a deutocerebra. Nejintenzivnější reakce byla zaznamenána ve 2 skupinách neuronů, ležících bilaterálně v dorzálním a laterálním protocerebru. Skupina dorzálních neuronů je umístěna posteriodorzálně blíže ke středové ose mozku, je tvořena 4 velkými neurony, z nichž 3 se nachází ve vzájemné blízkosti a čtvrtý leží dorzálně od nich. Nervové axony vycházející z těchto neuronů běží ventrálně do deutocerebra, kde posteriorně vybíhají ven z mozku a bohatě se větví na povrchu jícnu (Obr. 19 A, B, D). Skupina výrazně značených laterálních neuronů je tvořena 3 buňkami, které vysílají své axony mediálně ke středové ose, kde se intenzivně větví. Z této sítě vláken vychází jednak nervové svazky anteriorně a posteriorně propojující obě hemisféry, a jednak axony běžící anterioventrálně do tritocerebra. Zde formují 2 paralelně běžící nervová vlákna inervující ventrální středovou oblast podjícnového ganglia (Obr. 19 A, B, D). V posteriorní oblasti ventrálního protocerebra každé mozkové hemisféry se nachází asi 5 slabě značených neuronů. Při anteriorním povrchu protocerebra se v každé hemisféře nachází asi 6-8 slabě značených malých neuronů a jeden větší s výraznějším signálem (Obr. 19 A, D). Nervové dráhy vycházející z těchto neuronů inervují anteriorní protocerebrum, tvoříce 2 dorzálně propojené dráhy běžící dorzomediálním směrem a splývají se sítí vláken vycházejících z velkých dorzálních neuronů. Do této sítě rovněž ústí nervové dráhy vedoucí z asi 4 malých a jednoho velkého neuronu, ležících v laterální oblasti deutocerebra. Dráhy těchto neuronů rovněž vytváří dorzolaterální anastomózu se sítí vláken v anteriorním protocerebru. Na frontální straně tritocerebra v blízkosti jícnu je protilátkou značena bilaterální skupina 3 neuronů (Obr. 19 A, D). Početná skupina velmi malých neuronů leží frontálně na bázi každého optického laloku v oblasti akcesorické meduly. Dorzálně od této skupiny byly občasně nalezeny 2-3 větší slabě značené neurony. Pozitivní signál byl také detekován v oblasti podjícnového ganglia. Intenzivně značena byla bilaterální skupina 3 malých a jednoho velkého neuronu, které se nachází v laterální oblasti maxilární neuromery. Při dorzálním povrchu středové osy ganglia se nachází 2 páry výrazně značených neuronů, jeden leží v posteriorní části labiální neuromery a druhý ve střední části maxilární neuromery. Střední část mandibulární neuromery obsahuje skupinu 4 velkých neuronů, a v jejich okolí je slabě značeno několik malých buněk (Obr. 19 A, B, D). Výrazný signál byl nalezen i v prvním a druhém thorakálním gangliu (Obr. 19 C, E,

F). Zbytek centrální nervové pásky nebyl testován. V mediální části anteriorní oblasti prvního thorakálního (TG1) ganglia se nachází 2 dorzálně umístěné neurony. Tyto výrazně značené neurony dávají vznik dvěma paralelně běžícím nervovým vláknům, která vybíhají laterálním směrem a zanikají při výstupu laterálního nervu. V laterálních oblastech ganglia se nachází 2 velké velmi slabě značené buňky. Druhé thorakální ganglium (TG2) obsahuje v oblasti dvou dvojic vybíhajících laterálních nervových vláken, dvojice dorzálně umístěných neuronů. Posteriorní oblast druhého thorakálního ganglia obsahuje skupinu asi 6 velkých a 5-6 velmi drobných dorzálně ležících buněk a 6-8 velkých ventrálně umístěných neuronů. V neurohemálních orgánech nebyl nalezen žádný pozitivní signál.

V rámci mapování imunoreaktivity nově objeveného neuropeptidu byla testována možnost kontroly jeho exprese cirkadiánními hodinami. Z tohoto důvodu byli jedinci chováni ve standardních světelných podmínkách s fotoperiodou 12 h světla/12 h tmy a vzorky pro imunohistochemickou detekci byly sbírány v časech ZT 8-10 a ZT 23-1, přičemž ZT0 představuje počátek světelné fáze. V imunoreaktivitě těchto vzorků nebyly zaznamenány žádné rozdíly.



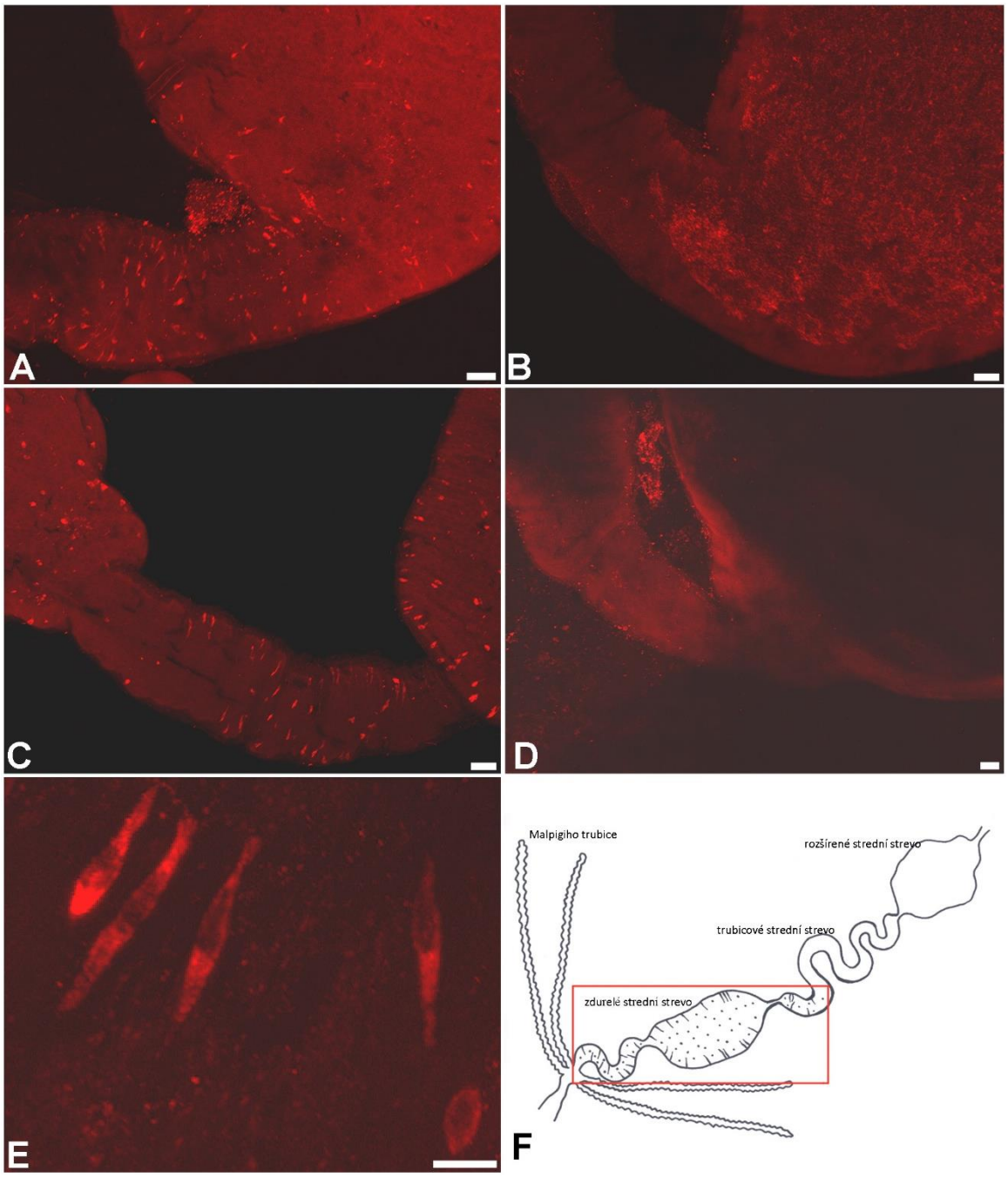
Obr. 18: Schematická rekonstrukce neuronů značených anti TEFLa protilátkou v hlavovém gangliu dospělce ploštice *P. apterus*. *CA* corpora allata, *De* deutocerebrum, *OG* jícen, *OL* optický lalok, *Pr* protocerebrum, *SOG* subesophageální ganglium, *Tr* tritocerebrum.



