

Bakalářská práce

Biologická fakulta Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích



Hledání rytmičnosti u larev mušky

Chymomyza costata

(Diptera: Drosophilidae).

Změny aktivity enzymů a transkripce genů.

Nikola Kudrnáčová

2007

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

Bakalářská práce

Kudrnáčová Nikola (2007): Hledání rytmičnosti u larev mušky *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae). Změny aktivity enzymů a transkripce genů. [Searching for rhythmicity in larvae of *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae). Changes in enzyme activities and gene expression. Bc. Thesis, in Czech], Faculty of Biological Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Circadian clocks allow organisms to anticipate daily changes in environmental factors and appropriately modify their physiological state. The photoperiodic clocks perceive seasonal change of day/night lengths, which signals for seasonally cycling deterioration of conditions for life. To understand photoperiodic clocks, we used circadian clocks physiological mechanism of which are better known. We searched for a physiological rhythm in the larvae of model organism, drosophilid fly, *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae). Wild strain (sensitive to photoperiod, rhythmic) and mutant strain (nonphotoperiodic, arrhythmic) were compared. Daily (circadian) rhythms in the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase, amylase activities and PCNA gene expression should serve as phenotype markers to compare rhythmicity in wild and mutant strains. No diurnal rhythmicity was found. We found a significant difference in the abundance of *pcna* mRNA transcripts between the larvae in direct development compared to those entering diapause.

Poděkování:

Děkuji především svému školiteli Vladimíru Košťálovi za ochotné rady, pomoc, podporu a trpělivost po celou dobu naší spolupráce, bez které by tato práce nemohla vzniknout. Mé poděkování patří i ostatním kolegům z Entomologického ústavu, kteří mi byli nápomocni.

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.

České Budějovice, duben 2007

.....
Nikola Kudrnáčová

Obsah

1. Úvod	4
1.1. cirkadiánní rytmy.....	4
1.2. sezónní cykly	6
1.3. souvislost sezónnosti s hodinami	6
1.4. modelový organizmus (<i>C. costata</i> , Diptera: Drosophilidae)	7
1.5. cíle práce	7
2. Metodika a materiál	8
2.1. chov much	8
2.2. synchronizace larev	8
2.3. experimentální varianty	9
2.4. příprava vzorků	9
2.5. aktivita <i>glukozo-6-fosfát dehydrogenázy</i> (G ₆ P-DH).....	11
2.6. měření množství proteinů v čase	12
2.7. aktivita <i>amylázy</i>	14
2.8. exprese PCNA	15
2.8.1. izolace celkové RNA.....	15
2.8.2. převedení tRNA na cDNA.....	16
2.8.3. standardní PCR	17
2.8.4. elektroforéza	18
2.8.5. kvantitativní PCR.....	19
3. Výsledky	22
3.1. aktivity	22
3.1.1. proteiny	22
3.1.2. G ₆ P-DH	23
3.1.3. amyláza	24
3.2. exprese PCNA	24
3.2.1. kvantitativní PCR(qPCR).....	24
3.2.2. standardní PCR	25
4. Diskuze	27
5. Závěry	29
6. Literatura	30

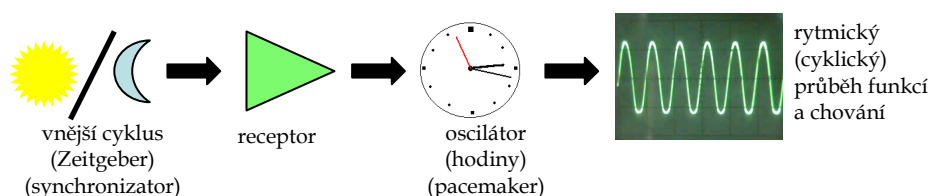
1. ÚVOD

Chování a fyziologické funkce organismů jsou často rytmické. Zdrojem četných cyklických fyziologických a vývojových procesů je pohyb vesmírných těles, například otáčení Země kolem osy, její oběh kolem Slunce, pohyb měsíce a s ním spojené slapové jevy na povrchu Země. Množství dopadajícího slunečního záření na povrch Země je zásadní veličinou, která se cyklicky mění při pohybech Země. Příběh slunečního záření je nerovnoměrně rozložen v čase. Tato nerovnoměrnost má pravidelně cyklický charakter. Výsledkem tohoto dění je skutečnost, že u naprosté většiny živých organismů najdeme adaptivní přizpůsobení k cykličnosti podmínek prostředí. A to právě ve formě časové organizace fyziologických funkcí nebo celých životních cyklů.

Biologické cykly mají genetický základ, jsou tedy organismu vlastní a jsou poháněny vnitřním motorem, tzv. biologickými hodinami. Cykly můžeme rozdělit podle délky jejich trvání následovně: 1) ultradiánní (perioda kratší než jeden den) – patří sem například metabolické cykly, tlukot srdce; 2) cirkadiánní (změny během ca 24hod) – např. tělesná teplota, spánek/ bdělost, příjem potravy, exprese genů; 3) infradiánní (sezónní a lunární) – např. reprodukce, hibernace, migrace.

1.1 cirkadiánní rytmy

Cirkadiánní rytmy jsou řízeny biologickými hodinami. Jejich obecný princip fungování si můžeme představit takto: Uvažujeme nějaký vnější cyklus podmínek, vnější oscilátor, například střídání dne a noci (v literatuře se často používá termín Zeitgeber). Dále je zde receptor pro vnímání signálů z vnějšího cyklu, vlastní "hodinový stroj" neboli vnitřní oscilátor (v literatuře Pacemaker) a nakonec výstupní signál z oscilátoru, který je transdukován do cykličnosti jednotlivých funkcí v cílových buňkách a orgánech.



Obr. 1 Schéma obecného principu fungování biologických hodin.

Vnitřní oscilátor pracuje i nezávisle na příjmu signálu z prostředí, má tedy schopnost endogenní funkce, produkuje výstupní signál a organismus se chová cyklicky s vnitřně nastavenou periodou (blízkou 24 hodinám). Celý systém musí být zároveň teplotně kompenzován. Systém musí být také schopen synchronizace s vnějším cyklem. Toho se docílí napojením na vstupní dráhy, podle kterých vnitřních oscilátor upravuje svou fázi a periodu.

Cirkadiánní rytmicitu můžeme pozorovat nejen na úrovni celého organismu, ale i na úrovni jednotlivých fyziologických funkcí nebo například na úrovni exprese jednotlivých genů. Podle současných představ je principem biologických hodin cyklus transkripční a translační negativní zpětné vazby, který probíhá v jediné buňce.

To znamená, že pozitivní elementy působí jako transkripční aktivátory, vážou se na DNA a zahajují přepis genů. Produkty těchto genů působí jako negativní elementy. Inhibují nebo jinak negativně ovlivňují funkci pozitivních elementů a tím zastavují vlastní transkripci. Celý proces probíhá spontánně, s periodou okolo 24 hodin až do vyhasnutí (někdy celé měsíce). Je teplotně kompenzován a může být synchronizován s vnějším oscilátorem.

První funkční element biologických hodin vůbec byl odhalen u mušky *D. melanogaster* a byl nazván Period (Konopka a Benzen, 1971). Dalším identifikovaným elementem byl Timeless. Tak byly objeveny první geny biologických hodin, tedy hodinové geny. Nyní známe již několik desítek genů, které kódují proteiny biologických hodin u několika organismů: sinice, houby, rostliny, hmyz, savci.

Cirkadiánní cykly poskytují organismu evoluční výhody v podobě lepší fitness. Jejich význam spočívá zejména v citlivosti celého systému ke světlu. Poměr světelné délky dne charakterizuje jednotlivá roční období a předesílá jejich změny. Schopnost zachytit tyto signály umožňuje živočichům předvídat změny a syntetizovat zásobní metabolity, organizovat změnu v buněčných membránách, zajišťující přežití blížících se nepříznivých podmínek.

1.2 sezónní cykly

Sezónní kalendář je založen na citlivosti ke změnám fotoperiody, je tedy řízen fotoperiodickým signálem. Kalendář potom řídí sezónní cykly, které jsou podobně jako cirkadiánní cykly alespoň v některých případech endogenní. To znamená, že přetrvávají i za konstantních podmínek. Mezi sezónní cykly patří například reprodukční aktivita, chování, metabolismus, příjem potravy a budování zásob, změny fenotypu (výměna srsti, shazování paroží,...), migrace, hibernace u savců a diapauza u hmyzu.

Diapauza je definována jako alternativní, úsporný vývojový režim, jehož základním významem je překonání nepříznivých podmínek pro život, například zimního období nebo období sucha. Zároveň synchronizuje významné životní aktivity (páření) jedinců v rámci populace. Na rozdíl od jiných typů dormance, je diapauza vyvolána již před nástupem nepříznivých podmínek, v prostředí vhodném pro přímý vývoj. Je indukována působením signálů z prostředí, nejčastěji změnou fotoperiody (Saunders, 1982). Tyto signály jsou doposud neznámým způsobem zpracovány centrálním nervovým systémem a převedeny na změny v hormonálním prostředí, jež způsobují významnou změnu genové exprese, fyziologie a často i chování celého organismu. Diapauzní vývoj je charakterizován zastavením ontogeneze, zpomalením metabolismu, akumulací energetických zásob. V případě dospělých jedinců jde o omezení funkce gonád, u samic zabraňují reprodukci v období, kdy by potomstvo nestačilo dospět do nástupu zimy a tak v chladných měsících přežít.

Principiálním základem sezónních cyklů je vždy změna hormonálního prostředí (Denlinger, 1985). U hmyzu hlavní roli hraje juvenilní hormon a ekdysteroidy, u savců se jedná o gonádotropiny a prolaktin. Princip sezónnosti na molekulární úrovni není zcela přesně znám. Odhadujeme ale, že je zde souvislost s biologickými hodinami, vzhledem k tomu jak hodiny reagují na poměr světelné části dne v průběhu roku.

1.3 souvislost sezónnosti s hodinami

Předmětem našeho zkoumání byl hmyz, o jehož sezónním kalendáři nemáme tolik informací jako např. o savcím, který je více prozkoumaný. Z rozsáhlé třídy hmyzu jsme se zaměřili na čeled' Drosophilidae, zástupce *Chymomyza costata*, konkrétně její larvální stadium. Tato larva prochází třemi instary, dále se kuklí, až se vyvine v dospělce (imago) nebo může tento svůj vývoj za blížících se nepříznivých podmínek (období sucha, zimy..) přerušit a vstoupit do diapauzy. O tom, že nastane zima, dostane larva signál zkrácením délky dne. Vstup do diapauzy je tedy odpověď na změnu fotoperiody.

