

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Vztah mezi juvenilním hormonem, stárnutím a reprodukční
úspěšností samců *Pyrrhocoris apterus***

Diplomová práce

Bc. Markéta Hejníková

Školitelka: Doc. RNDr. Magdalena Hodková, CSc.
ENTÚ BC AVČR, v.v.i.

České Budějovice 2013

Magisterská práce:

Hejníková M., 2013: Vztah mezi juvenilním hormonem, stárnutím a reprodukční úspěšností samců *Pyrrhocoris apterus*. [Relationship between juvenile hormone, aging and reproductive success in male *Pyrrhocoris apterus*. Mgr. Thesis, in Czech.] – 55 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This study deals with the insect juvenile hormone and its influence on a male reproductive accessory gland, hexameric haemolymph protein, lifespan and fertility in males of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). The function of juvenile hormone is affected by interferent RNA against juvenile hormone receptor gene *Met* and its partner *Tai*. The source of juvenile hormone, the *corpus allatum*, was removed by allatectomy.

Finanční podpora:

Tato práce je součástí projektu č. P502/10/1612 financovaného Grantovou agenturou České Republiky

Prohlášení:

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

V Českých Budějovicích dne 11. 12. 2013

Markéta Hejníková

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala RNDr. Magdaleně Hodkové, CSc za umožnění spolupráce na tomto zajímavém projektu, RNDr. Ivovi Hodkovi za veselé historky a příhody, Vlastimilu Smýkalovi za cenné rady a pomoc s řešením problémů, mým partačkám a kamarádkám Kláře Mičulkové a Marcele Buřičové za podporu a pomoc v každé situaci, paní Janě Mikešové za pomoc s přípravami experimentu a v neposlední řadě své rodině za pevné nervy.

Obsah

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	2
2.1. Současné teorie stárnutí	2
2.1.1. Výzkum stárnutí na modelových organismech	2
2.2. Ruměnice pospolná (<i>Pyrrhocoris apterus</i>)	3
2.3. <i>Corpora allata</i> a juvenilní hormon	4
2.3.1. Juvenilní hormon a metamorfóza	6
2.3.2. Juvenilní hormon a reprodukce	6
2.3.3. Mechanismus působení juvenilního hormonu	8
2.4. Hexamerní proteiny hemolymfy	9
3. CÍLE PRÁCE	11
3.1. Ověřit vliv allatektomie na několik parametrů: velikost přídatných žláz, množství proteinů v přídatných žlázách, hemolymfové proteiny a přežívání.	11
3.2. Zjistit vliv RNAi- signálních molekul JH dráhy, <i>Met</i> , <i>Tai</i> a <i>Kr-h1</i> na výše zmíněné parametry.	11
3.3. Zjistit vliv allatektomie a RNAi- <i>Met</i> , <i>Tai</i> a <i>Kr-h1</i> na fertilitu.	11
4. MATERIÁL A METODY	12
4.1. <i>Pyrrhocoris apterus</i> jako modelový organismus	12
4.2. Allatektomie	12
4.3. Příprava interferentní dsRNA pro injekci do ploštic	12
4.3.1. Izolace celkové RNA <i>P. apterus</i> fenol-chloroformovou metodou	13
4.3.2. Reverzní transkripce – výroba cDNA	15
4.3.3. PCR amplifikace cDNA	16
4.3.4. Elektroforéza PCR produktu	17
4.3.5. Izolace DNA z gelu	18
4.3.6. Ligace požadovaného úseku DNA do vektoru a transformace do buněk	19
4.3.7. Izolace plasmidu z bakteriální kultury	22
4.3.8. Sekvenování zaklonovaného úseku DNA	23
4.3.9. Výroba dsRNA pomocí kitu MEGAscript®	24
4.4. Stanovení celkových proteinů v přídatných žlázách samců metodou BCA	26
4.5. SDS PAGE hemolymfových proteinů	27
4.5.1. Barvení a odbarvení polyakrylamidového gelu	28
4.6. Real – Time PCR	29

4.7. Pozorování fertility a přežívání samců <i>Pyrrhocoris apterus</i>	31
4.8. Statistické metody	31
5. VÝSLEDKY	33
5.1. Množství celkových proteinů v přídatných žlázách	33
5.2. Změny v množství hexamerních proteinů v hemolymfě	35
5.3. Délka života zkoumaných skupin samců	38
5.4. Fertilita samců v průběhu života	39
5.4.1. Priority samic při výběru pohlavního partnera	41
5.5. Míra inhibice genů <i>Met</i> , <i>Tai</i> a <i>Kr-h1</i>	43
6. DISKUZE	44
7. ZÁVĚR	47
8. POUŽITÁ LITERATURA	48

1. Úvod

Je známo, že diapauzní jedinci různého hmyzu mají podstatně delší délku života než jejich reprodukčně aktivní vrstevníci. Hlavním znakem diapauzy je nepřítomnost juvenilního hormonu a tvorba velkého množství zásobních proteinů tukovým tělesem. Samice v diapauze není způsobilá zplodit potomstvo. Díky nepřítomnosti juvenilního hormonu se vitellogenin, hlavní nutriční složka pro vyvíjející se zárodek, není schopný ukládat do vajíčka. Tento fakt je velmi dobře prozkoumán u samic ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*), rovněž jako délka života v souvislosti s pářením nediapauzních jedinců, či odebráním *corpus allatum*, jako zdroje juvenilního hormonu. Naproti tomu samci byli v mnoha ohledech doposud přehlíženi a o jejich stárnutí, ale hlavně fertilitě se mnoho neví. Proto je tato práce dá se říci inovativní a cílená právě na ně. Také je zde věnována pozornost genu *met* (odvozeno od methopren tolerant) a jeho dvěma partnerům, který je, jak se jeví dle nedávných výzkumů, hlavním receptorem pro juvenilní hormon.

2. Literární přehled

2.1. Současné teorie stárnutí

Stárnutí je přirozený, fyziologický proces vedoucí k poklesu biologických funkcí, ke snížení efektivity fungování organismu a hromadění různých defektů, jako následek menší schopnosti zvládat environmentální stres. Nejedná se o chorobný stav, ale o přirozenou součást vývoje. Časové ohraničení stárnutí je velmi obtížné a je silně individuální. Můžeme jen říci, že je to věk, kdy se začíná zvyšovat riziko úmrtí.