Obr. 19: TEFLa imureaktivní neurony v hlavovém gangliu dospělce ploštice *P. apterus* sebraných v ZT 8-10. **(A, B)** Dva různé pohledy na TEFLa imunoreaktivitu v celém hlavovém gangliu. **(C)** Záběr na začátek nervové pásky s prvním thorakálním gangliem (TG1) a druhým thorakálním gangliem (TG2). **(D-F)** Detailní záběry na obě mozkové hemisféry a podjícnové ganglium (D), TG1 (E) a TG2 (F). Šipky značí skupinu posteriodorzálních neuronů. Hlavy šipek znázorňují laterální neurony. Hvězdičky ukazují laterální neurony deutocerebra. Černé šipky značí frontální neurony tritocerebra. Černé hlavy šipek označují neurony při anteriorním povrchu protocerebra. **(E)** Detailní zobrazení pozitivního anti TEFLa signálu v TG1. **(F)** Detailnější pohled na TEFLa imunoreaktivitu v TG 2. *CA* corpora allata, *OG* jícen, *OL* optický lalok, *SOG* subesophageální ganglium. Měřítko je 50 µm.

Imunoreaktivita s anti-TEFLa protilátkou ve střevě dospělce

Na základě výsledků obdržených z RT-PCR, které mapují transkripční aktivitu genu *tefla*, byla kromě lokalizace TEFLa pozitivního signálu v centrální nervové soustavě, provedena i imunodetekce TEFLa antigenu ve střevě a gonádách dospělce. Protilátka proti



Obr. 20: Imunoreaktivita TEFLa v posteriórní části středního střeva dospělce *P. apterus.* **(A, C, E)** Záběr na počátek zduřeliny střev sebraných v čase ZT 8-10 ze samice (A) a samce (C, E). **(B, D)** Stejná oblast střeva ze vzorků sebraných v čase ZT 23-1 ze samice (B) a samce (D). **(F)** Schematické znázornění celého střeva, červený rámeček ukazuje oblast s imunoreaktivními buňkami. Měřítko v obrázku A-D je 50 µm, v obrázku E je 10 µm.

neuropeptidu TEFLa značila velké množství buněk ležících v povrchové vrstvě celého úseku posteriorní části středního střeva zahrnující i baňatou zduřelinu, která je typická pro tuto část střeva (Obr. 20). Velké množství imunoreaktivních buněk se soustředilo především v oblasti rozšíření a zúžení této zduřeliny. Všechny buňky měly stejnou velikost a vřetenovitý tvar. Imunoreaktivita byla zaznamenána ve střevech samců i samic a u obou pohlaví vykazovala cirkadiánní změny. Zatímco v čase ZT 8-10 byla zaznamenána výrazná reakce, v čase ZT 23-1 nebyl zaznamenán žádný signál. Imunodetekce TEFLa antigenu neodhalila žádný pozitivní signál v samčích ani v samičích pohlavních orgánech.

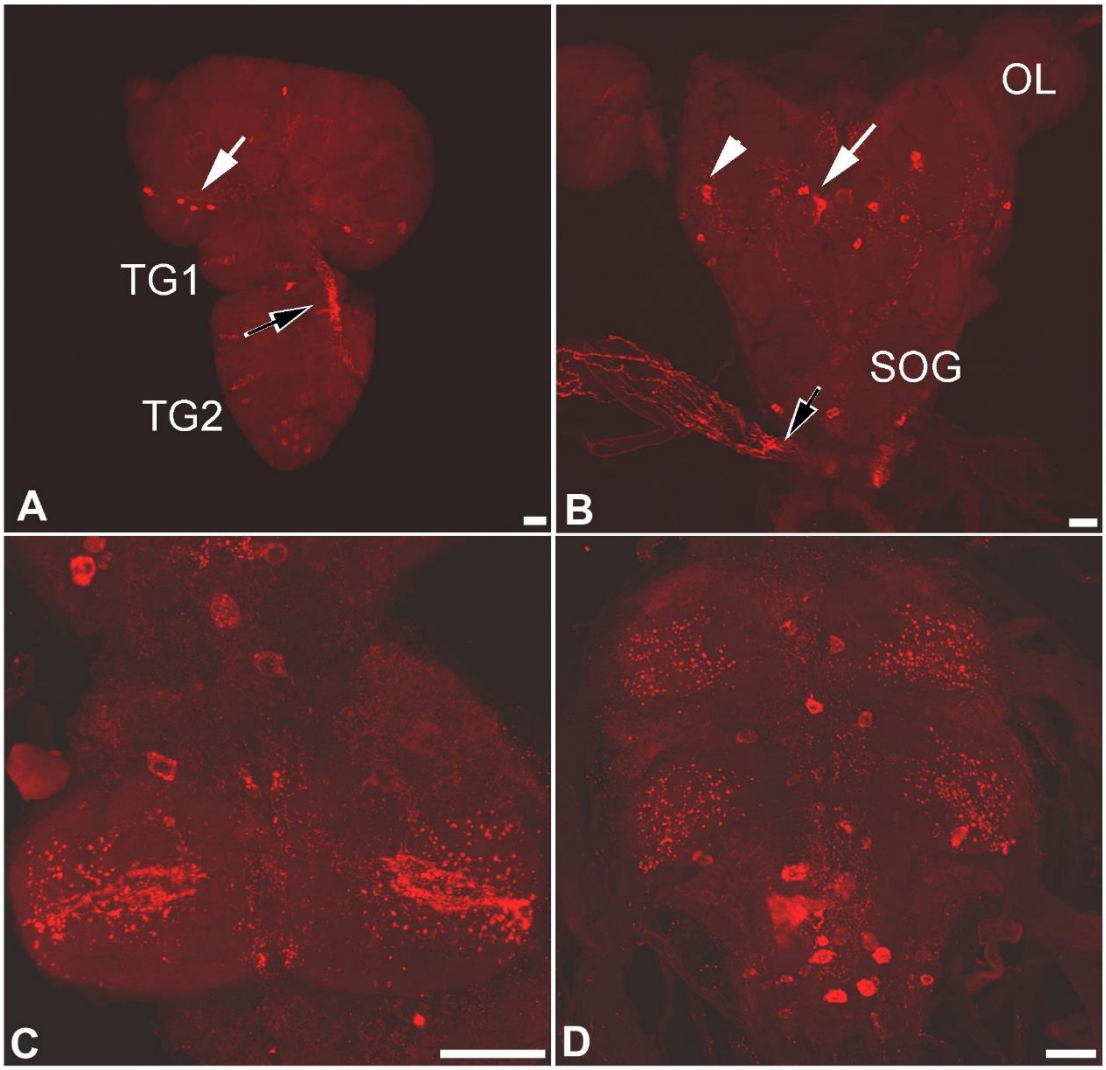
Imunoreaktivita s anti-TEFLa protilátkou v hlavovém gangliu nymf

Výskyt peptidu TEFLa byl mapován i z vývojového hlediska, a to v hlavových gangliích nymf starých 2 a 4 dny. Pozitivní signál v mozku i ventrálním gangliu byl znamenán již u nymf starých 2 dny (Obr. 21A). Výrazně značena je skupina 4 neuronů ležících v každé hemisféře centrálního mozku odpovídající pravděpodobně posteriodorzálním neuronům dospělce, o čemž svědčí i přítomnost intenzivně značených nervových vláken směřujících na povrch jícnu. V posteriorní části ventrálního ganglia leží skupina asi deseti slabě značených neuronů a tři bilaterální svazky nervových vláken směřují vertikálně k vývodům laterálních nervů (Obr. 21A).