V současnosti se uvažuje teorie, která říká, že cirkadiánní oscilační elementy jsou funkčně zúčastněné při zaznamenávání fotoperiody. Tato hypotéza byla prvně formulována pro rostliny Bünningem (1936), později pro další organismy zahrnující obratlovce (Aschoff et al., 1982) a hmyz (Saunders, 1982). To ve svých experimentech potvrdili i další (Yoshida and Kimura, 1995; Košťál et al., 2000a). Obecná otázka, zda jsou funkční cirkadiánní biologické hodiny nutnou součástí fotoperiodického systému (sezónního kalendáře), je řešena v rámci této práce.

1.4 modelový organizmus (*C. costata*, Diptera: Drosophilidae)

Za modelový organizmus jsme si zvolili mušku z čeledi Drosophilidae, *Chymomyza costata*. Je to blízká příbuzná mušky *Drosophila melanogaster*, která je jedním z nejprozkoumanějších modelových organizmů vůbec, nejčastěji využívaná v genetice. Na rozdíl od této mouchy se o bionomii mušky *C. costata* příliš mnoho neví. *D. melanogaster* je rozšířena v tropech, zatímco *C. costata* obývá holarktickou oblast. Vzhledem k jejímu severskému rozšíření u ní došlo k adaptaci na zimu, má vysokou schopnost mrazuvzdornosti, vykazuje sensitivitu vůči fotoperiodě a s tím související schopnost vstupu do diapauzy. Jedinci v larválním stadiu nebyli ve volné přírodě doposud nalezeni. Podle bionomie příbuzných druhů usuzujeme, že larvy *C. costata* se vyskytují pod kůrou padlých stromů.

1.5 cíle práce

Tato bakalářská práce je příspěvkem rámcového projektu řešení problematiky hmyzí diapauzy na Entomologickém ústavu AV ČR v Českých Budějovicích.

Cílem práce bylo pokusit se zodpovědět na některé z dílčích otázek, které by pomohly k objasnění principu larvální diapauzy hmyzu. Tyto otázky jsme řešili na úrovni hledání denního rytmu ve fyziologii larvy a denního rytmu v expresi genů.

V prvním případě jsme zvolili sledování aktivity enzymu *glukoso-6-fosfát dehydrogenáza* (G₆P-DH), jehož exprese je rytmická u mušky *D. melanogaster* a také u jiných organizmů. Dále jsme měřili aktivitu enzymu amylázy, který je v těsné souvislosti s příjmem potravy a následným trávením, tedy dalším často rytmickým procesem (rozdíl během dne a noci) zaznamenaným u mnoha živočichů.

V druhém případě jsme sledovali změnu transkripce genu PCNA (proliferating cell nuclear antigen), regulátoru buněčného cyklu, u diapauzních a nediapauzních larev. Nakonec jsme porovnávali množství mRNA transkriptů u různých variant (viz. dále).

2. METODIKA A MATERIÁL

2.1 chov much

Pro experimenty byly použity dva kmeny *C. costata*: divoký kmen (Sapporo) původně nasbíran roku 1983 poblíž Sappora, Hokkaido (třetí larvální instar těchto larev vstupoval do diapauzy v odpovědi na zkrácení fotoperiody pod 15hod světla; Riihima and Kimura, 1988); a mutantní kmen (*npd*) odvozen roku 1983 od divokého (tento kmen neodpovídá na změnu fotoperiody a larvy se plynule vyvíjejí; Riihima and Kimura, 1988). Mušky získáváme chovem v naší laboratoři z těchto původních jedinců. Dospělci žijí v jogurtových sklenicích (250 mL), jednotlivá larvální stadia ve velkých zkumavkách (50 mL) opatřených vatovou zátkou.

Jako zdroj potravy mouchám slouží dieta, která se skládá z agaru, sladu, kukuřičného šrotu a kvasinek. Mouchy kladou vajíčka na malý kousek jablka na dietě. Po naklazení vajíček se jablko přeneso do zkumavek na novou dietu a tak je umožněn larvální vývoj.

2.2 synchronizace larev

Pro optimální výsledky všech provedených experimentů jsme pracovali se stejně starými larvami třetího instaru. Toho jsme docílili synchronizací larev. Mezi 12. a 13. dnem od naklazení vajíček dochází k přechodu z druhého do třetího instaru. Proto jsme dvanáctý den probrali dietu a odstranili všechny larvy, které se již dostali do třetího instaru. Další den jsme sesbírali nalezené larvy ve třetím instaru a ty jsme přenesli do menší zkumavky (10 mL) s dietou. Tím jsme získali fyziologicky synchronní larvy, které byly všechny stejně staré v rozmezí ca 24hod.

2.3 experimentální varianty

Synchronizované larvy jsme nechali dorůst až do 16. dne od naklazení vajíček. V tento den jsou ještě všechny larvy citlivé k fotoperiodě, všechny reagují na zkrácení světelné délky dne vstupem do diapauzy (Riihima a Kimura, 1989). O den déle se této změně podřídí jen část larev. Devatenáctý den na zkrácení fotoperiody nereaguje již žádná a pokračují svůj vývoj ve směru kuklení. Proto jsme záměrně zvolili právě šestnáctý den, ve kterém mají všechny larvy schopnost reagovat na změnu fotoperiody.

Varianty pro experimenty:

- a) Divoký kmen (wild, Sapporo), jehož larvy reagují na fotoperiodický signál a to tak, že za krátkého dne (poměr světelné a temnostní fáze je 12:12hod) dochází k larvální diapauze a za dlouhého dne (poměr světelné a temnostní fáze je 16:8hod) ke kuklení a vývoji v imaga. Imaga vykazují denní a cirkadiánní rytmičnost lokomočního chování (Košťál, nepublikované výsledky). Imaga mají funkční biologické hodiny (Košťál, Shimada, 2001).
Ve zkratkách: **W.SD** – wild. short day – larvální diapauza
W.LD – wild. long day - přímý vývoj (kuklení)

- b) Mutantní kmen (*npd*-mutant), jehož larvy nereagují na fotoperiodický signál, přecházejí jak za dlouhého, tak za krátkého dne do kuklení. Imaga vykazují denní, ale ne cirkadiánní rytmičnost lokomoce (Košťál, nepublikované výsledky). Imaga nemají funkční hodiny (Košťál, Shimada, 2001).
Ve zkratce : **M.SD** – mutant. short day – přímý vývoj (kuklení)

2.4 příprava vzorků

Výchozí vzorky pro experimenty byly připraveny z celých larev s výjimkou experimentu týkajícího se exprese genu PCNA, kde byly použity přední části larev (viz podrobně dále).

Postup přípravy vzorků:

a) *pro měření množství proteinů*

- vzorky jsme získali při tvorbě vzorků pro aktivitu G₆P-DH ve fázi rozdělávání 80 μL supernatantu do dvou alikvotů (viz. dále)

b) *pro měření aktivit enzymu glukoso-6-fosfát dehydrogenáza (G₆P-DH)*

Enzym *glukoso-6-fosfát dehydrogenáza* byl poprvé izolován z erytrocytů v roce 1931 Warburgem. Tento enzym patří do skupiny oxidoreduktáz,. Je součástí pentozového cyklu a katalyzuje reakci přeměny *glukosy-6-fosfátu* na *glukonolakton* za současné přeměny NADP⁺ na NADPH. Mezi jeho aktivátory patří NADP⁺, Mg²⁺ do koncentrace 10 nmol. Inhibuje ho např. NADPH₂, ADP, ATP, GTP, UTP, Mg²⁺ při koncentraci nad 10 nmolů. Jeho aktivita vykazovala u *D. melanogaster* cirkadiánní rytmicitu (Claridge-Chang, Wijnen, Naef, Boothroyd, 2001), proto jsme si ho zvolili k hledání rytmičnosti u larev *C.costata*.

- na jeden vzorek jsme použili pět synchronizovaných 16 dní starých larev třetího instaru sebraných v příslušných časech během dne (Zt čas = Zeitgeber, Z₀ = rozsvícení)
Zt časy : W.SD – 2, 8, 14, 17, 20, 23

W.LD a M.SD – 2, 6, 10, 14, 18, 22

- larvy jsme očistili od diety, vložili do mikrozkrumavek obsahujících 100 µl 0,1M Tris-HCl roztok o pH 8,0 a ihned zamrazili tekutým dusíkem. Takto připravené hrubé vzorky jsme skladovali v mrazáku v teplotě -80 °C do doby dalšího zpracování
- vzorky jsme rozehrávali ve studené vodě a následně s nimi pracovali na ledu
- důkladně jsme homogenizovali obsah pomocí ručního homogenizátorku na baterie
- centrifugovali jsme při 22 000g/ 10min/ 4 °C
- odebrali jsme 80 µL supernatantu a rozdělili ho do dvou alikvotů
- první alikvot (10 µL) jsme uschovali na měření proteinů do -80°C
- druhý alikvot (70 µL) jsme přidali k 230 µL homogenizačního pufru (HB) se sacharosou
100 mM Tris-HCl, pH 8,0 (0,53g Tris + 0,88g Tris HCl ve 100 mL vody)
15 mM merkaptoethanol (mw. 78,13 → 105 µL/ 100 mL)
1 mM EDTA (mw. 372,3 → 29,2 mg/ 100 mL)(Serva)
30 mg sacharosy (Lachema)
- opět jsme zamrazili tekutým dusíkem a uchovávali v -80°C do doby měření aktivit sledovaného enzymu

c) *pro měření aktivity enzymu amyláza*

Amyláza je trávicí enzym, který štěpí α – glykosidické vazby dlouhých molekul některých sacharidů (zejména škrobu) na menší (maltóza) a umožňuje tak jejich vstřebání. Příjem potravy má obecně často rytmický průběh a proto jsme denní a cirkadiánní rytmicitu hledali u *C.costata* právě v aktivitě tohoto enzymu.

- pro tento experiment jsme použili již existující vzorky připravené na měření aktivit enzymu G₆P-DH

d) *pro sledování exprese PCNA*

PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) je regulátorem buněčného cyklu. Sledovali jsme, zda se množství transkriptů tohoto genu rytmicky mění během dne u diapauzních a nediapauzních larev a jaký je rozdíl v množství transkriptů u různých variant.

- počet použitých larev, jejich stáří a stav u jednotlivých variant je zaznamenán v následující tabulce (Tab.1).