Otázka příčiny stárnutí je velmi diskutovaná. Na toto téma existuje v současné době mnoho teorií. Jako například genetická teorie stárnutí (dělí se do dvou velkých skupin, na teorie mutační a teorie programovaného stárnutí), teorie volných radikálů (poškozujících buněčné membrány, bílkoviny a lipidy, které se stanou signálem k apoptóze), neuroendokrinní teorie (předpokládá, že stárnutí je přesný a geneticky určený neuroendokrinní program, odehrávající se v režii epifýzy, kde hlavní roli hraje její produkt melatonin. Patří do skupiny tzv. pacemakerových teorií stárnutí), teorie působení vlivů vnějšího prostředí (působení virů a bakterií, složení potravy, ekologie životního prostředí, atd.), teorie stařeckého pigmentu (lipofuchsin-pigment z opotřebování, vznikající oxidační degradací lipidů. Buňky nemají enzymy pro jeho degradaci.), a mnoho dalších. Přesná podstata stárnutí tedy doposud známa není, ale zdá se, že ji musíme hledat v mechanismech řídicích proteosyntézu a transkripci. (Ďoubal 2000; Toen 2003; Weinert et al., 2003; Zimniak 2008)

2.1.1. Výzkum stárnutí na modelových organismech

Zásadní objev genetické mutace v signální dráze Dauer formace (v podstatě diapauzní stádium nematod) u *Caenorhabditis elegans* přivedl hlavní směr pátrání po dlouhověkosti k endokrinní soustavě. Tak zvaní *daf* mutanti se vyznačují extrémní délkou života, mnohdy s nárůstem až 200%. Tento fakt nemohl zůstat bez povšimnutí a studium senescence nabylo velkého rozmachu. Zanedlouho bylo zjištěno, že dva z mutovaných genů zapojených do Dauer formace. Gen *daf-2* a *age-1*, jsou homologem k savčímu insulin/IGF (insulin growth factor) receptoru a fosfatidyl-inositol-3 kináze (PI3). Když je DAF-2 insulin-like receptor aktivován insulin-like peptidem, vysílá signál přes kinázovou kaskádu k sobě podřízenému transkripčnímu faktoru *daf-16* (homolog FOXO u octomilek a savců), který je tímto fosforylován a udržován v cytoplasmě. *Daf-16* nemůže vykonávat svou funkci, čímž je přímo dosaženo pohlavní zralosti a rychlejšího stárnutí. Oproti tomu

v případě mutace genu *daf-2*, *daf-16* spustí transkripci genů vedoucích k diapauze a dlouhověkosti. (Tatar et al., 2003; Tatar 2004, 2010; Tissenbaum 2012).

Mutace v inzulin-like receptoru (InR) *Drosophila melanogaster* dávají vzniknout rovněž dlouhověkým jedincům a potvrzují důležitost inzulinové dráhy v regulaci senescence. Mimoto InR mutanti mají rysy společné s diapauzními jedinci: kromě delší doby přežívání i nedozrálé vaječníky a nízkou hladinu juvenilního hormonu (JH) v těle. Proto vše nasvědčuje tomu, že inzulinová dráha řídí dlouhověkost právě prostřednictvím přímé regulace syntézy a sekrece JH v místě jeho vzniku, endokrinní žláze *corpus allatum* (Tatar 2004). Dlouho byla kladena otázka, zdali efekt JH na dlouhověkost není pouze obrazem neplodnosti samic a zda reprodukce není skutečnou příčinou omezené délky života. Odpověď poskytly výzkumy prováděné na samicích *Pyrrhocoris apterus*. Pokud by produkce vajíček vykazovala negativní dopad na přežívání, potom by po chirurgickém odstranění gonád měla signifikantně narůst délka života oproti fertilm samicím. Ovšem prokazatelně delší život měly pouze samice po odebrání *corpus allatum* nikoli po ovariectomii. Tento výsledek naznačuje, že plodnost jako taková nemá efekt na přežívání a účinek JH není řízen skrze vaječníky (Hodková 2008; Hodková et al., 2011).

2.2. Ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*)

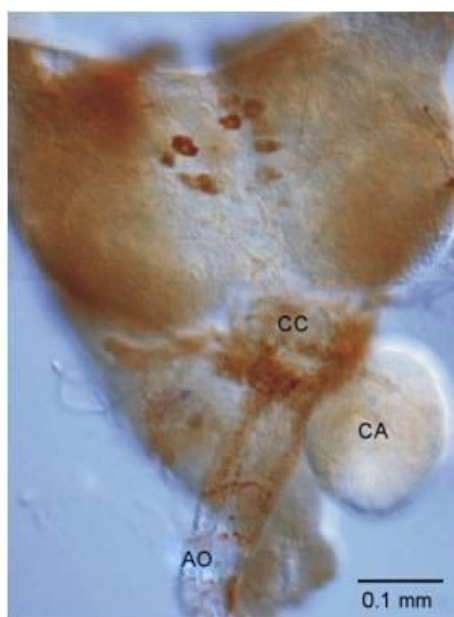
Ruměnice pospolná, dříve bezkřídlá, je běžný druh rozšířený napříč palearktickou oblastí, spadající do řádu *Hemiptera*, podřádu *Heteroptera* a čeledi *Pyrrhocoridae*. Ojedinelý výskyt byl popsán i v USA a Indii. (Socha 1993; Kristenová et al., 2011). Živí se převážně sáním šťáv ze semen a plodů některých druhů rostlin (zejména z rodin *Asparagaceae*, *Betulaceae*, *Boraginaceae*, *Cornaceae*, *Fabaceae*, *Lamiaceae*, *Malvaceae*, *Rosaceae*, *Tiliaceae* a další) (Kristenová et al., 2011), ale svůj jídelníček obohacuje i o vajíčka jiného hmyzu a mrtvé živočichy. V extrémních případech se uchyluje i ke kanibalismu.

Přes zimu hibernující imaga se ve zdejších klimatických podmínkách probouzí k životu v prvních teplých jarních dnech mezi březnem a dubnem, kdy lze pozorovat i první pářící se páry (Žďárek 1970). Samička klade na vlhká místa snůšku o velikosti asi 60 vajíček, ze kterých se v závislosti na teplotě během 7- 14 dnů vylíhnou světle oranžové larvy. Za nízkých teplot pod 18°C se doba líhnutí prodlužuje až na 24 dní (Socha, 1993). Nymfa za svůj život projde pěti vývojovými stádii (instary), než se přemění v dospělce (imago). Poslední imaginalní stádia se objevují v září. Celý proces vývoje trvá přibližně 120 dní a dospělí jedinci se již nepáří, ale rovnou vstupují do diapauzy, ve které setrvávají až do

následujícího jara. Ruměnice pospolná patří tedy ve středoevropských klimatických podmínkách k univoltinním živočichům (Žďárek 1970; Honěk et al., 1976).