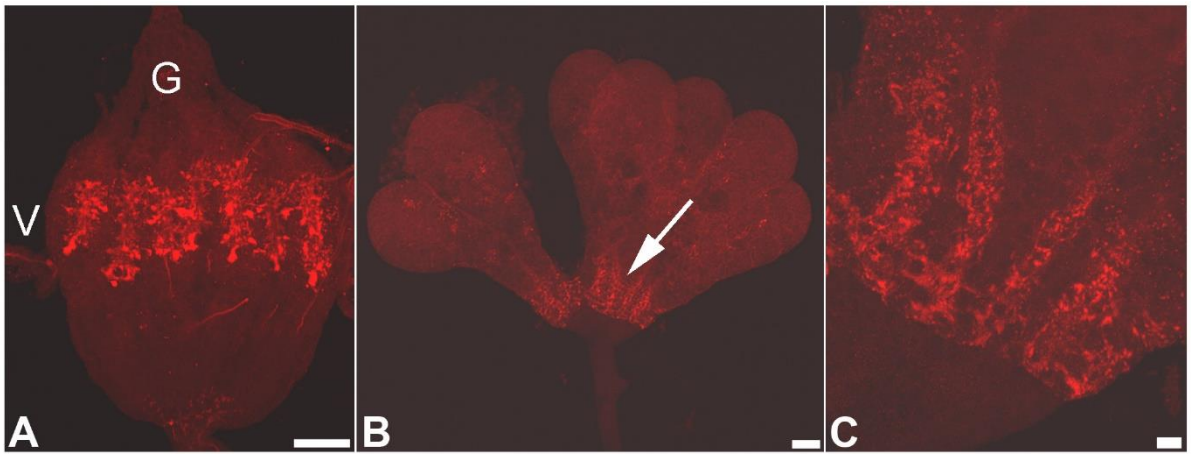
Charakter imunoreaktivního signálu v hlavových gangliích čtyřdenních nymf vykazuje podobnost s imunoreaktivitou popsanou u dospělců s tím rozdílem, že síť nervových procesů v centrálním mozku je výrazně řidší. Výrazný signál byl zaznamenán ve skupině dorzálních neuronů, laterálních neuronů, na laterální a dorzomediální oblasti ventrálního ganglia. Neurohemální orgán nymf obou věkových skupin nevykazuje pozitivní reakci (Obr. 21 B-D).

Imunoreaktivita s anti-TEFLa protilátkou v gonádách nymf

Zatímco v gonádách dospělce nebyl zaznamenán TEFLa pozitivní signál, pravděpodobně vlivem špatné prostupnosti protilátky přes povrchové obaly vaječníků a varlat, u čtyřdenních nymf byl intenzivní signál zaznamenán v cytoplazmě vyvíjejícího se oocytu vitelária meroistických telotrofních vaječníků (Obr. 22A). Folikulární buňky ani germárium neobsahovaly žádný pozitivní signál. U varlat byl pozitivní signál nalezen v povrchovém epitelu báze folikulů při jejich ústí do sběrného kanálku přecházejícího v chámovod (Obr. 22 B, C). U dvoudenních nymf imunodetekce TEFLa peptidu nebyla provedena vzhledem k obtížnosti jejich identifikace během pitvy. Tkáně byly již příliš malé.



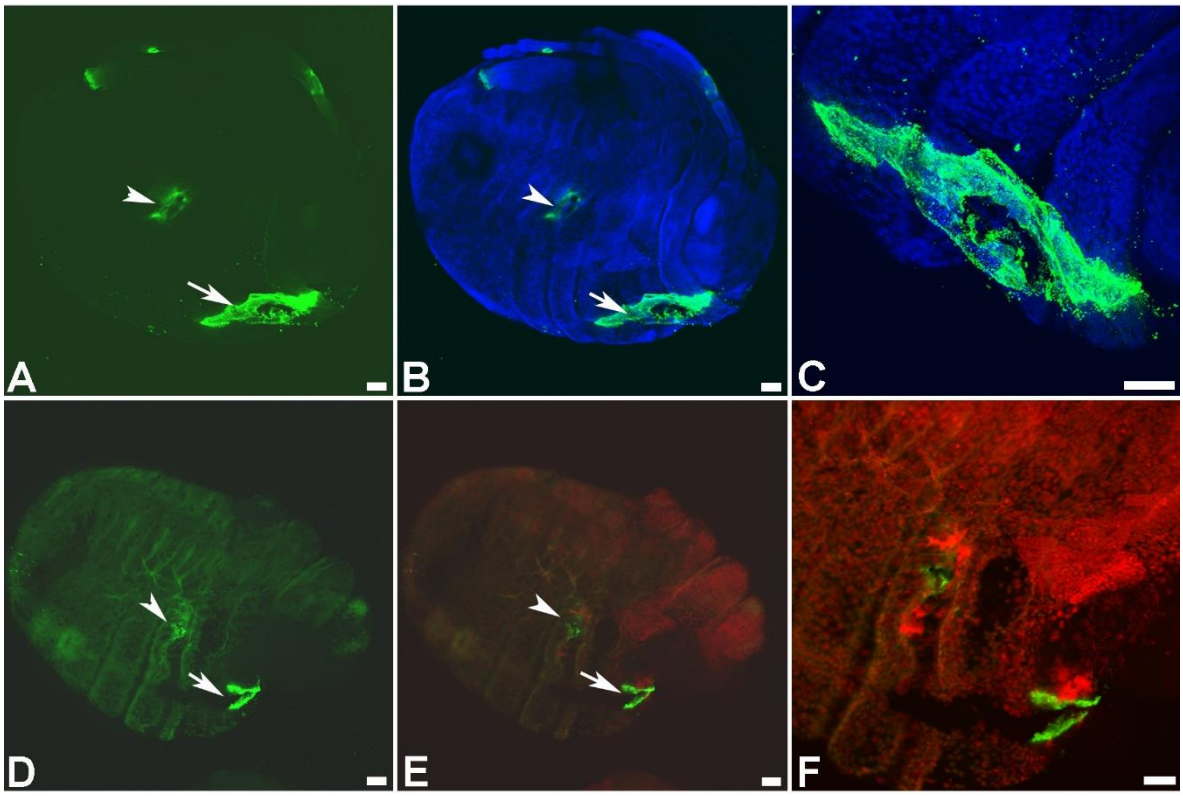
Obr. 21: TEFLa imunoreaktivita v hlavovém gangliu u nymf *P. apterus*. **(A)** Hlavové ganglium dvoudenní nymfy. **(B)** Hlavové ganglium čtyřdenní nymfy. **(C)** První thorakální ganglium čtyřdenní nymfy. **(D)** Druhé thorakální ganglium čtyřdenní nymfy. Šipky značí posteriodorzální skupinu neuronů, hlava šipky laterální skupinu neuronů, černé šipky značí nervové procesy vedoucí k laterálním nervům vybíhajícím z ventrálního ganglia. *OL* optický lalok, *SOG* subesophageální ganglium, *TG1* thorakální ganglium 1, *TG2* thorakální ganglium 2. Měřítko je 50 µm.