Varianty	Počet larev	Stáří larev	Stav
M.SD	10	20	přímý vývoj
W.LD	10	20	přímý vývoj
W.SD	8	20	diapauza
W.SD _L	18	40	diapauza

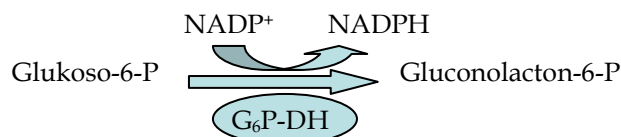
Tab. 1
Přehled počtu použitých larev, jejich stáří a stav u jednotlivých variant.

- larvy jsme očistili od diety a na pitvacím sklíčku se sterilním roztokem (Ringerův roztok) jsme odstříhli jejich přední části, zhruba v 1/3 těla. V této první třetině se nacházela nervová soustava (dvě mozkové hemisféry a ventrální ganglion) a imaginární disky.
- odstranili jsme zbytky střeva, které zůstaly v přední části těla larev.
- takto ošetřené přední části larev jsme dali do mikrozkušavek obsahujících 50 μL stabilizátoru (RNA later) a uchovávali v -20°C až do zkoumání exprese PCNA

2.5 aktivita G₆P-DH

Aktivitu enzymu jsme sledovali jako změnu absorbance měřenou na spektrofotometru (Pye Unicam) při vlnové délce 340nm za teploty 25°C . V reakčním roztoku, který jsme proměřovali, probíhala reakce přeměny *glukoso-6-fosfátu* na *glukonolakton-6-fosfát* za působení námi sledované *glukoso-6-fosfát dehydrogenázy* a současné přeměny NADP^+ na NADPH.

Schéma reakce:



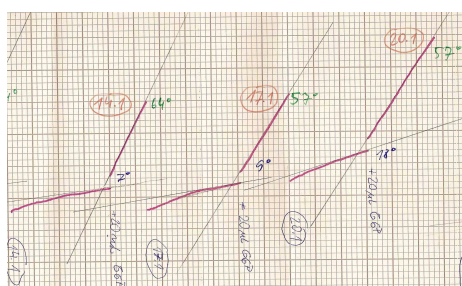
Naměřená absorbance odpovídala koncentraci NADPH a to molárně odpovídá množství G₆P převedeného na *glukonolakton-6-fosfát*. Extinkční koeficient pro NADPH je 6270. Pokud se tedy zvýší koncentrace o 1 mol.L^{-1} , zvýší se absorbance o 6270. Toho jsme využili při výpočtu koncentrace NADPH podle měnící se naměřené absorbance.

Postup :

- do kyvetky jsme postupně přidávali tyto komponenty :
 - 400 μL reakční směsi (složení RM 25 mM imidazol-HCl (0,170g/100mL) + 6,25 mM MgSO₄ (0,154g/100mL) + pH nastaveno na 7,2 pomocí 1N HCl)
 - 10 μL 30mM NADP (mw. 765,4 \rightarrow 22,95mg/1mL) (mw. 841,4 \rightarrow 25,2mg/mL)
 - 20 μL homogenizačního pufru HB
 - 50 μL vzorku (předem rozehřátý ve studené vodě a ihned vložen na led)

- kyvetku jsme důkladně promíchali a měřili aktivitu pozadí, která byla následně odečtena
- přidali jsme 25 μ L 25 mM *glukoso-6-fosfátu* (mw. 282,12 \rightarrow 70,5mg/10ml, 14,1mg/2mL), opět důkladně promíchali a měřili aktivitu G₆P-DH.

Výsledek průběhu reakce jsme zaznamenávali pomocí zapisovacího zařízení jako dvě křivky, jedna znázorňující pozadí a druhá aktivitu enzymu v důsledku přidání *glukoso-6-fosfátu* (G₆P)(Obr. 2). K těmto křivkám jsme zhotovili tečny a podle nich odečetli příslušné úhly. Úhly jsme použili pro další přepočty, výsledkem byly získané hodnoty aktivit enzymu v mikromolech substrátu konvertovaného za minutu na produkt na gram celkových proteinů (μ moly/ min . g proteinů).



Obr. 2 Ukázka záznamu z měření aktivity enzymu G₆P-DH na spektrofotometru při Abs₃₄₀. Obrázek zachycuje měření tří vybraných vzorků. Nejprve bylo měřeno pozadí, druhý záznam je výsledkem aktivity sledovaného enzymu po přidání G₆P.

2.6 měření množství proteinů v čase

Měření proteinů lze provést několika různými metodami, např. Lowryho metodou, metodou Bradfordové nebo BCA metodou. Zde jsme použili BCA metodu, která má citlivost srovnatelnou s Lowryho metodou, interferuje zde ovšem méně látek. Metoda využívá sodné soli kyseliny bicinchoninové, která komplexuje měďné ionty tvořené reakcí peptidové vazby s měďnatými ionty za alkalických podmínek. Komplexace měďných iontů souvisí se vzniklým fialovým zbarvením.

Postup:

- použili jsme metodu BCA- příprava standardů, inkubovali ve vodní lázni, měřili absorbanci na spektrofotometru při vlnové délce 562nm, při níž jsou pozorovatelné největší změny
- použité chemikálie:
 - reagens A, BCA roztok (Sigma)

sodium bicinchoninate (BCA)	1 g	5 g
Na ₂ CO ₃	2 g	10 g
vinan sodný	0,16 g	0,8 g
NaOH	0,4 g	2 g
NaHCO ₃	0,95 g	4,75g
namícháno v	100mL	500mL
pH nastaveno na 11,25 pomocí 10M NaOH		

- reagens B (Sigma)

CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,4 g	2 g
namícháno v	10 mL	50 mL

- připravili jsme pracovní směsi smícháním reagentie A : B v poměru 50 : 1

- příprava BSA standardů:

7,5 mg BSA (Merck) jsme rozpustili v 5 mL vody. Tím jsme získali roztok o koncentraci 1,5 µg/ 1µL. Následovně jsme připravili standardy podle následující tabulky:

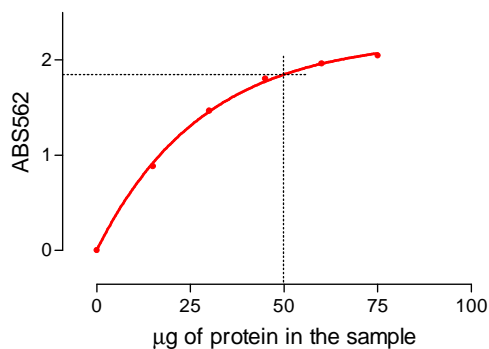
Tab. 2 příprava BSA standardů

	voda (µL)	roztok BSA (µL)	µg proteinů/ 50 µL roztoku
S0	50	0	0
S1	40	10	15
S2	30	20	30
S3	20	30	45
S4	10	40	60
S5	0	50	75

- rozežřáli jsme proteinový extrakt (vzorek získaný zároveň se vzorky na aktivity G₆P-DH) v 0,1M Trisu, odebrali 5 µL do nové testovací mikrozkušavky a přidali 45µL vody. Tím nám vznikly vzorky o stejném objemu jako standardy, tedy 50 µL
- do každé mikrozkušavky (standardy i vzorky) jsme opatrně přidali 1mL pracovní směsi a protřepali
- inkubovali jsme ve vodní lázni vyhřáté na 60°C po dobu 30min
- poté jsme nechali zchladit pár minut při pokojové teplotě a měřili absorbancí při 562 nm

Hodnoty ABS₅₆₂ podléhaly změnám při pokojové teplotě rychlostí 2,3%/ 10min. Celé měření bylo ukončeno během 2-5min, aby nedocházelo k přílišnému zkreslování výsledků.

Získané hodnoty udávaly množství proteinů v µg na 5 µL vzorku. Ve výsledcích bylo množství proteinů převedeno na jednu larvu. Na Obr. 3 je uvedena kalibrační křivka.



Obr. 3 Kalibrační křivka závislosti absorbance na množství proteinů. Je proložena exponenciální křivka :
 $y = Top * [1 - \exp(-K * x)]$
 $Top = 2,227 \pm 0,037$
 $K = 0,035 \pm 0,002$
 $R^2 = 0,9992$

2.7 aktivita amylázy

Běžně používané stanovení aktivity α -amylázy je založeno na štěpení chromogenního substrátu, rozpustného škrobu. Jako chromogen byl použit dinitrosalicylát.

- Použité chemikálie:

citrát/fosfátový pufr : 0,1 M kyselina citronová . H₂O (m.w. 210,14; 2,10 g/100 mL) (Lachema)
(C/P pufr) 0,2 M Na₂HPO₄ . 2 H₂O (m.w. 178,0; 3,56 g/100 mL) (Fluka)
přidán fosfát do kyseliny citronové dokud nebylo dosaženo požadované pH
(pH 7,0 je obvykle optimum)
přidán stejný obsah vody do výsledného pufru
→ ca. 0,1 M pufr, pH 7,0

Samnerovo činidlo:

připraveno samostatně:
30% sodium potassium tartrate . 4H₂O (15 g/50 mL) (Lachema)
1,6% hydroxid sodný (0,8 g/50 mL) (Lachema)
1% 3,5-dinitrosalicilová kyselina (0,5 g/50 mL) (BDH Chemicals, Poole, England)
přidáno ½ NaOH do tartratu a ½ NaOH do kyseliny, zamíchány oba roztoky

2% škrob : rozpuštěn 1 g rozpustného škrobu (Merck) v 50 mL 0,1 M C/P pufru (pH 7,0)
vařeno 3 min, přefiltrováno přes umělou bavlnu, sterilizace v autoklávu

maltosové standardy : 10 mg D(+)-maltosy monohydrátu (m.w. 360,32) (Fluka) / 10 mL vody
rozředěno následovně: 0,1 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 mg/ mL

Postup:

- v 1,5 mL mikrozkušavky jsme smíchali:
100 μ L standardního roztoku + 100 μ L 2% škrobu pro přípravu standardů k proměření
20 μ L vzorku v HB + 80 μ L 0,1 M C/P pufru (celkem 100 μ L) + 2% škrobu
- inkubovali jsme ve vodní lázni vyhřáté na 35°C po dobu 60min
- přidali jsme 100 μ L Samnerova reagens a ihned vložili do lázně o teplotě 99°C po dobu 5min
- vzorky a standardy jsme zchladili na ledu, měřili absorbanci Abs₅₅₀

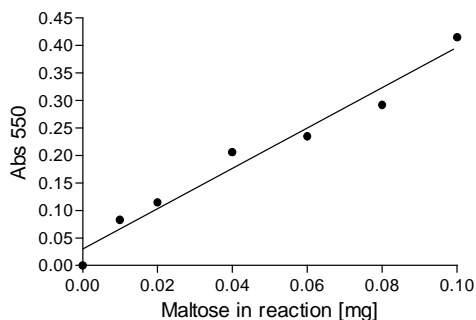
Při prvním měření jsme kromě standardů použili dva slepé vzorky:

B1 – 100 μ L C/P pufru

B2 – 20 μ L homogenizačního pufru + 80 μ L C/P pufru

Jejich proměření jsme zjistili, že obsažené komponenty nijak neinterferovaly a mohli jsme s nimi bez následků pracovat.