2.3. *Corpora allata* a juvenilní hormon

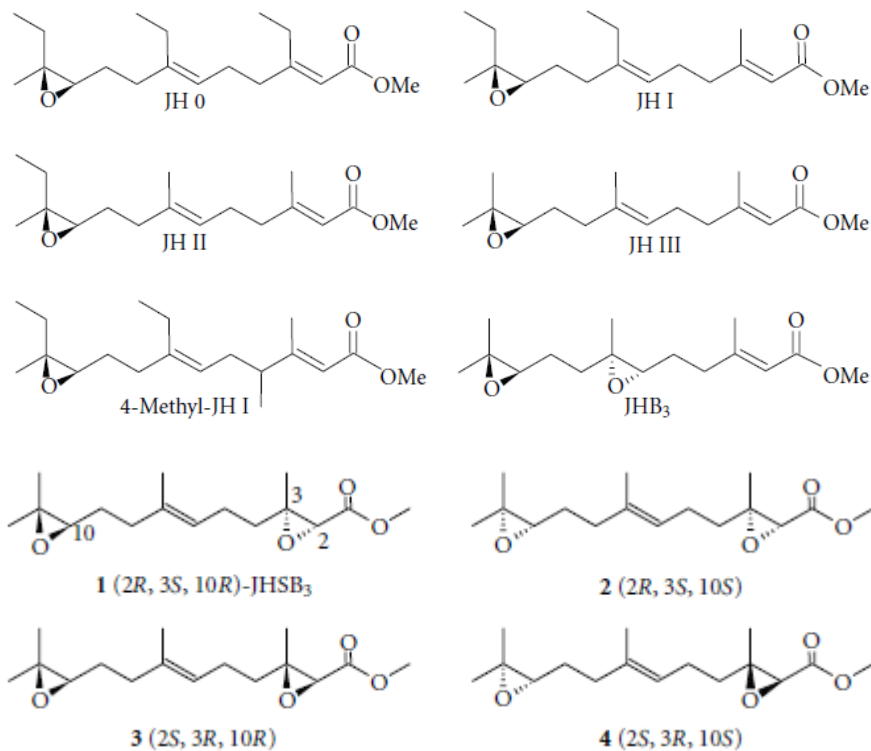
Corpora allata (CA) jsou párový orgán patřící do cerebrálního neuroendokrinního systému hmyzu. Spolu s *corpora cardiaca* (CC) jsou součástí tzv. retrocerebrálního komplexu umístěného v blízkosti hltanu a společně ovlivňují množství fyziologických funkcí a dějů. U řádu *Hemiptera* a *Diptera* splývají v jeden orgán označovaný *Corpus allatum* (obrázek 1) (Raina et al., 2008; Shuh et al., 1995; Kodrík, 2012). Struktura CA je uniformní, složená pouze z jednoho typu buněk naplněných množstvím neurosekretorických granulí (Özlük1 et al. 2011). Důležitost těchto žláz popsal poprvé V. B. Wigglesworth ve své práci již v roce 1936, kde poukazuje na spojitost s vývojem a reprodukcí (Wiggelesworth 1936)



Obrázek 1: Mozek *P. apterus*. CC – corpora cardiaca, CA – corpus allatum, AO – aorta. Zdroj Hodkova (2008)

Hlavní úlohou *corpora allata* je tvorba a sekrece juvenilního hormonu (JH). Ten je odtud odváděn výhradně pomocí transportního proteinu JHBP (juvenile hormone binding protein), který ho chrání před degradací esterázami a komplex juvenilní hormon – JHBP je hemolymfou rozváděn k cílovým tkáním. (Riddiford 1996). Biosyntéza a koncentrace titru v hemolymfě musí být velmi pečlivě regulována na mnoha úrovních. Neuropeptidy

allatostatiny a allatotropin, produkty neurosekretorických buněk mozku, inhibují, respektive stimulují přímo funkci CA. Významným regulátorem jsou i ekdysteroidy, jejichž vysoký titr působí supresivně, zatímco nízká hladina dává signál k tvorbě JH. Neurotransmitery, zejména biogenní aminy (octopamin, dopamin, L-glutamát) se také účastní řízení syntézy, stejně jako malé neuropeptidy (Hiruma 2013). V posledních letech se rovněž začal zkoumat vliv nutričních podmínek a ovlivnění syntézy juvenilního hormonu skrze inzulinovou signální dráhu a inzulinový receptor *InR* (Tatar 2004).



Obrázek 2: molekulární struktury známých juvenilních hormonů. JHSB₃ je zobrazen ve čtyřech svých izoformách. Zdroj: Kotaki et al. (2012)

Juvenilní hormon je sesquiterpenoid odvozený od farnezolu, vyskytující se v několika formách (obrázek 2), jejichž zastoupení se mezi druhy liší. Nejjednodušší a nejrozšířenější je JH-III (Hemiptera, Hymenoptera, Coleoptera, Orthoptera). JH-0, JH-I a JH-II jsou prozatím prokázány jen u Lepidoptera. Pro vyšší Diptery je specifický JHB₃. Nicméně pro podřád Heretoptera byl JH dlouho neidentifikován. Jeho strukturu se podařilo popsat teprve nedávno a byl nazván JHSB₃ (juvenile hormone-III skipped bisepoxide) (Riddiford 2008; Kotaki et al., 2012; Hiruma 2013). V neustálém středu zájmu mnoha vědeckých prací je díky svým pleiotrofním účinkům během celého hmyzího života. Od

syntézy vitellogeninů, embryogeneze, přes larvální svlékání a metamorfózu až po ovlivnění kastovního systému společenského hmyzu, polymorfizmu a nástupu diapauzy (Hartfelder 2000).

2.3.1. Juvenilní hormon a metamorfóza

Spolu s ekdysteroidy hraje klíčovou úlohu při svlékání mezi jednotlivými larválními instary nebo při metamorfóze do dospělé. Přítomnost JH v hemolymfě larvy brání nástupu dějů vyvolávajících transformaci v imágo (hemimetabola) nebo kuklu (holometabola) a udržuje jedince v nedospělém, juvenilním stavu. Odtud si získal JH své jméno. (Hiruma 2013). Když larva v posledním instaru dosáhne kritické hmotnosti nebo mozek rozpozná správný počet instarů, jak je tomu právě u *P. apterus* (Hodková 1979), klesne hladina titru JH. Tento pokles stimuluje laterální neurosekretorické buňky mozku k uvolnění prothoracikotropního hormonu (PPTH), který vyvolá syntézu ekdysonu v prothorakálních žlázách. Ekdyson vyvolá změnu exprese genů a nastolí cestu vedoucí k larválně – imaginální přeměně. U homometabol je proces více komplikovaný. Po prvním uvolnění ekdysonu se spustí larválně – kuklová proměna a dojde k vylítní malého množství JH, čímž se stabilizují imaginální disky. Tím je zabráněno přímé přeměně v imago a umožněn vznik kukly. Metamorfóza je dokončena teprve po druhé vlně příbytku ekdysonu, zapříčiněnému opětovným poklesem hladiny JH (Riddiford 1996; Hartfelder 2000; Hiruma 2013).

2.3.2. Juvenilní hormon a reprodukce

Jestliže účinek juvenilního hormonu před metamorfózou byl na základě potlačení genové exprese, pak v době dospělosti je tomu zcela obráceně. Jeho stimulační efekt se projevuje v reprodukčních pochodech nejspíše u všech druhů hmyzu. Tento aspekt působení je dobře prozkoumán u samic, které při deficienci JH jsou zcela neplodné. Stimuluje růst folikulů, reguluje syntézu vitellogeninu v tukovém tělese a zajišťuje jeho transport a uložení do oocytů. (Hartfelder 2000; Wilson et al., 2003; Raikhelet al., 2005). Jak významnou roli hraje v reprodukčním systému samců, není zcela jasné. Zdá se, že může mít stimulační efekt u pozdní spermatogeneze, zejména u diapauzních druhů, kdy současně urychluje spermatogenezi a zároveň přerušuje diapauzu (Raikhel et al., 2005). Jiná studie provedená na kočičích blechách, ukazuje nezbytnost JH při transportu spermií do nadvarlat (Dean et al., 1997). Ovšem nejznámější a nejprobádanější oblastí působení JH v samčím reprodukčním systému je stimulace přídatných žláz. Za nepřítomnosti JH se rapidně zmenší velikost těchto žláz, stejně jako množství proteinů, které produkují. Mechanismus, jakým deficiencie JH

tohoto snížení dosáhne je neznámý (Yamamoto et al., 1988; Piulach et al. 1992; Raikhel et al., 2005 Parthasarathy et al., 2009).