Obr. 22: TEFLa imunoreaktivita v gonádách čtyřdenních nymf *P. apterus.* **(A)** Pozitivní signál v cytoplazmě vyvíjejících se oocytů ve viteláriu. **(B, C)** Dvě rozdílná zvětšení zachycující pozitivní signál v povrchovém epitelu báze folikulů varlat. Šipka značí signál v bázi folikulů. *G* germárium, *V* vitelárium. Měřítko je 50 µm, u obrázku C je 10 µm.

Imunoreaktivita s anti-TEFLa protilátkou v embryích

Vzhledem k tomu, že peptid TEFLa byl detekován již ve dvoudenních nymfách, bylo rovněž přikročeno k testování embryonálního vývoje. TEFLa imunoreaktivita byla testována u embryí starých 1, 3, a 5 dní. Jednodenní a třídenní embrya nevykazovala žádný pozitivní signál. V pětidenních embryích, u kterých již byla pozorována segmentace těla a základy končetin, byl TEFLa peptid lokalizován na dorzální straně hlavové oblasti embrya (Obr. 23). Vzhledem k umístění a charakteru signálu lze usuzovat, že se jedná o okraj uzavírajícího se amnionového obalu embrya. Slabší signál nacházející se ve střední části embrya je pravděpodobně lokalizován v oblasti střeva.



Obr. 23: TEFLa imunoreaktivita v 5. dni embryonálního vývoje *P. apterus*. **(A, D)** Imunodetekce TEFLa neuropeptidu v celém embryu. **(B, C)** Kombinace TEFLa signálu s jádry značenými DAPI ukázaná v celém embryu (B) a detailním záběru (C). **(E, F)** Kombinace TEFLa signálu s jádry značenými propidium jodidem ukázaná v celém embryu (E) a detailním záběru (F). Šipka ukazuje pozitivní signál v oblasti uzavírajícího se amnionu. Hlava šipky signál v oblasti střeva. Měřítko je 50 μm.

6.3. Diskuze

Peptid TEFLa byl detekován v desítkách imunoreaktivních buněk v rámci celého hlavového ganglia dospělce. Obzvláště silně jsou bilaterálně značeny 4 neurony posteriodorzální, 3 neurony v laterální oblasti protocerebra, 4 párové neurony v laterální oblasti a 2 dvojice neuronů v dorzální oblasti podjícnového ganglia. Přítomnost peptidu TEFLa v centrální nervové soustavě potvrzuje předpoklad, že se jedná o neuropeptid. Výskyt posteriodorzálních a laterálních neuronů ve 2. a 4. dni larválního vývoje ukazuje, že by mohl tento neuropeptid hrát významnou roli během celého larválního vývoje. U nymf byl tento peptid rovněž detekován v gonádách, a to ve vyvíjejících se oocytech vaječníků a na povrchovém epitelu báze folikulů varlat. Exprese TEFLa proteinu byla zaznamenána také v pátém dnu embryonálního vývoje, a to v oblasti kde dochází k uzavírání amnionového obalu embrya.

U dospělců bylo nalezeno množství TEFLa imunoreaktivních buněk v posteriorní části středního střeva. Všechny buňky nalezené ve střevě mají vřetenovitý tvar. S ohledem na morfologii a pozice buněk v povrchové vrstvě středního střeva lze usuzovat, že se jedná o sekretorické buňky, které jsou typické pro tuto danou oblast střeva. V těchto buňkách byly zaznamenány rozdíly v distribuci TEFLa signálu mezi dnem a nocí, což svědčí o tom, že exprese genu je regulována cirkadiánními rytmy. Přítomnost signálu byla zjištěna pouze během dne.

Poměrně rozsáhlá distribuce peptidu TEFLa v rámci různých vývojových stádií počínaje 5. dnem embryonálního vývoje a konče dospělým jedincem, svědčí o možném zapojení tohoto neuropeptidu v řadě regulačních mechanismů během procesů vývoje.

Specificita použité protilátky byla ověřena imunohistochemicky záměnou primární protilátky za kozí sérum. Preimunní sérum bohužel nebylo k dispozici, nicméně v současné době je generována mutantní linie s nulovou expresí tohoto peptidu, která bude využita pro finální kontrolu specificity obdržených pozitivních signálů.

7. Závěr

V rámci mé bakalářské práce se mi podařilo zdokonalit techniku snímání bioluminiscenčního signálu v mozcích hmyzu. Vyvinula jsem metodiku, pomocí které lze sledovat změnu v expresi studovaných genů na úrovni jediné buňky. Naučila jsem se ovládat poměrně unikátní mikroskop LuminoView 200, a to za pomocí hned několika softwarů (Xcellence, MicroManager a MetaMorph). Do budoucna bych chtěla zdokonalit přípravu vzorků tak, abych snížila mortalitu měřených tkání způsobenou jednak vlivem mechanického poškození tkáně během pitvy, a jednak bakteriální kontaminací média a tím prodloužila délku snímání signálu. Program MetaMorph bych chtěla použít k současnému snímání bioluminiscence z několika vrstev ostrosti v rámci jedné tkáně, což například při studiu cirkadiánních rytmů hmyzu umožní získat komplexní představu o oscilaci genového produktu ve všech neuronech centrálního hodinového oscilátoru. V rámci studia kontroly cirkadiánních rytmů pomocí periodických změn teploty, kdy je pro bezchybný chod centrálního oscilátoru důležitý signál z periferních chordotonálních orgánů, bych se chtěla pokusit o snímání bioluminiscence z mozku intaktního organismu.

Dále se mi podařilo lokalizovat nově objevený neuropeptid TEFLa v jednotlivých vývojových stádiích ploštice *P. apterus*. Tím jsem získala dílčí informace, které poslouží v dalším výzkumu ke stanovení jeho možné funkce v organismu. Mé výsledky ukazují, že se tento neuropeptid uplatňuje od konce embryonálního vývoje přes vývoj larvální až do dospělosti, a ve střevech dospělce je jeho exprese pod kontrolou cirkadiánních rytmů.

Techniku imunohistochemické detekce proteinů a metodu snímání bioluminiscence, ve kterých jsem se během obou výše zmíněných studií zdokonalila, využiji při mé další práci v rámci Střediska histologie a mikroskopie, Entomologického ústavu, Biologického centra Akademie věd, České republiky a zejména pak v mém magisterském projektu, který se bude týkat imunodetekce receptoru nukleosidových transportérů a růstových faktorů v adenosinové signální dráze u *D. melanogaster*.