Z naměřených hodnot množství přeměněné maltosy v čase jsme sestavili kalibrační křivku (Obr. 4).



Obr. 4 Kalibrační křivka závislosti absorbance na množství maltózy. Je proložena křivka lineární regrese.

2.8 exprese PCNA

V části týkající se transkripce PCNA jsme pracovali ve dvou směrech. V prvním případě jsme hledali denní rytmicitu v transkripci tohoto genu u diapauzních (W.SD) a nediapauzních larev (W.LD). K tomu jsme použili metody kvantitativní PCR (qPCR). V druhém případě jsme porovnávali přítomnost množství transkriptů u mutantních a divokých larev. Použitou metodou byla standardní PCR. Princip PCR a qPCR viz. dále. Celý experiment zahrnoval několik dílčích částí – izolace celkové RNA, převedení na cDNA, PCR (nebo qPCR), elektroforéza a kvantifikace transkriptů (statistické vyhodnocení v případě qPCR).

2.8.1 izolace celkové RNA

V této části pokusu jsme dbali zvýšené opatrnosti kvůli možné kontaminaci vzorků RNázami, které je obtížné inhibovat. Pracovali jsme v jednorukavových rukavicích, používali sterilní zkumavky a automatické pipety, určené výhradně pro práci s RNA.

- odstranili jsme RNA stabilizátor (RNA later) obsažený v mikrozkušavkách
- přidali jsme 200 μ L RNA blue (RNA blue, Top-Bio) je reagens umožňující získat čistou a nedegradovanou RNA; obsahuje fenol, chloroform, silné inhibitory RNáz atd.)
- důkladně jsme homogenizovali pomocí ručního homogenizátorku na baterie , používali jsme sterilní vyměnitelné plastové pístky
- přidali jsme 800 μ L RNA blue, lehce protřepali a krátce stočili (2000g/ 30s)
- nechali jsme odstát 10 min při pokojové teplotě, promíchali pomocí Vortexu každé 2 min (kompletní rozvolnění nukleoproteinového komplexu)
- přidali jsme 200 μ L chloroformu, důkladně promíchali a opět nechali 10min odstát
- centrifugovali jsme při 15 000g/ 10min/ 4°C, čímž jsme dosáhli rozdělení vzorku do tří fází (1. vodní fáze obsahující RNA, 2. interfáze obsahující DNA, 3. modře zbarvená organická fáze obsahující proteiny). Během centrifugace jsme si připravili zkumavky se 400 μ L isopropanolu (na ledu).

- odebrali jsme 400 μL vodní fáze a přidali ji do zkumavky s isopropanolem nechali jsme celkovou RNA vysrážet po dobu 30 min v 0°C (v boxu s ledem)
- centrifugovali jsme při 22 000g/ 20min/ 4°C , odstranili jsme všechnu kapalnou fázi
- k peletě, která nám zbyla ve zkumavce jsme přidali 500 μL 75% roztok ethanolu v DEPC (diethylpyrokarbonát) ošetřené vodě (-20°C), lehce jsme otáčeli, aby se peleta uvolnila
- centrifugovali jsme při 22 000g/ 5min/ 4°C , odstranili jsme veškerou kapalinu (nejprve velkou pipetou (200-1000 μL), krátce stočili, malou pipetou (2-20 μL))
- otevřené zkumavky jsme nechali 2-4 min vysušit
- obsah zkumavky jsme rozpustili v 6 μL DEPC vody, lehce protřepali a krátce stočili

Měřili jsme absorbanční Abs_{260} (D lampa) v 1 μL vzorku přidaném do 500 μL vody, pozadím byla destilovaná voda. Koncentraci získané RNA jsme zjistili výpočtem z rovnice:

$$c = \text{ABS}_{260} \cdot V [\mu\text{L}] \cdot \text{extinkční koeficient} \quad V = 500 + 1$$

$$[c] = \text{ng} / \mu\text{L} \quad \text{extinkční koeficient pro RNA} = 40$$

Pro další krok jsme potřebovali mít v každé zkumavce stejnou koncentraci RNA. Pokud byla ve vzorku vyšší koncentrace, naředili jsme ji na námi požadovanou koncentraci $c = 1,5 \mu\text{g tRNA} / 5\mu\text{L DEPC vody}$ (Tab.3).

Tab. 3 Množství získané RNA při Abs_{260} a její naředění:

	ABS_{260}	tRNA / 5 μL	+ μL vody ($c=1,5\mu\text{g}/5\mu\text{L}$)	Výsledná koncentrace
M.SD	0,043	4,31	9,37	1,500
W.SD	0,027	2,71	4,03	1,500
W.LD	0,036	3,61	7,05	1,500
W.SD _L	0,015	1,505	X	1,505

2.8.2 převedení tRNA na cDNA

Pro převedení tRNA na cDNA jsme využili postupu reverzní transkripce (RT, Promega).

- nastavili jsme inkubátory na mikrozukavky na teploty 70°C a 42°C
- zahřáli jsme 1,5 μg tRNA alikvot v malé mikrozukavce (0,5mL) na 70°C po dobu 5min, krátce stočili a umístili na led
- sestavili jsme si 20 μL reakci podle následující tabulky (připravili jsme si Master Mix bez RNA templátu):

Tab. 4 Postup přípravy Master Mixu pro převedení tRNA na cDNA metodou RT:

	1x reakce	4x Master Mix	
MgCl ₂	4	16	
10x pufr	2	8	
dNTP mix	2	8	
Rnasin	0,5	2	
AMV RT	0,8	3,2	
Oligo (dT) ₁₅	1	4	
tRNA templát	5	X	(á 5 µL~ 1,5 µg celkové RNA)
DEPC voda	4,7	18,8	
celkem	20,0 µL	60,0 µL	(60 x 15 µL MM)

- rozdělili jsme po 15 µL MM do mikrozkušavek s denaturovaným RNA templátem (5 µL), protřepali Vortexem, stočili (vyhnuli jsme se vzniku vzduchových bublin)
- reakci jsme inkubovali při 42°C po dobu 45 min (RT), mezitím nastavili druhý inkubátor na 95°C
- denaturovali jsme reverzní transkriptázu při 95°C po dobu 5 min
- zchladili jsme na ledu po dobu 5 min
- vzniklé první vlákno cDNA syntetické reakce jsme rozdělili následovně :
100 µL (5x) se sterilní vodou (přidáno 80 µL) pro normální PCR
500 µL (25x) se sterilní vodou (přidáno 480 µL) pro kvantitativní PCR
- takto připravené vzorky jsme uchovávali v mrazáku (-20°C) do provedení dalšího kroku

2.8.3 standardní PCR

Polymerázová řetězová reakce (z anglického *polymerase chain reaction*) je metoda rychlého zmnožení určitého úseku DNA. Úseky DNA, které se mají namnožit musí být předem označeny na začátku a na konci přidáním vhodných primerů. Ten bude za vhodných teplotních podmínek tvořit vodíkové můstky s komplementární sekvencí v templátovém vlákně. Takto jsme schopni určit DNA-polymeráze, od kterého místa a kterým směrem (5'→3') má začít syntetizovat komplementární vlákno. Templátová vlákna vznikají denaturací původně dvouvláknové DNA. Primery na tato vlákna nasedají v protisměrné orientaci, takže po opakovaných cyklech denaturace, nasedání primeru a extenze primeru DNA-polymerázou vznikají produkty, které slouží jako templáty pro nový reakční cyklus. Produkt se hromadí geometrickou řadou, ze 2 vláken získáme po 30 cyklech teoreticky celkem $2^{30} = 107$ milionů kopií.

PCR jsme nechali proběhnout ve variantách 20, 25 a 30 cyklů pro vzorky M.SD, W.LD, W.SD a W.SD_L (tzn. 3x4= 12 reakcí). Množství mRNA transkriptů PCNA jsme porovnávali vzhledem k Rp49 (ribosomal protein, provozní strukturní protein, který je součástí ribosomu a vykazuje konstantní hladinu transkriptu v buňce, což nás vedlo k jeho použití jako neměnné pozadí pro odečtení množství transkriptu PCNA). PCR jsme nechali proběhnout jak pro PCNA (12 reakcí), tak pro Rp49 (12reakcí).

- sestavili jsme 25 μL PCR reakci podle následujícího schématu (příprava Master Mixu):

Tab. 5 Postup přípravy Master Mixu pro standardní PCR:

	1x reakce	13x Rp49	13x PCNA
voda	14	182	182
10x pufr	2,5	32,5	32,5
dNTP	2	26	26
primer up	2,5	32,5 (Cc.Rp.F1)	32,5 (Cc.PCNA.1)
primer down	2,5	32,5(Cc.Rp.R1)	32,5 (Cc.PCNA.2)
cDNA	1,5	X	X
ExTaq	0,2	2,6	2,6
celkem	25	305,5 = 13x 23,5 + 1,5(cDNA)	

23,5 + 1,5 = 25 (reakční objem)

- protřepali jsme Vortexem, stočili
- spustili jsme PCR program :
 - 95°C / 1min – počáteční impuls, denaturace vláken
 - 94 °C/ 30s – pokračuje denaturace vláken
 - 55°C/30s - nasedání primerů
 - 72°C/1 min – syntéza nového vlákna
 - 72°C/3min – dokončení polymerace
 - 4°C/10min – zchlazení vzorků, přemístění na led

20x, 25x, 30x

2.8.4 elektroforéza

Následným krokem pro vyhodnocení výsledku standardního PCR byla agarózová elektroforéza, která nám poskytla informaci o přibližném množství transkriptů sledovaných genů. Během elektroforézy dojde k rozdělení molekul nukleových kyselin podle jejich velikostí a to na principu průchodu molekul skrz síťovitou strukturu gelu.