2.3.2.1. Přídavné žlázy

Napříč hmyzím spektrem nabývají rozličných forem od jednoduchých párů histologicky i morfologicky totožných trubic, po komplexní diferenciovanou soustavu kanálů. Jsou tvořeny epiteliálními buňkami s vysokým obsahem drsného endoplasmatického retikula, vyvinutým Golgiho komplexem a velkým jádrem s několika jadérky. Povrch buněčné stěny je pokryt mikrovilli (Fernandez. et al. 2005; Raikhel et al. 2005). Žlázy sekretují množství uhlohydrátů, lipidů a glykoproteinů. Jen u *D. melanogaster* bylo doposud identifikováno asi 112 z těchto proteinů. Primární funkcí sekretu je výživa a ochrana spermií během transportu do samice, případně tvorba spermatoforu – specializovaného útvaru obklopujícího shluky spermií. Mohou usnadnit vstup do samičí spermatéky a zároveň inaktivovat cizí spermie v případě, že se samice následně páří s jinými samci nebo vytvořit zátku, která ucpe pohlavní trakt samice. Rovněž slouží i jako ochrana oocytů před mikrobiální infekcí. Některé komponenty mohou dokonce opustit reprodukční trakt a ovlivnit samotné chování a fyziologii pářících se samic. Činí samici méně atraktivní pro jiné samce nebo navozují nechuť k dalšímu páření, napomáhají zrání vajíček a upravují ovipozici. (Monsma et al., 1990; Šauman et al., 1997; Gillott. 2003; Fernandez et al., 2005; Socha et al., 2004; Raikhel et al. 2005; Parthasarathy et al., 2009). Studie naznačují, že k takovému ovlivnění může docházet prostřednictvím stimulace samičího CA k další produkci juvenilního hormonu (Moshitzky et al., 1996; Fan et al. 1999). Možná právě díky těmto účinkům tzv. sex – peptidů dochází u oplodněných samic k podstatnému snížení délky života (Chapman 2001; Kubli 2003).

2.3.2.2. Sexuální chování

Zatím co u samiček je role juvenilního hormonu v sexuálním chování více méně zřetelná (bez JH jsou neplodné), u samečků se vztah mezi sexuální aktivitou a juvenilním hormonem napříč druhy různí. Například samečci *D. melanogaster* bez receptoru JH mají mnohem menší sexuální apetit než normální kontrolní samečci. (Wilson et al., 2003). Podobně odstranění CA samcům *Schistocerca gregaria* zapříčinilo podprůměrné sexuální chování (Pener 1967). Zato u některých druhů *Calliphora* nebo *Rhodnius* allatektomie nemá žádný vliv (Barth 1962).

Samečci *Pyrrhocoris apterus* se začínají pářit 3-5 den po imaginálním svlékání a jejich sexuální aktivita se během života v podstatě nemění. Oproti tomu samičky začínají být

reprodukčně aktivní okolo pátého dne a jejich ochota k páření cyklicky kolísá v korespondenci s oogenezí. Odebrání CA u reprodukčně aktivních samců téměř sexuální aktivitu neovlivňuje, ale implantace CA do diapauzních samců, kteří se normálně nepáří, má za následek takřka kompletní aktivaci během 3-4 týdnů. Sexuální chování je tedy zřejmě řízeno z nervového centra mozku, které je aktivováno JH (Žďárek 1968). Podrobnější výzkum přinesl poznatek, že odstranění *pars intercerebralis* (PI) z mozku stimuluje pářící se aktivitu diapauzních samců, protože je odstraněna jak inhibice stimulačního centra pářícího chování (leží mimo PI), tak inhibice CA. Odstranění PI i CA má za následek jen přechodnou pářící aktivitu, protože chybí stimulační účinek CA. U reprodukčně aktivních samců PI ani CA nemají na sexuální chování vliv, neboť je vysoká aktivita stimulačního centra udržována pouze dlouhým dnem (Hodková 1994).

2.3.3. Mechanismus působení juvenilního hormonu

Hledání receptoru juvenilního hormonu, který zprostředkovává jeho akce, bylo pravděpodobně z důvodů chemické jedinečnosti dlouhé a obtížné a přineslo dva hlavní kandidáty: Ultraspiracle (USP) a Methoprene-tolerant (*Met*), oba objevené při studiích na mušce *Drosophila melanogaster*. Současný výzkum se přiklání spíše k *Met*, co by hlavnímu receptoru JH, nicméně o toto téma se vedou neustále spory. USP byl zatím obecně vnímán jako partner ekdysonového receptoru, nezbytný při larválním svlékání. Objevuje se i myšlenka, že *Met* je vazebným partnerem JH pouze v případě, kdy USP nemůže JH vázat sám (to je u brouků a menšího odvozeného hmyzu) (Riddiford 2008).

Met byl imunochemicky lokalizován v cílových tkáních juvenilního hormonu (folikulární buňky vaječné komory samic, přídatné žlázy a tkáň ejakulační trubice samců a většina tkání larev a kukel), a to vždy pouze v jádrech buněk. Načež byl identifikován jako nový člen helix-loop-helix Per-ARNT-Sim (bHLH-PAS) rodiny transkripčních faktorů. PAS proteiny typicky pracují jako heterodimery s jiným PAS proteinem nebo s nukleárním receptorem jako koaktivátorem (Wilson et al., 2003). Hlavním důvodem pro zpochybňování *Met* jako receptoru JH byl zřejmě jeho paradoxní účinek u *Drosophila melanogaster*, která je schopná vyvinout se v dospělého jedince i při deficienci genu *Met*. Tento zvláštní úkaz může být vysvětlen tím, že později byl objeven gen pro druhou ze 70 – 86 % identickou PAS doménu – *germ cell expressed* (*gce*). Navíc se ukázalo, že *Met* zcela netypicky tvoří homodimery, nebo právě heterodimery s *gce*, ale pouze v nepřítomnosti JH. Tudíž zcela určitě působí odlišně během larválního vývoje a během metamorfózy, kdy *Met-Met* nebo

Met-gce komplex interaguje s 20E (20-hydroxyecdysone) inducibilním transkripčním faktorem *Broad* a spustí metamorfózu (Godlewski et al., 2006; Riddiford 2008).