8. Seznam zkratek

5-s-LNv	pátý malý ventrolaterální neuron
AKH	adipokinetický hormon
AP	alkalická fosfatáza
BamH1	název restrikčního enzymu
BCID	5-bromo-4-chloro-3-indol fosfát
CA	*corpora allata*
CC	*corpora cardiaca*
cca	cirka, přibližně
CCD kamera	charge-coupled-device kamera
clk	*clock* gen
CLK	CLOCK protein
cry	*cryptochrome* gen
CRY	CRYPTOCHROME protein
CT	cirkadiánní čas
cyc	*cycle* gen
CYC	CYCLE protein
DAB	3´, 3´ - diamiobenzidin tetrahydrochlorid
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
dbt	*doubletime* gen
DBT	DOUBLETIME protein
De	deutocerebrum
DN 1,2,3	dorzální neurony 1, 2, 3
EcoR1	název restrikčního enzymu
EM-CCD kamera	electron multiplying-charge coupled device kamera
Fluc	světlušší luciferáza
G	germarium
GFP	zelený fluorescentní protein
HRP	křenová peroxidáza

kB	kilobáze
kDa	kiloDalton
LED	elektroluminiscenční dioda
l-LNv	velké ventrolaterální neurony
LNd	dorzolaterální neurony
LNv	ventrolaterální neurony
LPN	posteriolaterální neurony
LUCPLFLN	long universal culture plan fluorite new
LV 200	LuminoView 200
NA	numerická apertura
NaClO	chlornan sodný
NBT	modré tetrazolium
Neil1	název restrikčního enzymu
OG	jícen
OL	optický lalok
OTIRFM	oil total internal reflection fluorescence microscopy
PB	fosfátový pufr
PB-T	fosfátový pufr s tritonem
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDF	pigment disperzní faktor
PDF-RFP	pigment disperzní faktor – červený fluorescentní protein
per	*period* gen
PER	PERIOD protein
PLAPON	plan apochromatic
Pr	protocerebrum
RFP	červený fluorescentní protein
ROI	oblast zájmu
SCN	suprachiasmatické jádro
sgg	*shaggy* gen

SGG	SHAGGY protein
s-LNv	malé ventrolaterální neurony
SOG	subesophageální ganglium
TG 1, 2	thorakální ganglium 1, 2
tim	*timeless* gen
TIM	TIMELESS protein
Tr	tritocerebrum
UPLSAPO	universal plan super apochromate oil
UV	ultrafialový
V	vitelárium
ZT	Zeitgeber

9. Seznam použité literatury

AVCI Pinar, Mahdi KARIMI, Magesh SADASIVAM, Wanessa C. ANTUNES-MELO, Elisa CARRASCO a Michael R. HAMBLIN. In-vivo monitoring of infectious diseases in living animals using bioluminescence imaging. *Virulence*. 2018, **9**(1), 28-63. DOI: 10.1080/21505594.2017.1371897. ISSN 2150-5594. Dostupné také z: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2017.1371897

BROCK Matthias, Grégory JOUVION, Sabrina DROIN-BERGERE, Olivier DUSSURGET, Marie-Anne NICOLA, Oumaïma IBRAHIM-GRANET. Bioluminescent Aspergillus fumigatus, a New Tool for Drug Efficiency Testing and In Vivo Monitoring of Invasive Aspergillosis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, **74**(22), 7023-7035. DOI: 10.1128/AEM.01288-08. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.01288-08

DE WET Jeffrey R., Keith V. WOOD, Marlene DELUCA, Donald R. HELINSKI, Suresh SUBRAMANI. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Molecular and Cellular Biology*. 1987, **7**(2), 725-737. DOI: 10.1128/MCB.7.2.725. ISSN 0270-7306. Dostupné také z: http://mcb.asm.org/lookup/doi/10.1128/MCB.7.2.725

DUBRUILLE Raphaelle, Patrick EMERY. A Plastic Clock: How Circadian Rhythms Respond to Environmental Cues in Drosophila. *Molecular Neurobiology*. 2008, **38**(2), 129-145. DOI: 10.1007/s12035-008-8035-y. ISSN 0893-7648. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s12035-008-8035-y

EVANS Melanie S., Joanna P. CHAURETTE, Spencer T. ADAMS, Gadarla R. REDDY, Miranda A. PALEY, Neil ARONIN, Jennifer A. PRESCHER a Stephen C. MILLER. A synthetic luciferin improves bioluminescence imaging in live mice. *Nature Methods*. 2014, **11**(4), 393-395. DOI: 10.1038/nmeth.2839. ISSN 1548-7091. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/nmeth.2839

GRIMA Brigitte, Elisabeth CHÉLOT, Ruohan XIA, François ROUYER. Morning and evening peaks of activity rely on different clock neurons of the Drosophila brain. *Nature*. 2004, **431**(7010), 869-873. DOI: 10.1038/nature02935. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/nature02935

HARDIN Paul E., Jeffrey C. HALL, Michael ROSBASH. Feedback of the Drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature*. 1990, **343**(6258), 536-540. DOI: 10.1038/343536a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/343536a0

HATTORI Mitsuru, Genki KAWAMURA, Ryosuke KOJIMA, Mako KAMIYA, Yasuteru URANO, Takeaki OZAWA. Confocal Bioluminescence Imaging for Living Tissues with a Caged Substrate of Luciferin. *Analytical Chemistry*. 2016, **88**(12), 6231-6238. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04142. ISSN 0003-2700. Dostupné také z: http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.5b04142

HELFRICH-FÖRSTER Charlotte, Tara EDWARDS, Kouji YASUYAMA, Barbara WISOTZKI, Stephan SCHNEUWLY, Ralf STANEWSKY, Ian A. MEINERTZHAGEN, Alois HOFBAUER. The Extraretinal Eyelet of Drosophila: Development, Ultrastructure, and Putative Circadian Function. *The Journal of Neuroscience*. 2002, **22**(21), 9255-9266. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-21-09255.2002. ISSN 0270-6474. Dostupné také z: http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.22-21-09255.2002

KANEKO Maki, Charlotte HELFRICH-FÖRSTER, Jeffrey C. HALL. Spatial and Temporal Expression of the period and timeless Genes in the Developing Nervous System of Drosophila: Newly Identified Pacemaker Candidates and Novel Features of Clock Gene Product Cycling. *The Journal of Neuroscience*. 1997, **17**(17), 6745-6760. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.17-17-06745.1997. ISSN 0270-6474. Dostupné také z: http://www.jneurosci.org/lookup/doi/10.1523/JNEUROSCI.17-17-06745.1997

KARSI Attila, Kevin HOWE, Tasha B. KIRKPATRICK, Robert WILLS, Hartford BAILEY, Mark L. LAWRENCE. Development of bioluminescent Salmonella strains for use in food safety. *BMC Microbiology*. 2008, **8**(1). DOI: 10.1186/1471-2180-8-10. ISSN 1471-2180. Dostupné také z: http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-8-10

KODRÍK Dalibor, Radomír SOCHA, Petr ŠIMEK, Rostislav ZEMEK, Graham J. GOLDSWORTHY. A new member of the AKH/RPCH family that stimulates locomotory activity in the firebug, Pyrrhocoris apterus (Heteroptera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 2000, **30**(6), 489-498. DOI: 10.1016/S0965-1748(00)00025-4. ISSN 09651748. Dostupné také z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0965174800000254

KONOPKA Ronald J., Seymour BENZER. Clock Mutants of Drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1971, **68**(9), 2112-2116. DOI: 10.1073/pnas.68.9.2112. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.68.9.2112

LORENZ Walter W., Richard O. MCCANN, Mat LONGIARU, Milton J. CORMIER. Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991, **88**(10), 4438-4442. DOI: 10.1073/pnas.88.10.4438. ISSN 0027-8424. Dostupné také z: http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.88.10.4438