- připravili jsme si 2% gel, jehož roztok měl toto složení: 0,5g agarosy; 0,5mL 50x TAE; 24,5ml vody
- gel jsme umístili do elektroforetické vany a přelili 1x TAE (složení: Tris, kyselina octová, EDTA)
- PCR produkty a marker (100bp ladder) jsme pak vpravili do jednotlivých jamek
- po uzavření elektrického okruhu připojením ke zdroji napětí jsme nechali probíhat samotnou elektroforézu, molekuly se pohybovaly rozdílnou rychlostí podle své velikosti. Molekulová velikost PCR produktu Rp49 je 148bp, pro PCNA 158bp.
- elektroforézu jsme nechali proběhnout 30min
- po jejím skončení jsme gel ponořili na 15-20min v lázni s fluorescenčním barvivem ethidium bromidem
- gel jsme fotografovali pod UV světlem
- provedli jsme densitometrické měření pomocí programu Quantiscan

2.8.5 kvantitativní PCR (qPCR)

Pro kvantitativní analýzu zastoupení různých sekvencí na DNA či RNA ve výchozích vzorcích byly v poslední době vyvinuty speciální metody, které umožňují průběžnou analýzu tvorby produktů PCR, respektive real time PCR. K tomu byly vyvinuty speciální termální cyklery, jedním z nich tzv. světelný cykler (Light Cycler), který zahrnuje kombinaci tří přístrojů- PCR termálního cykleru, přístroje pro detekci fluorescence a počítače umožňující automatický sběr dat a jejich rychlé vyhodnocování. Kvantitativní PCR v principu stanovuje koncentrace produktu na základě fluorescence. Požitá fluorescenční barvivo SYBR Green 1 se specificky váže do malého žlábků dvouvláknové DNA. Neváže se na jednovláknovou DNA a pokud není vázané, prakticky nefluoreskuje. Po navázání na dvouvláknovou DNA jeho fluorescence při 530nm výrazně vzrůstá. Takto se určuje koncentrace dvouvláknové DNA na konci každé syntetické fáze PCR (Obr. 5, 6). Měřitelná intenzita fluorescence se objevuje po určitém počtu cyklů a to tím později, čím méně kopií amplifikované sekvence bylo ve vzorku na počátku. Z hodnot fluorescence v okamžiku jejího růstu (take off) lze vypočítat koncentraci dvouvláknové DNA a z těchto hodnot lze odvodit koncentraci, resp. počet kopií dvouvláknové DNA přítomných ve vzorku na počátku PCR (resp. počet kopií mRNA ve vzorku na počátku RT-PCR)(Tab.7, 8). Snímání probíhalo na dvou úrovních, panel A (výsledky získané měřením fluorescence při 74°C) a panel B (výsledky získané měřením fluorescence při 83°C, tedy po rozpuštění potenciálních malých vedlejších produktů).

Kvantitativní PCR ve své podstatě probíhá stejně jako standardní PCR – denaturace vláken, nasedání primerů a syntéza nového řetězce za předem určených teplot a časových intervalů. Během prvního vyhřívání vzorku z pokojové teploty na teplotu denaturační je riziko nespecifické reasociace primerů s templátem. Tím může vzniknout nežádoucí komplex, který je dále kopírován na místo požadované sekvence. Tomu lze předejít tak, že zabráníme syntéze DNA při náběhové teplotě použitím tzv. Hot start Taq polymerázy, která se aktivuje až při překročení teploty 95 °C.

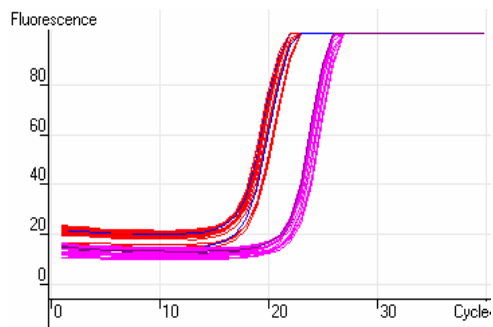
- pracovali jsme na přístroji Light-cycler (Corbett Res.) s rotorem pro 36 vzorků (4x9)
- až do spuštění reakce jsme pracovali v jednoúčelových rukavicích
- sestavili jsme 20µL PCR reakci podle následujícího schématu (příprava Master Mixu):

Tab. 6 Postup přípravy Master Mixu pro kvantitativní PCR:

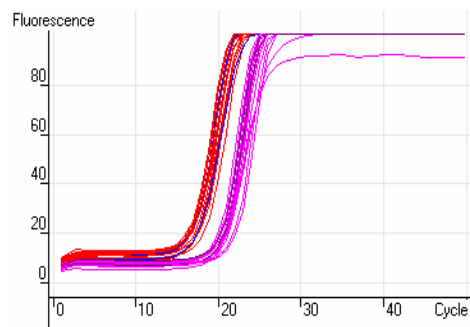
	1x	40x MM
sterilní voda	9,7	388,8
dNTP mix	1,6	64
10x pufr	2	80
ExTaq HS	0,08	3,2
Syber Green(1:1000)	0,8	32
celkem	14,2	568
+ primery	0,4+0,4	2 x 8+8
+ cDNA	5	40 x 5
celkem	20 µL	

pozn.: ExTaq jsme opatrně zamíchali špičkou pipety před přidáním do MM

- připravený MM jsme důkladně promíchali (překlápěním, Vortex, krátce stočili)
- roztavili jsme cDNA vzorky
- rozdělili jsme MM do dvou mikrozkušavek (0,5mL)
- přidali jsme 8 + 8 µL primerů (20 pmol/ 1 µL), důkladně promíchali, umístili na led a chránili před přímým světlem
- připravili jsme si 36 PCR zkumavek (0,2 ml; AB-gene, Oxygen), do každé jsme nepipetovali á 5 µL cDNA
- do každé mikrozkušavky jsme přidali 15 µL MM
- mikrozkušavky s připravenou směsí jsme umístili na led do zpuštění samotné reakce



Obr. 5 Záznam snímání fluorescence během jednotlivých cyklů (celkem 50) přístrojem Light-Cycler. Proměřované vzorky obsahovaly přední části 20dní starých larev *C.costata*, varianta W.SD (divocí jedinci za krátkého dne). Červená barva = *Rp49*, fialová = *pcna*.



Obr. 6 Záznam snímání fluorescence během jednotlivých cyklů (celkem 50) přístrojem Light-Cycler. Proměřované vzorky obsahovaly přední části 20dní starých larev *C.costata*, varianta W.LD (divocí jedinci za dlouhého dne). Červená barva = *Rp49*, fialová = *pcna*.

Tab. 7 Tabulka s výsledky z qPCR pro divoké larvy za krátkého dne (W.SD). V příslušných Zt časech jsou uvedeny hodnoty take off a jejich průměry, effciencie znásobování transkriptů a směrodatné odchylky pro *pcna* a *Rp49*.

cycling B threshold =0,06758	CcPCNA1 vs. CcPCNA2					CcRPF1 vs. CcRPR1				
	REAL		REAL			REAL		REAL		
	1	2	eff	av	StDev	1	2	eff	av	StDev
Zt 0	19,43	19,43	1,95	19,43	0	15,61	15,57	1,97	15,59	0,028
Zt 4	19,37	19,10	1,95	19,235	0,191	15,35	15,43	1,97	15,39	0,057
Zt 8	19,70	19,68	1,95	19,69	0,014	15,32	15,61	1,97	15,465	0,205
Zt 12	19,48	19,28	1,95	19,38	0,141	15,35	15,49	1,97	15,42	0,099
Zt 16	19,98	19,84	1,95	19,91	0,099	15,61	15,96	1,97	15,785	0,247
Zt 18	19,70	19,57	1,95	19,635	0,092	15,79	15,93	1,97	15,86	0,099
Zt 20	20,23	20,17	1,95	20,2	0,042	15,79	16,03	1,97	15,91	0,17
Zt 22	19,85	19,86	1,95	19,855	0,007	15,60	15,80	1,97	15,7	0,141
Zt 24	19,66	19,25	1,95	19,455	0,29	15,36	15,47	1,97	15,415	0,078

Tab. 8 Tabulka s výsledky z qPCR pro divoké larvy za dlouhého dne (W.LD). V příslušných Zt časech jsou uvedeny hodnoty take off a jejich průměry, effciencie znásobování transkriptů a směrodatné odchylky pro *pcna* a *Rp49*.

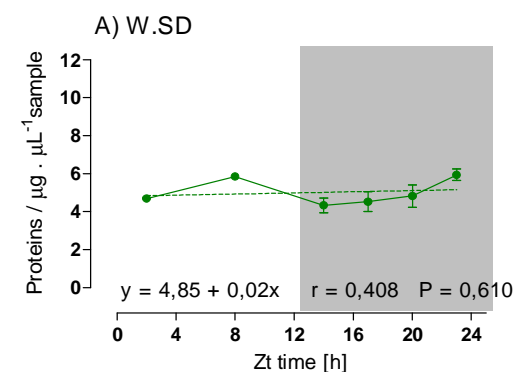
cycling A threshold =0,09085	CcPCNA1 vs. CcPCNA2					CcRPF1 vs. CcRPR1				
	REAL		REAL			REAL		REAL		
	1	2	eff	av	StDev	1	2	eff	av	StDev
Zt 0	16,68	16,68	1,94	16,68	0	13,90	14,00	1,89	13,95	0,071
Zt 4	16,50	16,35	1,94	16,425	0,106	13,71	13,81	1,89	13,76	0,071
Zt 8	17,14	16,72	1,94	16,93	0,297	14,18	14,27	1,89	14,225	0,064
Zt 12	17,03	17,00	1,94	17,015	0,021	14,09	14,18	1,89	14,135	0,064
Zt 16	16,81	16,83	1,94	16,82	0,014	14,05	14,13	1,89	14,09	0,057
Zt 18	18,35	18,16	1,94	18,255	0,134	15,09	15,17	1,89	15,13	0,057
Zt 20	17,35	17,12	1,94	17,235	0,163	14,12	14,24	1,89	14,18	0,085
Zt 22	16,91	16,78	1,94	16,845	0,092	14,15	14,23	1,89	14,19	0,057
Zt 24	16,94	17,02	1,94	16,98	0,057	14,03	14,20	1,89	14,115	0,12

3. VÝSLEDKY

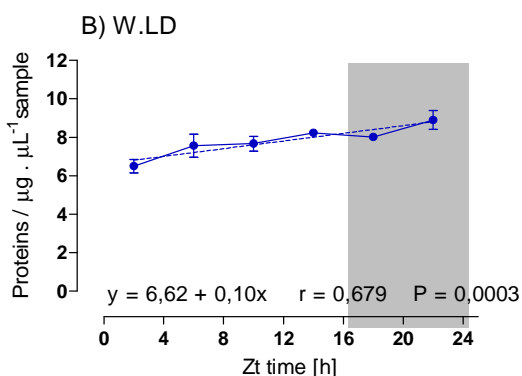
3.1 Aktivity

3.1.1 proteiny

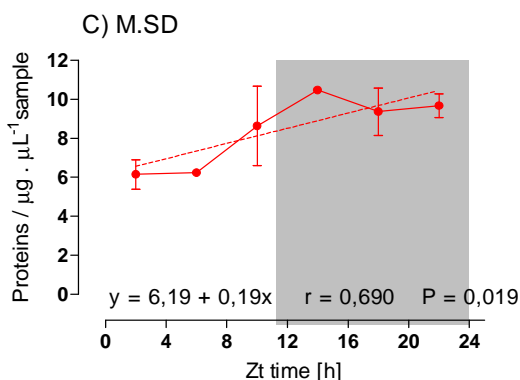
Toto měření nám poskytlo informaci o relativním množství proteinů v čase, sloužilo nám jako pozadí pro odečtení hodnot aktivit enzymu G₆P-DH. Výsledky znázorňují jak přibývá množství proteinů v souvislosti s růstem larev během jejich vývoje. U divokých larev za krátkého dne je nárůst proteinů pomalejší vzhledem k jejich vstupu do diapauzy. Další informace jsou zahrnuty v popiskách obrázku (Obr. 7).