Světlo do problematiky přinesl výzkum na homometabolním brouku *Tribolium castaneum*, který vykazuje ve vývoji klasickou odpověď na JH a v jeho genomu je obsažen pouze jeden gen pro *Met*. Umlčením tohoto genu pomocí RNA interference dochází u larev k předčasné metamorfóze a kukly neodpovídají na vysoké dávky JH ani analogu methoprenu (Knopová et al., 2007). Další pokrok přineslo objevení genu Krüppel homolog 1 (*Kr-h1*) a jeho zapojení do metamorfózní dráhy, kde je to právě on, který se aktivně podílí na blokaci jejího předčasného spuštění napojením na transkripční faktor *Broad*. *Kr-h1* je evolučně konzervovaný JH inducibilní gen, kontinuálně transkribovaný v larvální fázi života, v kukle je transkripce zastavena a v dospělosti opět obnovena (u *D. melanogaster* se transkripce v dospělosti již neobjevuje). Korelace s výskytem JH v hemolymfě je zde více než zřejmá (Minakuchi et al., 2009). Další pokusy na larvách *Pyrrhocoris apterus*, prokázaly nezbytnost *Met* pro funkci *Kr-h1* a tím podpořily *Met* v roli hlavního receptoru juvenilního hormonu. (Knopová et al. 2011).

V reakci na přítomnost juvenilního hormonu *Met* tvoří komplex s minimálně dvěma rozličnými proteiny bHLH-PAS rodiny – proteinem cirkadiálních hodin *Cycle (cyc)* a *Taimanem (Tai)*, též nazývaným FISC nebo SRC. *Tai* je v současnosti nejznámějším partnerem *Met* a spolu stimulují funkci vaječníků a syntézu vitellogeninu. Ztráta jednoho z nich má za následek stejný stav jako absence JH během reprodukční diapauzy. Taktéž vystoupení z diapauzy díky působení JH je zprostředkováno oběma partnery. Výsledky také ukazují, že *Met* pracuje jak v průběhu larválního stádia, tak v reprodukčním období, zatím co *Tai* je potřebný jen během reprodukce a u larev je v dráze spouštějící *Kr-h1* nepotřebný. K čemu slouží syntéza *Kr-h1* i v dospělém věku se doposud nepodařilo objasnit, jisté ovšem je, že rozmanité funkce juvenilního hormonu spočívají ve společném receptoru, jehož činnost je v průběhu života s největší pravděpodobností upravována různými komponenty. (Smýkal et al., 2014).

2.4. Hexamerní proteiny hemolymfy

Hexamerní proteiny patří do skupiny zásobních proteinů, i když jim jsou připisovány i jiné funkce jako detoxikace organismu, ochrana před infekcí a přenos některých organických molekul. Typicky se skládají ze šesti identických nebo blízce příbuzných podjednotek, každá o molekulové hmotnosti přibližně 80 kDa. Často jsou klasifikovány do tří základních skupin: (1) arylporiny - velmi bohaté na aromatické aminokyseliny, (2) na

methionin velmi bohaté hexameriny a (3) na methionin středně bohaté hexameriny – poslední dvě skupiny jsou evolučně příbuzné hemocysteimu (Burmester 1999; Martins et al., 2010; Tojo et al. 2012). Tvorba probíhá v tukovém tělese a je do značné míry potlačována přítomností juvenilního hormonu. Proto dochází k jejich prudkému nárůstu zejména v době diapauzy. Výjimečnou skupinou hmyzu jsou sarančata, u kterých naopak JH syntézu hexamerinů stimuluje.

U *Pyrrhocoris apterus* se zásobní proteiny objevují v hemolymfě v menší míře během posledního larválního instaru i během reprodukčního období, přičemž během diapauzy dochází v hemolymfě k prudké akumulaci. Po čtrnácti dnech tvoří až 15% celkových proteinů hemolymfy (Socha et al., 1992; Šula et al., 1995)

3. Cíle práce

3.1. Ověřit vliv allatektomie na několik parametrů: velikost přídatných žláz, množství proteinů v přídatných žlázách, hemolymfové proteiny a přežívání.

3.2. Zjistit vliv RNAi- signálních molekul JH dráhy, *Met*, *Tai* a *Kr-h1* na výše zmíněné parametry.

3.3. Zjistit vliv allatektomie a RNAi-*Met*, *Tai* a *Kr-h1* na fertilitu.

4. Materiál a metody

4.1. *Pyrrhocoris apterus* jako modelový organismus

Pro pokusy byli použiti samci a samice ruměnice pospolné chované v termostatech entomologického ústavu AVČR při 26°C s různou délkou dne a noci. Ta byla zvolena dle potřeby na LD-long day- 18 hodin světlo a 6 hodin tma nebo SD-short day- 12 hodin světlo a 12 hodin tma. SD ruměnice jsou díky této fotoperiodě diapauzní tedy reprodukčně neaktivní, oproti reprodukčně aktivním LD ruměnicím. Chovy byly udržovány v 0,5 l lahvích s lipovými semínky jako potravou, pitítky s vodou a složeným filtračním papírem pro zvětšení povrchu pro pohyb. V laboratorních podmínkách je vývoj v imago zrychlen. Líhnutí vajíček a přeměna mezi jednotlivými instary trvá asi 6 dní. V pátém instaru byla z chovu oddělena část jedinců a ti byli separováni na samce a samice. Čerstvě svlečená imaga byla odebrána použita k jednotlivým pokusům.

4.2. Allatektomie

Metodou zvanou allatektomie bylo samcům *Pyrrhocoris apterus* odňato *corpus allatum*, čímž se vyloučila produkce juvenilního hormonu. Samečci podrobení zákroku byli skupinově označeni jako CA a dále chováni za LD podmínek v Petriho miskách s lipovými semínky, pitítkem a složeným filtračním papírem buď jednotlivě, nebo ve skupině maximálně tří jedinců podle pokusu, pro který byli určeni.

Postup:

Nově svlečené samce odebereme a ponecháme dva dny bez přísunu potravy pouze o vodě, aby došlo k redukci tukové tkáně pro lepší operační podmínky. Před samotným zákrokem samečky narkotizujeme ve vodě, následně přeneseme do Ringerova roztoku a v něm operujeme. (Pozn.: Složení roztoku: NaCl 7,5g, KCl 0,1g, NaHCO₃ 0,2g, CaCl₂ 0,2g, H₂O 1000ml). Nejprve nařízneme krční membránu nad thoraxem, poté odstraníme případné zbytky tukové tkáně a speciálními nástroji odebereme *corpus allatum*, které je situované z pohledu operátora subaortálně. Je nutné postupovat velmi opatrně, jelikož na CA velmi těsně přiléhají *corpora cardiaca*. Po úspěšném odstranění CA jemně zasuneme hlavu ploštice do thoraxu a u místíme jí do chovné nádoby.

4.3. Příprava interferentní dsRNA pro injikaci do ploštic

RNA interference, zkráceně RNAi, je proces regulace genové exprese, kdy je degradována exprimovaná mRNA a tudíž nemůže dojít k jejímu přepsání na protein.