MAOZ Ariel, Ralf MAYR, Geraldine BRESOLIN, Klaus NEUHAUS, Kevin P. FRANCIS, Siegfried SCHERER. Sensitive In Situ Monitoring of a Recombinant Bioluminescent Yersinia enterocolitica Reporter Mutant in Real Time on Camembert Cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002, **68**(11), 5737-5740. DOI: 10.1128/AEM.68.11.5737-5740.2002. ISSN 0099-2240. Dostupné také z: http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.68.11.5737-5740.2002

MENDOZA-VIVEROS Lucia, Pascale BOUCHARD-CANNON, Sara HEGAZI, Arthur H. CHENG, Stephen PASTORE, Hai-Ying M. CHENG. Molecular modulators of the circadian clock: lessons from flies and mice. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2017, **74**(6), 1035-1059. DOI: 10.1007/s00018-016-2378-8. ISSN 1420-682X. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s00018-016-2378-8

MORCIANO Giampaolo, Alba C. SARTI, Saverio MARCHI. Use of luciferase probes to measure ATP in living cells and animals. *Nature Protocols*. 2017, **12**(8), 1542-1562. DOI: 10.1038/nprot.2017.052. ISSN 1754-2189. Dostupné také z: http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2017.052

NITABACH Michael N., Paul H. TAGHERT. Organization of the Drosophila Circadian Control Circuit. *Current Biology*. 2008, **18**(2), R84-R93. DOI: 10.1016/j.cub.2007.11.061. ISSN 09609822. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982207023470

PILORZ Violetta, Charlotte HELFRICH-FÖRSTER, Henrik OSTER. The role of the circadian clock system in physiology. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2018, **470**(2), 227-239. DOI: 10.1007/s00424-017-2103-y. ISSN 0031-6768. Dostupné také z: http://link.springer.com/10.1007/s00424-017-2103-y

RIBATTI Domenico. Edelman's view on the discovery of antibodies. *Immunology Letters*. 2015, **164**(2), 72-75. DOI: 10.1016/j.imlet.2015.02.005. ISSN 01652478. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016524781500022X

ROBERTS Logan, Tanya L. LEISE, Takako NOGUCHI, Alexis M. GALSCHIODT, Jerry H. HOUL, David K. WELSH, Todd C. HOLMES. Light Evokes Rapid Circadian Network Oscillator Desynchrony Followed by Gradual Phase Retuning of Synchrony. *Current Biology*. 2015, **25**(7), 858-867. DOI: 10.1016/j.cub.2015.01.056. ISSN 09609822. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982215000883

SEHADOVA Hana, Franz T. GLASER, Carla GENTILE, Alekos SIMONI, Astrid GIESECKE, Joerg T. ALBERT, Ralf STANEWSKY. Temperature Entrainment of Drosophila's Circadian Clock Involves the Gene nocte and Signaling from Peripheral Sensory Tissues to the Brain. *Neuron*. 2009, **64**(2), 251-266. DOI: 10.1016/j.neuron.2009.08.026. ISSN 08966273. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627309006382

STANEWSKY Ralf, Maki KANEKO, Patrick EMERY, Bonnie BERETTA, Karen WAGER-SMITH, Steve A. KAY, Michael ROSBASH, Jeffrey C. HALL. The cryb Mutation Identifies Cryptochrome as a Circadian Photoreceptor in Drosophila. *Cell*. 1998, **95**(5), 681-692. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81638-4. ISSN 00928674. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400816384

TAMURA Yasuhisa, Kumi TAKATA, Asami EGUCHI, Yosky KATAOKA. In vivo monitoring of hair cycle stages via bioluminescence imaging of hair follicle NG2 cells. *Scientific Reports*. 2018, **8**(1). DOI: 10.1038/s41598-017-18763-3. ISSN 2045-2322. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/s41598-017-18763-3

YOSHII Taishi, Yoshihiro HESHIKI, Tadashi IBUKI-ISHIBASHI, Akira MATSUMOTO, Teiichi TANIMURA, Kenji TOMIOKA. Temperature cycles drive Drosophila circadian oscillation in constant light that otherwise induces behavioural arrhythmicity. *European Journal of Neuroscience*. 2005, **22**(5), 1176-1184. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.04295.x. ISSN 0953816X. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1460-9568.2005.04295.x

ZENG Hongkui, Zuwei QIAN, Michael P. MYERS, Michael ROSBASH. A light-entrainment mechanism for the Drosophila circadian clock. *Nature*. 1996, **380**(6570), 129-135. DOI: 10.1038/380129a0. ISSN 0028-0836. Dostupné také z: http://www.nature.com/articles/380129a0

10. Příloha

Studium morfologie jedové žlázy lumčíka *Habrobracon hebetor*

Morfologie jedové žlázy lumčíka *Habrobracon hebetor*

Úvod

Endoparazitická vosička, lumčík *Habrobracon hebetor* (řád Hymenoptera, čeleď Braconidae, podčeleď Braconinae), zajišťuje zdárný vývoj svého potomstva nakladením vajíček na povrch těla larev hostitele, kterými jsou zejména larvy různých druhů Lepidopter, jako je *Ephestia, Plodia* nebo *Galleria* (Beard a kol. 1952). Ke znehybnění hostitele využívá jed, který způsobuje nervosvalovou paralýzu a zastavení vývoje hostitele. V současné době je studována interakce vosičkového jedu a hmyzích adipokinetických hormonů (AKH). Tyto hormony patří k nejlépe prostudované skupině hmyzích neuropeptidů, k jejichž syntéze dochází v neurosekretorických buňkách *corpora cardiaca* (CC). AKH se podílí na regulaci řady fyziologických procesů jako je mobilizace energetických zdrojů (lipidů, glycidů a prolinu), růst, svlékání, reprodukce, diapauza (Gäde 1990). Tyto hormony se označují jako stresové hormony, které inhibují anabolické pochody a stimulují procesy produkující energii (Kodrík 2008). V případě další potřeby regulují stresové reakce, které eliminují nebo zmírňují dopady stresu na organismus. Bylo prokázáno, že AKH zmírňuje účinky působení vosičkového jedu v těle hostitele (Shaik 2017). Ve svalové tkáni testovaných organismů (octomilky *Drosophila melanogaster*, ploštice *Pyrrhocoris apterus*) způsobuje jed značné morfologické změny. V případě aplikace AKH spolu s jedem nebyly tyto změny ve svalové tkáni pozorovány (Kodrík nepublikovaná data). Kromě studia účinku jedu vědce zajímá i způsob jakým je jed v jedové žláze tvořen. Morfologie struktury jedové žlázy Hymenopter vykazují vysokou variabilitu, dokonce i mezi zástupci jedné čeledi, proto byla studována její struktura přímo u druhu vosičky *Habrobracon hebetor*.

Materiál a metody

Totální preparáty

Z organismů anestetizovaných CO_2 byly vypitvány orgány ve sterilním fosfátovém pufru (PB) a následně byly fixovány ve 4% paraformaldehydu 1 h při pokojové teplotě. Pak byly vypitvané tkáně promývány v PB (4x 15 min) a umístěny do černých keramických misek vhodných pro zobrazení. Stereomikroskopem (Olympus SZX12) vybaveným CCD kamerou (Olympus DP50) byly pořízeny snímky tkáně s různým proostřením v ose Z a složeny do jednoho obrazu v softwaru Adobe Photoshop (Adobe systems). Poté byly tkáně zality do média Fluoroshield s DAPI (Sigma), překryty krycím sklem a zobrazovány pomocí konfokálního mikroskopu (Olympus FV 1000).