Obr. 7 Změna koncentrace proteinů ve vzorku 16 dní starých, celých larev *C.costata* vyjádřena v μg na $1\mu\text{L}$ vzorku. (A) divoký kmen za krátkého dne (podíl světelné a temnostní délky dne 12:12hod); (B) divoký kmen za dlouhého dne (podíl světelné a temnostní délky dne 16:8hod); (C) mutantní kmen za krátkého dne.

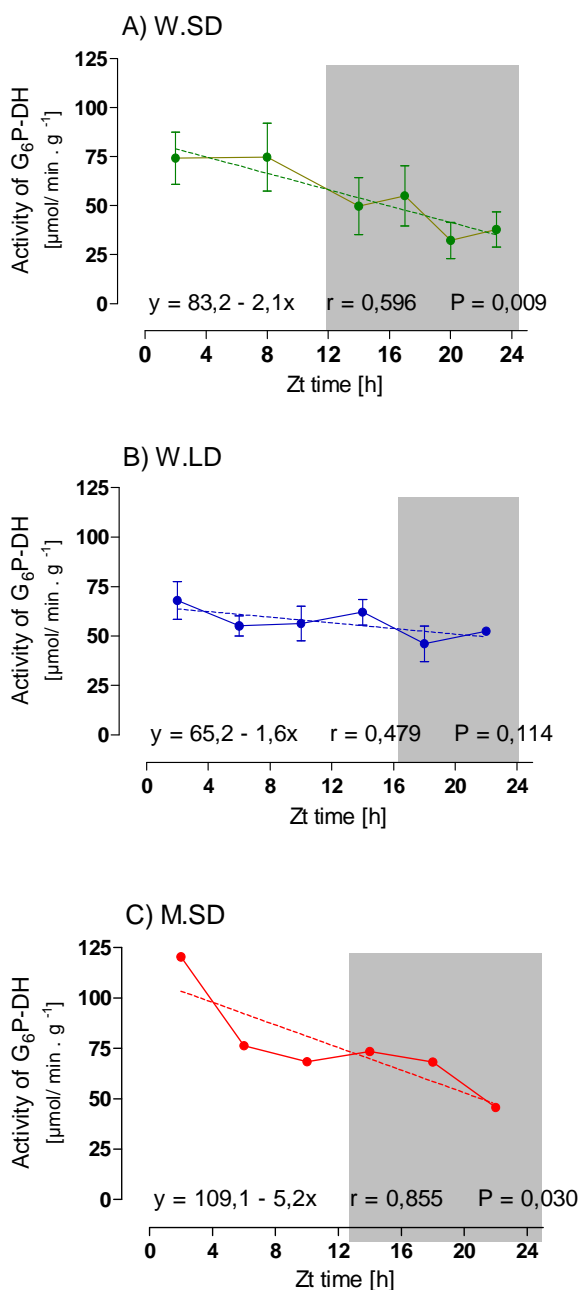


Znázorněné hodnoty jsou průměrem tří (A), čtyř (B) a dvou opakování (C). Úsečky ukazují střední chyby průměru (SEM). Pro vizualizaci trendů byly proloženy přímkou lineární regrese s obecnou rovnicí $y = a + bx$. (A) přímka nevykazuje signifikantní růst, (B,C) vykazují signifikantní růst. Jsou uvedeny korelační koeficienty (r) a pravděpodobnosti odchylností sklonů od nuly (P).



3.1.2 G₆P-DH

Výsledné grafy zachycují změnu aktivity enzymu *glukoso-6-fosfát dehydrogenázy*. V tomto měření jsme nezaznamenali rytmickou denní změnu aktivity G₆P-DH a to ani u jedné ze sledovaných variant. Zbylé podrobnosti zahrnuje popis obrázku (Obr. 8).



Obr. 8 Aktivita G₆P-DH u 16 dní starých, celých larev *C.costata* vyjádřena v μmolech substrátu přeměněného na produkt za minutu/ g celkového proteinu. (A) divoký kmen za krátkého dne (podíl světelné a temnostní délky dne 12:12hod); (B) divoký kmen za dlouhého dne (podíl světelné a temnostní délky dne 16:8hod); (C) mutantní kmen za krátkého dne.

Znázorněné hodnoty jsou průměrem tří (A) a dvou opakování (B), (C) jsou hodnoty z jednoho měření.

Úsečky ukazují střední chyby průměru (SEM).

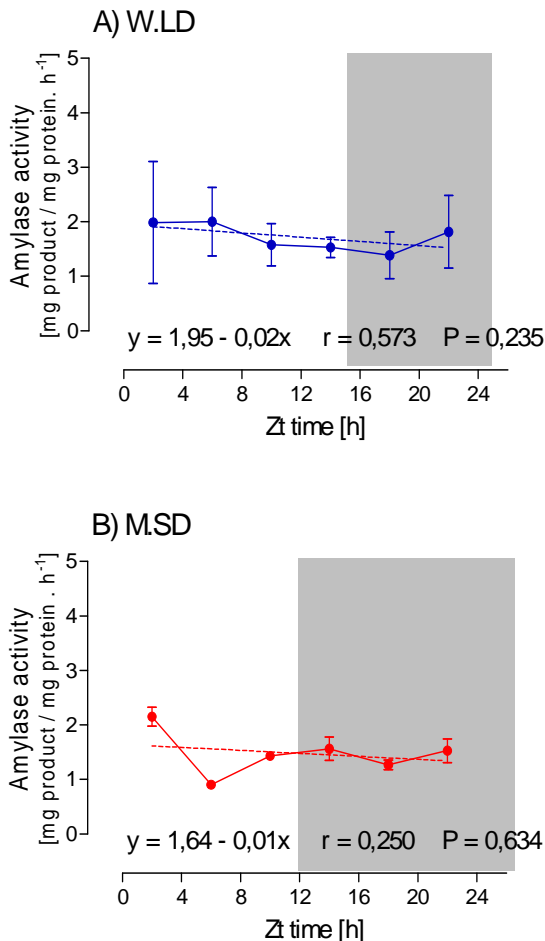
Pro vizualizaci trendů byly proloženy přímkou lineární regrese s obecnou rovnicí $y = a + bx$.

V případě (A,C) vykazují přímkou signifikantní pokles, u (B) pokles nesignifikantní.

Jsou uvedeny korelační koeficienty (r) a pravděpodobnosti odchylností sklonů od nuly (P).

3.1.3 amyláza

Uvedené grafy znázorňují výsledky měření aktivity trávicího enzymu *amylázy*. Jak je zachyceno v grafech, aktivita *amylázy* se během dne rytmicky nemění. Podrobnosti obsažené v grafech jsou vysvětleny v popiskách (Obr. 9).



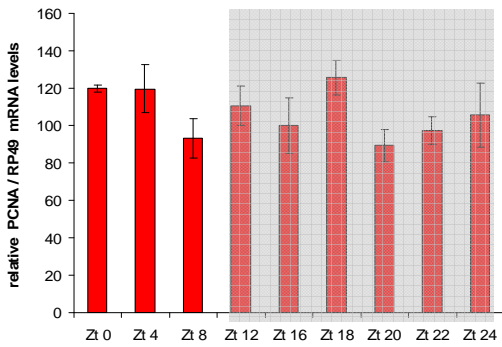
Obr. 9 Aktivita amylázy u 16 dní starých, celých larev *C.costata* vyjádřena v mg produktu/ mg proteinů za hodinu. (A) divoký kmen za dlouhého dne (podíl světelné a temnostní délky dne 16:8hod); (B) mutantní kmen za krátkého dne (podíl světelné a temnostní délky dne 12:12hod).

Znázorněné hodnoty jsou průměrem čtyř (A) a dvou opakování (B). Úsečky ukazují střední chyby průměru (SEM). Pro vizualizaci trendů byly proloženy přímkami lineární regrese s obecnou rovnicí $y = a + bx$. V obou případech (A,B) nevykazují přímký sklon signifikantní od nuly. Jsou uvedeny korelační koeficienty (r) a pravděpodobnosti odchylností sklonů od nuly (P).

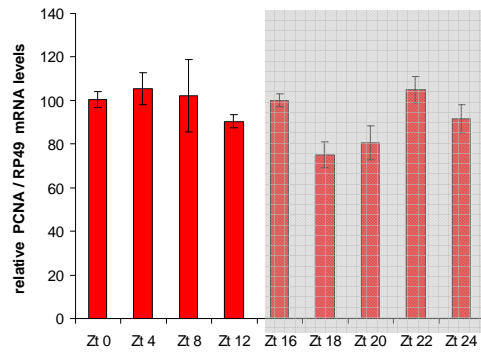
3.2 Expres PCNA

3.2.1 kvantitativní PCR

Metodou kvantitativní PCR jsme hledali rytmus v transkripci genu kódujícího PCNA u diapauzních a nediapauzních larev *C.costata*. Množství transkriptů *pcna* bylo srovnáváno vzhledem k *Rp49*, jejichž hladina je neměnná u diapauzních larev i larev pokračujících ve vývoji. Sloupcové grafy zaznamenávají změnu relativního množství mRNA transkriptů *pcna* vůči *Rp49* během jednoho dne. Transkripce tohoto genu není rytmická ani u divokých larev za krátkého dne (W.SD) ani u divokých za dlouhého dne (W.LD) (Obr. 10, 11).