Vyrobená dsRNA proti požadovanému genu je po vstupu do buňky rozpoznána a rozštěpána speciální ribonukleázou zvanou Dicer na malé kousky - siRNA (small interferent). siRNA se následně váže na proteinový komplex RISC, kde je jedno její vlákno degradováno a druhé se spolu s RISC váže na komplementární úsek mRNA. Ta je zároveň tímto komplexem rozštěpena zhruba v polovině komplementární sekvence a je buněčnými mechanismy rozpoznána jako poškozená a tudíž odbourána.

Double strand RNA byla vyrobena proti genům *Met*, *Tai* a *Kr-h1v* několika krocih a injikována v množství 4μl o koncentraci 1μg/μl do pokusných samců. Do samic byla píchnuta také pro vizuální test její funkčnosti (po *Met* a *Tai* přestanou klást). Chov probíhal za LD podmínek. Metodou real-time PCR byla vyhodnocena a ověřena míra inhibice příslušného genu v přídatných žlázách.

4.3.1. Izolace celkové RNA *P. apterus* fenol-chloroformovou metodou

Při získávání RNA je nesmírně důležité pracovat velmi rychle a čistě po celou dobu izolace kvůli všudypřítomným a odolným RNAzám, štěpicím RNA. Na pracovní plochu, rukavice a pipety je vhodné používat přípravek RNasaZap®, který přítomné RNAzy inhibuje. Nutností je rovněž velmi čistý certifikovaný plast, včetně špiček s filtrem.

K extrakci RNA je výhodnější použít komerčně vyráběné směsi - usnadňují lýzu buněk a obsahují kyselý fenol (pH ≈ 4), pufr a látky stabilizující a chránící RNA před RNAzami. Přidáním chloroformu se směs po centrifugaci rozdělí na horní vodnou fázi obsahující RNA, rozhraní s bílým prstencem denaturovaných proteinů a dolní fenol-chloroformovou fázi se zbytkem proteinů a DNA, která je v kyselém prostředí ve vodě nerozpustná. Vodná fáze může obsahovat kontaminující zbytky fenolu, které se odstraní přidáním isopropanolu. RNA se díky němu precipituje a po stočení vytvoří bílý pelet na dně zkumavky.

Materiál:

- RiboZol (Ambresco)
- chloroform
- isopropanol
- 75% Ethanol- vychlazený
- RNase/DNase free H₂O
- RNase free certifikovaný plast (zkumavky, špičky s filtrem)

- RNaseZap® (Ambion)
- NanoDrop

Postup:

Vzorek tkáně *P. apterus* v 1,5ml zkumavce řádně homogenizujeme pístem. (množství použité tkáně by nemělo přesáhnout 0,1mg nebo 10% použitého reagentu). K homogenátu přidáme 1ml reagentu RiboZloll® a opakovaným vortexováním lyzujeme přítomné buňky. Necháme inkubovat 5 min. při pokojové teplotě (RT – room temperature) a poté přidáme 200µl chloroformu, důkladně protřepáváme alespoň 15 sekund. Opět necháme inkubovat 3 min. RT, následně centrifugujeme - 15 min., 14000 rpm, 4°C. Po centrifugaci vidíme ve zkumavce bílý prstenec proteinů oddělující od sebe dvě fáze. Pipetou opatrně, abychom nenasáli proteiny z prstence, odebereme vrchní vodnou fázi (asi 50% celkového objemu) a přeneseme ji do nové 1,5ml zkumavky. Přidáme 500µl isopropanolu, převrácením promícháme a inkubujeme RT 10 min. Po inkubaci centrifugujeme – 10 min., 14000 rpm, 4°C. RNA vytvoří bílý pelet na dně a boku zkumavky. Odstraníme supernatant a pelet promyjeme alespoň 1ml předem vychlazeného 75% ethanolu – vortexujeme a následně centrifugujeme 10 min, 10000 rpm, 4°C. Poté odstraníme veškerý ethanol a necháme 5-10 min volně sušit na vzduchu (nejlépe ve flow-boxu nebo na místě s minimální cirkulací vzduchu, abychom omezili možnost zanesení kontaminace). Vysušený pelet rozpustíme v 50µl H₂O. U takto připravené RNA změříme koncentraci a čistotu na NanoDropu a ověříme její integritu na agarozovém gelu. Můžeme ji po krátkou dobu skladovat při -80°C, lépe je však ihned ji použít pro reverzní transkripci.

4.3.1.1. Kontrola integrity vyizolované RNA na agarozovém gelu

Jinak řečeno gelová elektroforéza (ELFO) je separační metoda, s jejíž pomocí můžeme rozdělit směs, v tomto případě RNA, podle velikosti molekuly. K dělení dochází v elektrickém poli, kde záporně nabitá fosfátová kostra RNA putuje gelem ke kladně nabitě elektrodě – anodě. Kratší molekuly putují gelem snadněji, proto se zastaví dál než molekuly dlouhé. Dobře izolovaná totální RNA vytvoří v gelu dva celistvé pruhy (bandy), zatím co degradovaná se projeví v podobě tzv. smíru

Materiál:

- 10x TAE pufr (TRIS 24,23g, EDTA 1,86g, kyselina octový 5,72ml, H₂O 500ml)
- 1x TAE pufr (naředěný 10x TAE)

- agaróza (Sigma)
- Loading Dye buffer 6x (BioLabs)
- barvivo DNA Strain G (Serva)
- elektroforetická aparatura
- 1 kbDNA leader (Invitrogen)

Postup:

Navážíme 0,5g agarózy a zalijeme 50ml 1x TAE pufrem (vznikne 1% gel). Fázovitě roztok převaříme v mikrovlnné troubě s občasným promícháním, dokud není roztok čirý a všechna agaróza rozpuštěna. Necháme chladnout. Jakmile jsme schopni udržet nádobu v holé ruce, přidáme do gelu 1μl barviva a krouživým pohybem nádoby dobře promícháme. Nalijeme do nádoby na gel v ELFO aparatuře, vložíme hřebínky potřebné velikosti a necháme tuhnout. Při nalévání musíme dát pozor, aby se v gelu nevytvořily bublinky, které by bránily správnému pohybu molekul. Po zatuhnutí zalijeme gel 1x TAE pufrem tak, aby byl ponořený, vytáhneme hřebínky. Můžeme začít s nanášením vzorku: 2μl RNA smícháme s trojnásobným množstvím Loading Dye (6μl), opakovaným nasáváním a vypouštěním pipetou promícháme a nanese do jamky v gelu. Do jedné z jamek nanese rovněž 6μl DNA leader. ELFO nádobu uzavřeme, připojíme ke zdroji a necháme běžet na 80V asi 45 min. Po uplynutí doby separace gel vyjmeme a pozorujeme pod UV světlem, jestli se objeví očekávané dva proužky RNA.