Paraplastové řezy

Nejprve se celá vosička anestetizovala a fixovala 10 min v Bouin-Hollande-sublimátu (BHS). Pak se z vosičky vypreparovaly studované tkáně, které se nechaly fixovat v čistém BHS ve 4 °C přes noc. Pro vymytí fixáže sloužil 70% ethanol, který se vždy po 30 min vymněnil za čistý. To bylo opakováno několikrát. K odvodnění tkáně byla použita vzestupná ethanolová řada (96%, 100% ethanol vždy 2x 20 min). Nakonec byly vzorky vloženy do 100% chloroformu (Penta) na 2x 20 min a po odsátí roztoku byly přemístěny do plastových mističek, ve kterých byly zality roztaveným parafinem. Tyto mističky byly vloženy do vákuové pícky rozpálené na 60 °C a ponechaly se zde přes noc. V této fázi rozehřátý parafin pronikl do tkání a prosytil veškeré struktury. Další den byly tkáně naorientovány a nechány polymerizovat 2 h v pokojové teplotě. Takto zpolymerizované bločky byly nakrájeny na mikrotomu na tloušťku 7 μm a řezy byly kladeny na čistá sklíčka pokryta několika kapkami destilované vody. Zaplněné sklíčko řezy bylo opatrně přemístěno na pícku rozehřátou na 45 °C. Po zahřátí destilované vody se začal nahřívat parafin, a tím se pásky napínaly na celé sklíčko. Následně se voda odsála a sklíčka se nechala vychladnout. Pro zbavení přebytečné vody, která v řezech mohla zůstat, se sklíčko přitisklo na kapesník a silnějším tlakem byla voda vytlačena. Pro dokonalé přilnutí řezů ke sklíčku se vysušené preparáty nechaly na pícce ještě 48 h.

Malloryho barvení

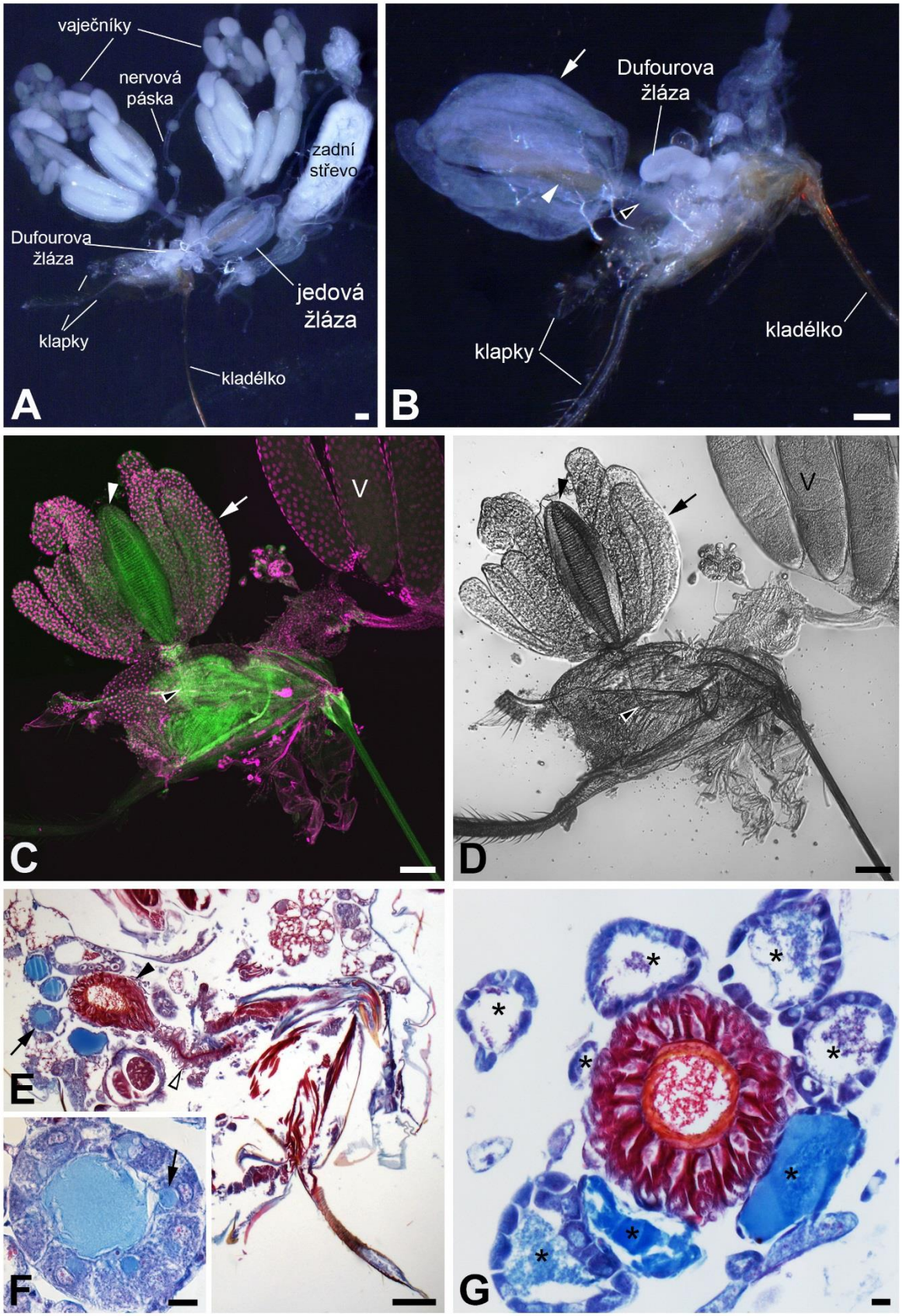
Pro obarvení vzorků byly řezy odparafinovány xylenem (Penta), ve kterém byly 2x 10 min. K zavodnění sloužila sestupná alkoholová řada (96% a 70% ethanol každý po 5 min). Poté byly řezy promývány 5 min v destilované vodě, ze které byly přemístěny do roztoku Biebrich scarlet-acid fuchsin (Sigma), kde byly ponechány 3 min. Dále byly řezy znovu promyty 5 min v destilované vodě, a pak byly ponořeny 5 min v 10% roztoku kyseliny fosfomolybdenové (Sigma). Po této době byly vzorky znovu propláchnuty destilovanou vodou a přemístěny do posledního roztoku anilinové modři (Sigma), kde byly 4 min. Po důkladném opláchnutí destilovanou vodou byly vzorky dehydrovány ethanolovou řadou (70%, 96% a 100% etanolu v každém 3 min). Před zamontováním byly obarvené preparáty ponořeny do xylenu (Penta) na 2x 5 min. K zamontování sloužilo DPX Mountant pro histologii (Fluka). Zhotovené preparáty byly prohlíženy mikroskopem Axioplan 2 (Zeiss) vybaveným CCD kamerou (Olympus DP73).

Výsledky

Morfologie jedové žlázy

Struktura jedové žlázy byla studována různými histologickými technikami, jak na totálních preparátech, tak na paraplastových řezech. Žlázy byly vypitvány společně s přilehlými orgány a jejich morfologie byla zkoumána a dokumentována stereomikroskopem a konfokálním mikroskopem. Pro lepší orientaci byla buněčná jádra obarvena DAPI. Ke studiu vnitřních struktur byly využity paraplastové řezy obarvené Malloryho technikou.