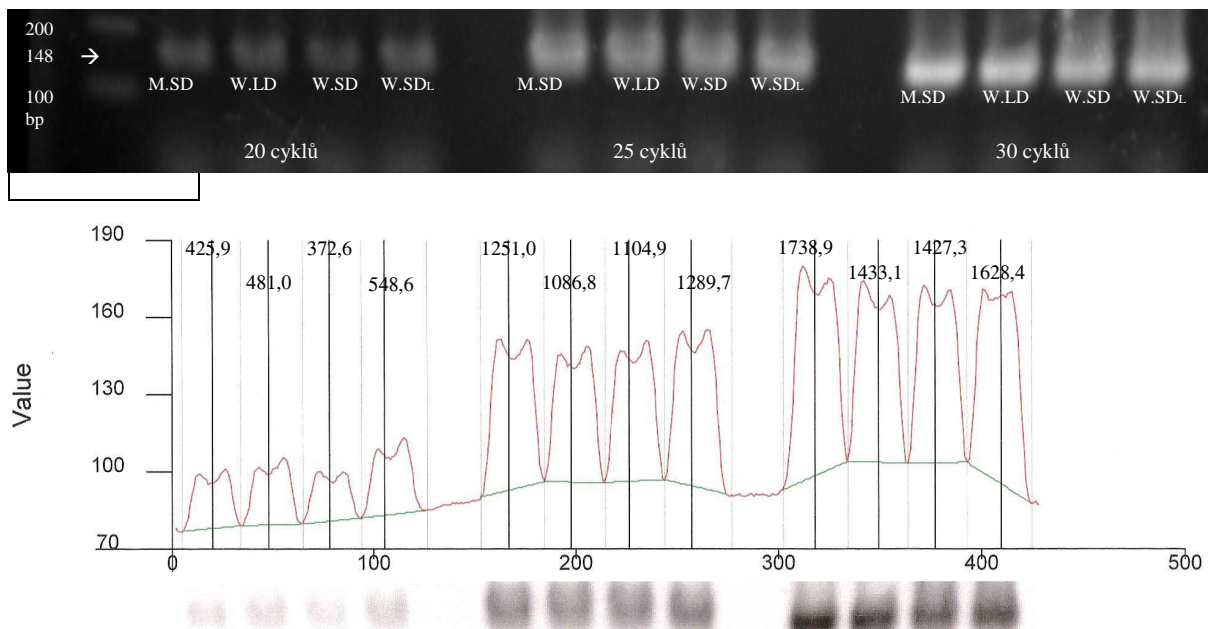
Obr. 10 Hladina mRNA transkriptů *pcna*/*RP49* v jednotlivých Zt časech (Zeitgeber) u divokých larev vyvíjejících se za krátkého dne (W.SD). V grafu jsou zahrnuty směrodatné odchylky.



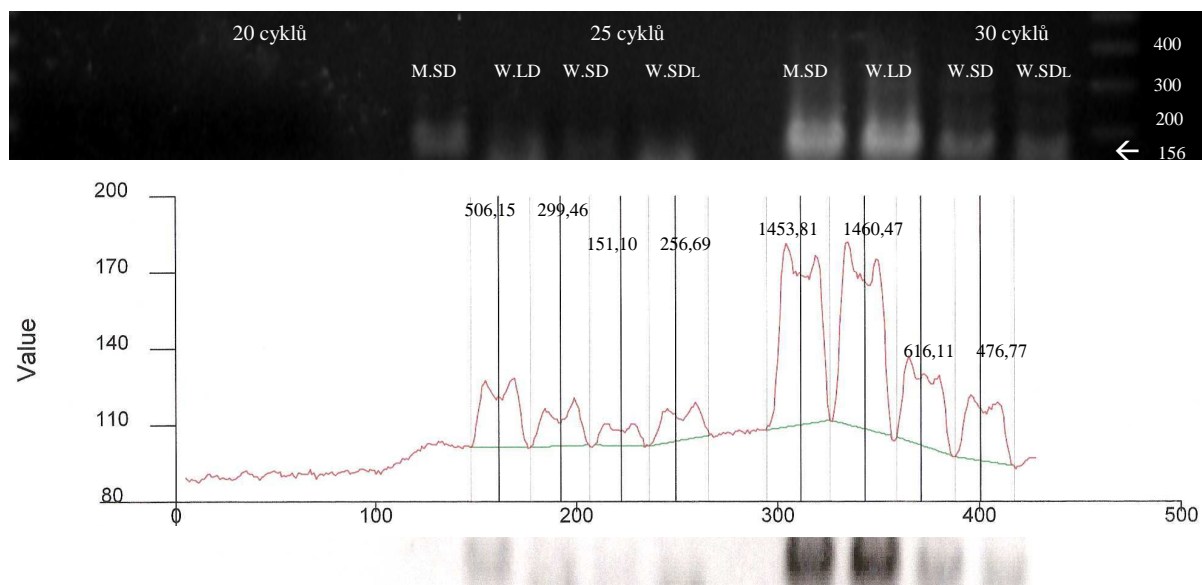
Obr. 11 Hladina mRNA transkriptů *pcna*/*RP49* v jednotlivých Zt časech (Zeitgeber) u divokých larev vyvíjejících se za dlouhého dne (W.LD). V grafu jsou zahrnuty směrodatné odchylky.

3.2.2 standardní PCR

Metodou standardního PCR jsme porovnávali přítomnost a relativní množství mRNA transkriptů pro *pcna* u různých variant. U *Rp49* se potvrdila neměnná hladina transkriptů u všech sledovaných variant (Obr. 12). Naopak v případě *pcna* byla hladina transkriptů vysoká u nediapauzních larev a výrazně nižší u larev vstupujících do diapauzy (Obr. 13). Relativní množství transkriptů jsme zjišťovali densitometricky (software Quantiscan, BioSoft).

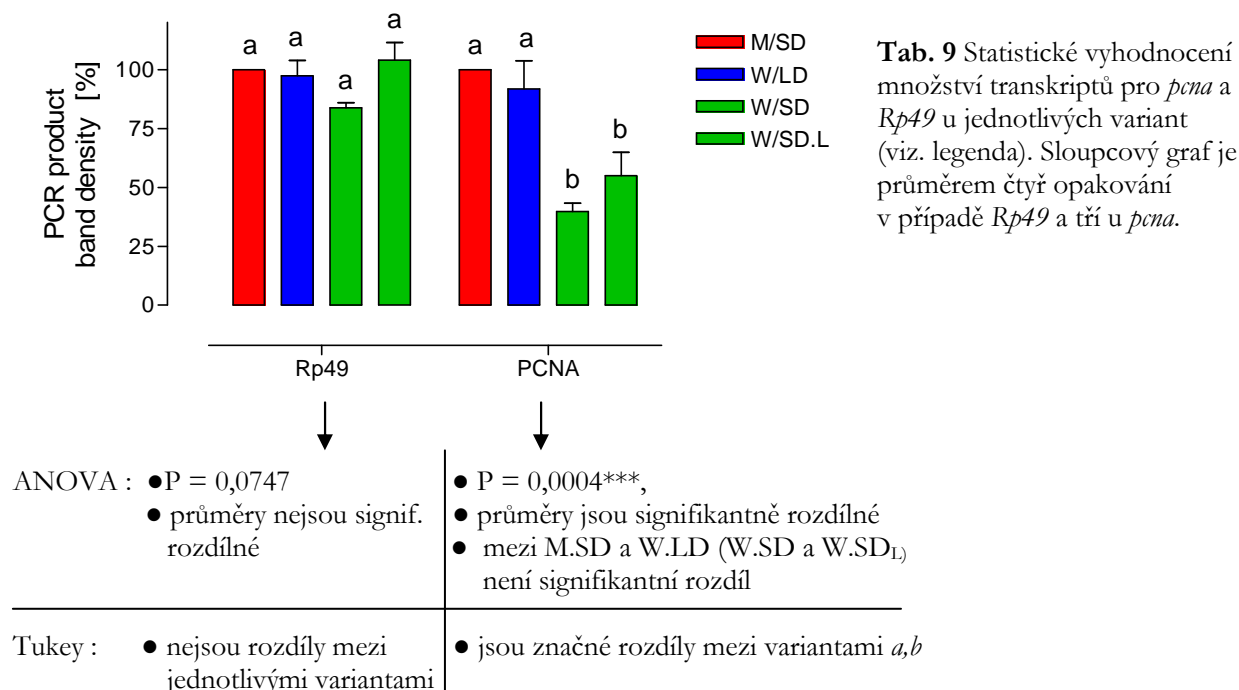


Obr. 12 Množství mRNA transkriptů *Rp49* u 20 (M.SD, W.LD, W.SD) a 40dní (W.SD_I) starých larev (vzorky z předních částí) *C. costata* po provedení PCR reakce při různém počtu cyklů (20x, 25x, 30x). Nejoptimálnějších podmínek bylo dosaženo při opakování 30 cyklů. Hladina transkriptů je konstantní u všech sledovaných variant. V horní části obrázek z agarózového gelu, spodní obrázek zachycuje densitometrické vyhodnocení.



Obr. 13 Množství mRNA transkriptů *pcna* u 20 (M.SD, W.LD, W.SD) a 40dní (W.SD_L) starých larev (vzorky z předních částí) *C. costata* po provedení PCR reakce při různém počtu cyklů (20x, 25x, 30x). Nejoptimálnější podmínky pro reakci PCR představovalo opět opakování 30 cyklů. Mutanti za krátkého dne (M.SD) nevstupují do diapauzy, transkripce *pcna* je vysoká. To samé platí pro jedince divokého kmene za dlouhého dne (W.LD). U divokých larev za krátkého dne (W.SD) je zřejmý pokles transkripce *pcna*, u čtyřicet dní starých jedinců (W.SD_L) míra transkripce stále klesá. V horní části obrázek z agarózového gelu, spodní obrázek zachycuje densitometrické vyhodnocení.

Množství transkriptů *pcna* a *Rp49* jsme statisticky vyhodnotili Tukeyho testem a ANOVOU. Podrobnosti jsou zahrnuty v popiskách tabulky (Tab. 9).