4.3.2. Reverzní transkripce – výroba cDNA

Protože RNA získaná v předchozím kroku je značně labilní a náchylná k degradaci, využíváme schopnost enzymu reverzní transkriptázy přepsat existující RNA zpět do DNA, která je stabilnější a snadněji manipulovatelná. Navíc díky použití oligo (dT) primerům získáme ze směsi pouze mRNA, tedy funkční kopii genu – bez intronů. mRNA je typická svým polyadenilovaným úsekem na 3`konci řetězce (sekvence 100-200 A za sebou), oligo (dT) na tuto sekvenci nasedne a proces reverzní transkripce může začít. Rovněž lze použít genově specifické primery, kdy získáme mRNA jen námi zvoleného genu. Výsledkem je tzv. cDNA (copy DNA). RNasaH, nespecifická endonukleáza, přidaná na konci reakce rozštěpí veškerou nepřeepsanou RNA.

Materiál:

- SuperScript III First – Strand kit (Invitrogen)

- total RNA
- RNase free certifikovaný plast (zkumavky, špičky s filtrem)

Postup:

Připravenou totální RNA si naředíme tak, aby výsledná koncentrace byla přibližně 1µg/µl. Do sterilní zkumavky si na ledu připravíme směs: totální RNA 4µl (tedy v jedné reakci bude asi 4µg RNA), 50µM primer oligo (dT) 1µl, 10mM dNTP mix 1µl, H₂O 4µl. Směs zahřejeme na 65°C 5min- v tomto kroku RNA denaturuje a odstraňují se případné sekundární struktury, poté přendáme 2min. na led. Krátce stočíme, aby obsah neulpíval na stěnách, a odložíme na led. V nové zkumavce připravíme cDNA synthesis mix (jednotlivé složky je nutné přidávat v předepsaném pořadí): 10x RT buffer 2µl, 25 mM MgCl₂ 4µl, 0,1 M DTT 2µl, 40 U/µl RNasa OUT 1µl, SuperScript III 1µl. 10µl této směsi přeneseme do odložené zkumavky na ledu s RNA, jemně promícháme a inkubujeme 50 min. při 50°C. Poté reakci ukončíme zahřátím na 85°C po dobu 5 min. a zchladíme na ledu. V posledním kroku přidáme 1µl RNasyH a necháme inkubovat při 37°C 20 min. Je vhodné do syntézy cDNA současně zahrnout také negativní kontrolu, a to tak, že do reakční směsi nedodáme enzym restriční endonukleázu (SuperScript III). Pokud po následné PCR reakci vznikne v kontrole produkt, je to znamením kontaminace pravděpodobně genomovou DNA. Připravenou cDNA skladujeme v mrazáku v -20°C.

4.3.3. PCR amplifikace cDNA

Reverzní transkripcí jsme získali v podstatě pouze jedno vlákno DNA. Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) se nasyntetizuje vlákno druhé a současně se s použitím specifických primerů namnoží jen ta část DNA, o kterou máme zájem (v mém případě *Met*, *Tai* a *Kr-h1*). Mechanismus PCR spočívá v cyklické denuraci templátové DNA a následné renaturaci rozdělených vláken se specifickými primery (forward a reverse), které slouží jako matrice pro DNA polymerázu, dodávající nové nukleotidy na 3'konec primeru. Syntéza nových řetězců probíhá tedy vždy ve směru 5' - 3'.

Materiál:

- Templátová cDNA
- PCR Master mix (One Taq®Quick-load, BioLab)
- primery (forward-F a reverse-R)
- termocykler

Tabulka použitých primerů:

Gen	Sekvence primeru	název
<i>Met</i>	5'-ATG GTA TCC TCA TCT CCT AAG-3'	MET-F3
	5'-GTG TGT TGA TGC AGA TGA ATG-3'	MET-R1
<i>Tai</i>	5'-GCA CAT AAA GGA GCA AGA AGC A-3'	Tai-F
	5'-CAG GAG CCA AGA GGA AAA CC-3'	Tai-R
<i>Krh-1</i>	5'-AGT GTT TTC CGC AAA TAG CCT-3'	Krh1-F
	5'-CGC ATA TGT CTG TGT AGT TTC C-3'	Krh1-R

Postup:

Na ledu si připravíme pro každou dvojici primerů jednu PCR reakci o objemu 20 μ l podle následujícího rozpisu: PCR Master mix 10 μ l, primer F 0,4 μ l, primer R 0,4 μ l, templátová cDNA 1 μ l, H₂O 8,2 μ l. Promícháme pipetou a stočíme ve stolní centrifuze. dáme do termocycleru a spustíme program podle následujícího protokolu:

- iniciace denaturace 94°C/30s
 - denaturace 94°C/1 min
 - annealing (hybridizace) 56°C/35s
 - elongace 72°C/1min 30s
 - zakončení 72°C/10 min
 - ochlazení 4°C/ ∞
- } 35x

Po ukončení PCR reakce vzorky zviditelníme na agarozovém gelu.

4.3.4. Elektroforéza PCR produktu

Materiál:

- 10x TAE pufr (TRIS 24,23g, EDTA 1,86g, kyselina octový 5,72ml, H₂O 500ml)
- 1x TAE pufr (naředěný 10x TAE)
- agaróza (Sigma)
- barvivo DNA Strain G (Serva)
- elektroforetická aparatura

- 1 kb DNA leader (Invitrogen)

Postup:

Gel připravíme podle návodu v kapitole 3.3.1.1. výše. Zalijeme ho 10x TAE pufrem, vysuneme hřebínky a do jamek nanese po 10 μ l PCR produktů z předchozí úlohy. Není třeba přidávat Loadind Dye pufr neboť je obsažen již v PCR Master mixu. Do jedné jamky nanese 5 μ l DNA leadru. Elektroforetickou aparaturu připojíme ke zdroji a pustíme na 90V 50 min. Následně gel přeneseme na zdroj UV světla, kde se zviditelní vzorky DNA a marker. Všechny vzorky rychle z gelu vyřízneme a každý vložíme zvlášť do čisté předem zvážené 1,5ml zkumavky. Pokud bychom je nechali pod působením UV světla příliš dlouho, došlo by k tvorbě zlomů na dvoušroubovici. Zkumavky s vyřezanými vzorky znovu zvážíme a vypočítáme hmotnost gelu v každé z nich. Rovnou pokračujeme izolací DNA z gelu, případně je možné uchovat vzorky do druhého dne v lednici.