Kombinací všech použitých technik bylo zjištěno, že jedová žláza je tvořena asi 10 jedovými váčky trubicovitého tvaru, které obklopují velký svalnatý orgán ústící do primárního jedového kanálku (Obr. P1). Jedové váčky rovněž vstupují do primárního jedového kanálku, a to do jeho anteriorní části. Kanálek se posteriorně otevírá do vejcovodu a jed je tak posouván směrem ke kladélku, které má také funkci žihadla. Na příčném řezu jedovým váčkem lze pozorovat velké sekretorické buňky ležící v jeho obvodové vrstvě (Obr. P1F). V jejich cytoplazmě se nachází vezikuly obsahující jed, který je pomocí endocytózy transportován do lumenu váčku (černá šipka v Obr. P1F). Tento jed byl Malloryho trichromem zbarven do modra, zatímco svalovina a vnitřní obsah rezervoáru se barvil do červena. Na podélném řezu primárním jedovým kanálkem (bílá hlava šipky Obr. P1E), lze pozorovat, že je pokryt sekretorickými vezikuly, které obsahují bezbarvý produkt.



Obr. P1: Morfologie jedové žlázy lumčíka *Habrobracon hebetor*. **(A, B)** Totální preparát jedové žlázy s okolními tkáněmi. Asi 10 trubicovitých jedových váčků (*šipka*) obklopujících svalnatý orgán (*hlava šipky*) a vyusťující do primárního jedového kanálku (*černá hlava šipky*). **(C, D)** Snímek z konfokálního

mikroskupu zachycující obraz fluorescence a obraz procházejícího světla: DAPI značení (*fialová*), autofluorescence (*zelená*): trubicovité váčky jedové žlázy (*šipka*), svalnatý orgán (*bílá hlava šipky (C*) a *černá hlava šipky* (D)), primární jedový kanálek (*černá hlava šipky bíle olemovaná*) a V (*vaječníky*). **(E-G)** Malloryho barvení na parafínových řezech lumčíkova zadečku zobrazuje podélný řez (E) nebo příčný řez (G) trubicovitých jedových váčků a svalnatého orgánu. Jednotlivé váčky jedové žlázy jsou označeny hvězdičkami. **(F)** Větší zvětšení obrázku příčného řezu jedového váčku, zobrazující vezikuly s jedem, které jsou transportovány do lumenu váčku (*černá šipka*). Měřítko je u A-E 100 μm a u F, G je 10 μm.

Diskuze

V rámci nadčeledi Ichneumonoidea byly zaznamenány velké odlišnosti ve struktuře jedové žlázy. Avšak obecně je tato žláza tvořena buď trubicovými nebo kulovitými váčky často rozvětvenými, které se otevírají přímo do rezervoáru jedu, který je propojen primárním jedovým kanálkem s bází kladélka. Dokonce i v rámci čeledi Braconidae byly pozorovány další rozdíly. Prvním rozdílem byly dva typy rezervoáru jedu, který měl v prvním případě masivní vrstvu podélné i cirkulární svaloviny se silnou vrstvou chitinózní výstelky, navíc byl inervovaný, což umožnilo regulovat dávku jedu. Druhý typ rezervoáru nebyl inervován, svalovina byla rozptýlena a výstelka měla slabší vrstvu chitinu (Edson a kol. 1982). U většiny ne-cyklostomických Braconidae a většiny Ichnemonidae bylo pozorováno, že se jedové žlázy otevírají do anteriorní části jedového rezervoáru, toto uspořádání se jeví být vývojově nejstarší (Quicke a kol. 2009). V podčeledi Braconinae, u některých cyklostomických druhů, jedové váčky ústí přímo do jedového kanálku vycházejícího z rezervoáru jedu, který obsahuje velké množství příčných a podélných svalových vláken a má silnou chitinózní výstelku. Často obsahuje i malé množství sekretorických buněk (Wan a kol. 2006). Dalším typickým znakem jedových žláz podčeledi Braconinae je pokrytí povrchu primárního jedového kanálku kulovitými sekretorickými vezikuly, které jsou vzájemně propojeny vrstvou chitinu. Sekret těchto vezikulů obsahuje komponenty, které intereagují s jedem tvořeným jedovými žlázami. Pravděpodobně slouží k aktivaci jedu až těsně před vstříknutím paralyzujícího jedu do hostitele.

Morfologie žlázy *H. hebetor* odpovídá kompozici pozorované u jiných druhů podčeledi Braconinae včetně přítomnosti kulovitých sekretorických vezikulů na povrchu jedových kanálků (Obr. P1E), rozdíly jsou pouze v tloušťce trubicových jedových žláz. Jed je hromaděn v rezervoáru, přestože jedové váčky ústí až do primárního jedového kanálku. Byla vyslovena domněnka, že se jed vrací zpět do rezervoáru proti svému toku. Na žádném

histologickém preparátu jsme však v rezervoáru nezaznamenali přítomnost jedu, typického pro jedové váčky, ale byl zde detekován sekret, který má pravděpodobně jiné složení vzhledem ke své barvitelnosti Malloryho trichromem. Z toho lze usuzovat, že se jed buď opravdu vrací do rezervoáru, aby se smísil s jiným typem sekretu, nebo je sekret produkovaný v rezervoáru pouze přidáván do jedu proudícího z jedových váčků do primárního jedového kanálku. Další možností je, že tento orgán zde neslouží jako zásobárna jedu, ale spíše jako svalnatá pumpa, jejíž kontrakcí je jed poháněn dále ke kladélku a vnitřní obsah rezervoáru je pouze pozůstatek odloučené intimy. Pro bližší posouzení je nutno prostudovat ultrastrukturu stěny rezervoáru, se zaměřením na identifikaci sekretorických buněk.

Použitá literatura

BEARD Raimond L. Insect Resistance to Insecticides. *Science*. 1952, **115**(2996), 608-609. DOI: 10.1126/science.115.2996.608. ISSN 0036-8075. Dostupné také z: http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.115.2996.608

EDSON Kathryn M., Margaret R. BARLIN, S. Bradleigh VINSON. Venom apparatus of braconid wasps: comparative ultrastructure of reservoirs and gland filaments. *Toxicon*. 1982, **20**(3), 553-562. DOI: 10.1016/0041-0101(82)90049-6. ISSN 00410101. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0041010182900496

GÄDE Gerd. The adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone peptide family: Structures, interrelationships and functions. *Journal of Insect Physiology*. 1990, **36**(1), 1-12. DOI: 10.1016/0022-1910(90)90145-6. ISSN 00221910. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022191090901456

KODRÍK Dalibor. Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology*. 2008, **33**(3), 171-180. DOI: 10.1111/j.1365-3032.2008.00625.x. ISSN 03076962. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3032.2008.00625.x

QUICKE Donald L. J., Nina M. LAURENNE, Mike G. FITTON, Gavin R. BROAD. A thousand and one wasps: a 28S rDNA and morphological phylogeny of the Ichneumonidae (Insecta. *Journal of Natural History*. 2009, **43**(23-24), 1305-1421. DOI: 10.1080/00222930902807783. ISSN 0022-2933. Dostupné také z: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00222930902807783

SHAIK Abdul H., Archana MISHRA, Dalibor KODRÍK. *Beneficial effect of adipokinetic hormone on neuromuscular paralysis in insect body elicited by braconid wasp venom*. 2017, **196**, 11-18. DOI: 10.1016/j.cbpc.2017.02.011. ISSN 15320456. Dostupné také z: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045617300510

WAN Zhi-Wei, Hai-Yan WANG, Xue-Xin CHEN. Venom apparatus of the endoparasitoid wasp Opius caricivorae Fischer (Hymenoptera: Braconidae). *Microscopy Research and Technique*. 2006, **69**(10), 820-825. DOI: 10.1002/jemt.20352. ISSN 1059910X. Dostupné také z: http://doi.wiley.com/10.1002/jemt.20352