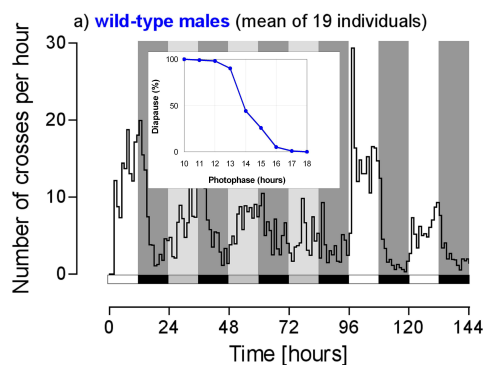
4. DISKUSE

Podle našich výše uvedených výsledků se larvy *C. costata* chovají nerytmicky. Nebyl nalezen žádný rytmus v aktivitě sledovaných enzymů (*glukoso-6-fosfát dehydrogenáza*, *amyláza*) ani v transkripci genu PCNA. Naopak divocí dospělci rytmicitu vykazují a to hned v několika ohledech. Rytmičnými projevy bylo kladení a lokomoce. Dospělí jedinci se pohybovali během dne a jejich pohyb ustával v noci. Tento rytmus pokračoval i po zhasnutí, je tedy řízen endogenně, vnitřními hodinami (Obr. 14).

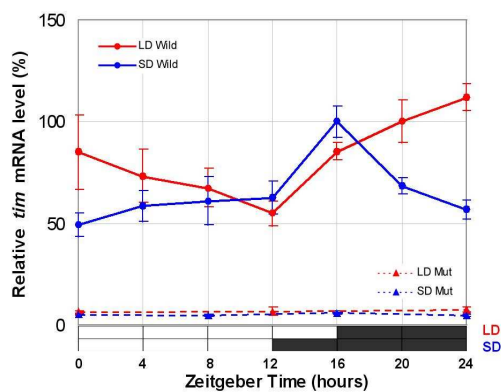
Vzhledem k tomu, že jsme u larev nenalezli rytmus v obecně rytmických projevech a zároveň, že larvy žijí v relativně stálém prostředí pod kůrou padlých stromů, dalo by se usuzovat, že larvy možná rytmické chování nepotřebují. Přesto ale u nich byl jeden jasný rytmus zaznamenán. Je jím cirkadiánní změna transkripce hodinového genu *timeless* (Obr. 15)(Košťál, nepublikované výsledky) u divokých larev. Tento rytmus nepokračuje za stálých podmínek, není tedy řízen endogenně. Má ale schopnost entrainmentu, znovunastavení (synchronizace) podle cyklických podmínek prostředí.

Otázkou tedy je, proč larvy vykazují rytmickou transkripci hodinového genu *tim*, když u nich nezaznamenáváme žádný denní rytmus ve fyziologických projevech (aktivita enzymů, trávení, buněčný cyklus). Zde se nabízí hypotéza, že nepoužívají biologické hodiny pro zajištění denní rytmičnosti, nýbrž k měření délky dne, tedy k orientaci v sezónním kalendáři. Důkazem toho mohou být *tim* mutanti, kterým chybí denní a cirkadiánní rytmicita v transkripci tohoto genu (Iwasaki a Thomas, 1997; Košťál, nepublikované výsledky). Pokud nefunguje *tim*, jsou nefunkční biologické hodiny, tím pádem také rytmické funkce a zároveň také fotoperiodický kalendář.

Dále si klademe otázku, jak fotoperioda zastaví buněčný cyklus. Při vstupu do diapauzy dochází k mnoha změnám, jednou z nich je právě zastavení buněčného cyklu. To je potvrzeno ve výsledcích, kde jsme zaznamenali výrazně nižší transkripci PCNA u larev vstupujících do diapauzy. Exprese tohoto genu má přímou souvislost se vstupem do diapauzy a její regulací. Selektivní vypnutí tohoto genu by mohlo být významným faktorem pro regulaci diapauzy. Odhadujeme, že vypnutí tohoto genu mohou zajišťovat právě vnitřní hodiny.



Obr. 14 Záznam rytmické změny lokomoce u devatenácti dospělců *C.costata* v rámci několika dní. Jedinci jsou aktivní během dne, v noci jejich aktivita ustává. Rytmičnost pokračuje i po zhasnutí, je řízena vnitřními hodinami. Při zkrácení světelné délky dne vstupují do diapauzy (Košťál, nepublikované výsledky).



Obr. 15 Rytmická transkripce hodinového genu *tim* u larev *C.costata* v průběhu jednoho dne. U larev žijících za dlouhého dne (poměr světelné a temnostní fáze 16:8hod) je transkripce *tim* mRNA nejvyšší na konci dne, u larev žijících za krátkého dne (poměr světelné a temnostní fáze 12:12hod) je transkripce maximální v šestnácté hodině (Košťál, nepublikované výsledky).

5. ZÁVĚRY

- Nebyl nalezen denní rytmus v aktivitě enzymu G₆P-DH u 16 dní starých larev mušky *C. costata* divokého ani mutantního kmene (larvy byly chovány ve dvou rozdílných fotoperiodických režimech: LD, dlouhý den; SD, krátký den);
- nebyl nalezen denní rytmus v aktivitě enzymu amylázy;
- nebyl nalezen denní rytmus v transkripci genu kódujícího PCNA;
- výsledky této práce a další nepublikované výsledky naznačují, že denní (a cirkadiánní) rytmičnost je u larev *C. costata* buď zcela nepřítomná nebo jen slabě vyvinutá (larvy žijí v relativně konstatním prostředí).

- Byl pozorován významný rozdíl v transkripci genu kódujícího PCNA v závislosti na vývojovém programu larvy *C. costata*. Larvy, které pokračují v přímém vývoji (divoký kmen za LD, mutantní kmen za LD i SD) mají relativně vysokou hladinu transkriptů *pcna*; larvy vstupující do diapauzy silně snižují hladinu transkriptů *pcna* (u larev vstupujících do diapauzy se zastavuje cyklus buněčného dělení).

6. LITERATURA

Beck, S.D. (1980). *Insect Photoperiodism*. Academic Press, New York

Berger, J. (1995). *Biorytmy*. Paseka, Praha, Litomyšl.

Claridge-Chang, A., Wijnen, H., Naef, F., Boothroyd, C., et al. (2001). Circadian regulation of gene expression systems in the *Drosophila* head. *Neuron* 32: 657-71.

Danilevskii, A.S. (1965). *Photoperiodism and Seasonal Development of Insects*. Oliver and Boyd, Edinburg.

Danks, H.V. (1987). *Insect Dormancy: An Ecological Perspective*. Biological Survey of Canada, Ottawa.

Darlington, T.; Wagner-Smith, K.; Cerians MF, Staknis, D.; Gekasis, N. et al (1998). Closing the circadian loop- induced transcription of its own inhibitors *per* and *tim*. *Science* 280: 1599-1603.

Denlinger, D.L. (1998). Maternal control of fly diapause (Rousseau, T.A. and Fox, C.W., Eds), *Maternal Effects as Adaptations*. Oxford University Press, New York, pp. 275-287.

Denlinger, D.L. (2000). *Molecular Regulation of Insect Diapause*, Elsevier Science, Chapter 18, 259-275.

Denlinger, D.L., Joplin, K.H., Flannagan, R.D., Tammariello, S.P., Zhang, M.-L., Yocum, G.D and Lee, K.-Y. (1995). Diapause-specific gene expression (Suzuki, A., Katanka, H. and Matsumoto, S., Eds), *Molecular Mechanisms of Insect Metamorphosis and Diapause*. Industrial Publishing and Consulting, Tokyo, pp. 289-297.

Dunlap, J.C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271-290.

Giebultowicz, J.C. (1999). Insect circadian clocks: is it all in their heads? *J. Insect Physiol.* 45, 791-800.

Giebultowicz, J.C. (2000). Molecular mechanism and cellular distribution of insect circadian clocks. *Annu Rev Entomol* 45: 769-793.

Iwasaki, K.; Thomas, J.M. (1997). Genetics in rhythms. *Trends Genet* 13: 111-115

Joplin, K.H., Yocum, G.D and Denlinger, D.L. (1990). Diapause specific proteins expressed by the brain during the pupal diapause of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *J. Insect Physiol.* 36, 775-783.

Konopka, R.J., Benzen, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 68: 2112-2116.

Košťál, V., Noguchi, H., Shimada, K., Hayakawa, Y. (2000a). Circadian component influences the photoperiodic induction of diapause in a drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology* 46, 417-428.

Košťál, V., Shimada, K., Hayakawa, Y. (2000b). Induction and development of winter larval diapause in a drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology* 46, 417-428.

Košťál, V.; Shimada, K. (2001). Malfunction of circadian clock in the non-photoperiodic-diapause mutants of the drosophilid fly, *Ch. costata*. *Journal of Insect Physiology* 47: 1269-1274.

Lankinen, P., Riihamaa, A.J. (1992). Weak circadian eclosion rhythmicity in *Chymomyza costata* (Diptera: drosophilidae), and its independence of diapause type. *Journal of Insect Physiology* 38, 803-811.

Leather, S.R., Walters, K.F.A. and Bale, J.S. (1993). *The Ecology of Insect Overwintering*. Cambridge University Press, Cambridge.

Masaki, S. (1980). Summer diapause. *Ann. Rev. Entomol.* 25, 1-25.

Pavelka, J.; Shimada, K.; Košťál, V. (2003). Timeless: a line between fly's circadian and photoperiodic clocks?, *Eur. Journal Entomol*, 255-265.

Riihimaa, A.J., Kimura, M.T. (1989). Genetics of the photoperiodic larval diapause in *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae), *Heredita* 110, 193-200.

Sassone-Corsi, P. (1997). Same clocks, different work. *Nature* 384: 613-614

Shimada, K. (1999). Genetic linkage analysis of photoperiodic clock genes in *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae), *Entomological Science* 2, 575-578.

Shimada, K., Kostal V., Pavelka J., Závodská R. (2004) Involvement of timeless gene in photoperiodic induction of diapause in drosophilid fly, *Chymomyza costata*. . XXII. International Congress of Entomology. August 15-21, Brisbane, Australia.

Šauman, I.; Hashimi, H. (1999). Insect clocks: What are they telling us besides time? *Entomol Sci* 2. 589-596.

Tahala, S., Wolda, H. and Delinger, D.L. (1988). Seasonal changes in the photoperiodic response regulating diapause in a tropical beetle. *J. Insect Physiol.* 34, 1135-1142.

Tauber, M.J., Tauber, C.A. and Masaki, S. (1986). *Seasonal Adaption of Insect*. Oxford University Press, Oxford.

Yoshida, T., Kimura, M.T. (1995). The photoperiodic clock in *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology* 41, 217-222.

Zaslavski, V.A. (1988). *Insect Development, Photoperiodic and Temperature Control*. Springer Verlag, Berlin.

Závodská, R. (2001). Biologické rytmy hmyzu z pohledu molekulární biologie. *Biologické listy* 4: 241-251.