4.3.5. Izolace DNA z gelu

Materiál:

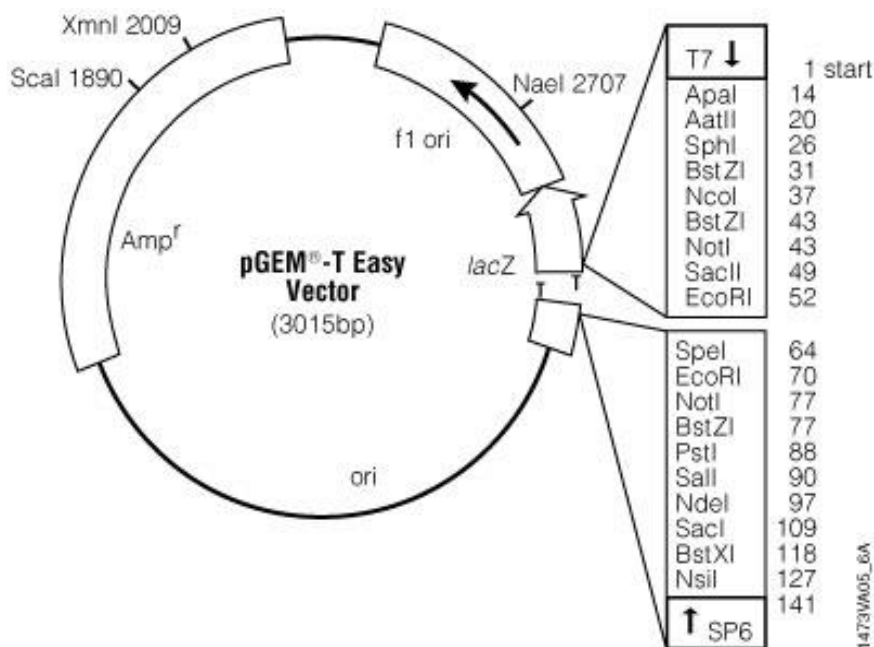
- Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel)
- zkumavky 1,5ml

Postup:

Izolaci DNA z gelu provedeme komerčním kitem od Macherey-Nagel. Ke zváženým vzorkům z předchozí úlohy přidáme NT1 pufr (na každých 100mg gelu 200 μ l pufru). S občasným promícháním inkubujeme při 50°C do úplného rozpuštění gelu. Připravíme si kolonku, která je součástí kitu, nasadíme ji na přiloženou zkumavku a nanese na ni maximálně 700 μ l pufru s rozpuštěným gelem. Centrifugujeme 11000 g 30s, poté vylijeme tekutinu, která prošla skrze kolonku do spodní zkumavky a nanese zbylé množství pufru s rozpuštěným gelem. Centrifugujeme za stejných podmínek a tekutinu opět vylijeme. Dále kolonku promyjeme 700 μ l NT3 pufru, stočíme 11000 g 30s, tekutinu vylijeme. Tento krok opakujeme ještě jednou. Nakonec kolonku stočíme ještě jednou nasucho. Poté ji přemístíme na čistou 1,5ml zkumavku a doprostřed membrány v kolonce napipetujeme 20 μ l sterilní H₂O, inkubujeme 1 min a následně 1 min centrifugujeme 11000g. Kolonku vyjmeme ze zkumavky a vyhodíme. Nyní voda ve zkumavce obsahuje purifikovanou DNA požadovaných genů. Uchováváme v mrazáku s -20°C.

4.3.6. Ligace požadovaného úseku DNA do vektoru a transformace do buněk

Ligaci zahájíme proces zaklonování genů *Met*, *Tai* a *Kr-h1* do bakteriálního plasmidu. Tím si zajistíme jejich bezpečné uchování pro pozdější opakované použití. Využijeme k tomu pGEM – T Easy Vector od firmy Promega. Tento klonovací vektor se dodává v linearizované formě a na 3' konci řetězce obsahuje přesah jeden thymin, kompatibilní k adheninovým přesahům, které vytváří většina polymeráz během PCR reakce. Usnadní se tak ligační reakce a zvýší se její účinnost. Plasmid nese také gen rezistence vůči ampicilinu a v klonovacím místě gen pro β – galaktosidázu. Při správném vložení inzertu se gen přeruší a enzym se netvoří. Klonovací oblast nese řadu restrikčních míst, které umožňují uvolnění inzertu jednotlivými restrikčními enzymy (obrázek 3).



Obrázek 3: Mapavektoru pGEM – T Easy (Promega) s vyznačenými restrikčními místy

Materiál:

- pGEM – T Easy Vector (Promega)
- inzert DNA (přečištěný produkt PCR)
- T4 DNA ligase (dodává se spolu s vektorem)
- kontrolní inzert DNA (dodává se spolu s vektorem)
- 2 x Ligation buffer (dodává se spolu s vektorem)
- 0,5ml mikrozkuavky

Postup:

Nejprve je nutné vypočítat potřebné množství inzertní DNA do ligační reakce podle vztahu:

$$\frac{\text{množství vektoru (ng)} \times \text{velikost inzertu (kb)}}{\text{velikost vektoru (kb)}} \times 3 = \text{množství inzertní DNA (ng)}$$

Množství a velikost vektoru je dána výrobcem. Velikost našeho inzertu je nám známa nebo se dá přibližně odhadnout dle markeru na gelu. Krátce stočíme na stolní centrifuze pGEM vektor a kontrolní inzert DNA. Promícháme na vortexu Ligation buffer a v 0,5 ml mikrozkušavkách (3x vzorky, 1x pozitivní kontrola, 1x background kontrola) připravíme reakce o objemu 10µl podle následující tabulky.

Reagencie	Standardní reakce	Pozitivní kontrola	Background kontrola
2x Ligation buffer	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM vektor	1 µl	1 µl	1 µl
PCR produkt DNA	3 µl	—	—
kontrolní inzert	—	2 µl	—
T4 DNA ligáza	1 µl	1 µl	1 µl
voda	0 µl	1 µl	3 µl

Obsah zkumavek lehce promícháme pipetou. Pro maximální úspěšnost ligace ponecháme inkubovat přes noc ve 4°C.

4.3.6.1. Transformace vektoru do kompetentních buněk

Připravený vektor musíme nyní vpravit do buněk, kde se spolu s nimi bude množit. K tomu nám poslouží kompetentní buňky bakterií *Escherichia coli* XL-1 blue. Bakterie mají oslabenou buněčnou stěnu, aby lépe přijímaly cizorodou DNA, proto s nimi musíme zacházet velmi opatrně.

Materiál:

- buňky *E. coli* XL-1 blue
- SOC medium (BioLabs) – 2% pepton, 0,5% kvasničný extrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukóza
- vektor s inzertní DNA

Postup:

Buňky necháme pomalu rozmraznout na ledu a rozdělíme je do mikrozkušavek po 50 μ l. Přidáme 5 μ l ligační reakce, lehce rozmícháme špičkou a odložíme 30 min na led. Současně vytemperujeme SOC medium na pokojovou teplotu a nastavíme vodní lázeň na 42°C. Zkušavku s buňkami vložíme na 50 s do vyhřáté vodní lázně, poté ihned vložíme do ledu a ponecháme chladit 2 min. Tímto provedeme transformaci teplotním šokem (heat shock). K buňkám přidáme 900 μ l SOC media a dáme inkubovat do třepačky při 150 rpm, 37°C, 1 hodinu.

4.3.6.2. *Selekce bakterií nesoucích požadovaný inzert*

Námi použitý Plasmid nese gen pro rezistenci na ampicilin, což umožňuje bakteriím, které vektor přijaly, přežít na selekční půdě s tímto antibiotikem. Netransformované bakterie na půdě hynou. Z prospívajících kolonií je nutné odlišit ty, které nesou pouze prázdný vektor od kolonií s námi vloženým inzertem. Umožní nám to tzv. modro-bílá selekce. Při správném zabudování inzertu do plasmidu se přeruší gen kódující enzym β galaktosidázu, bakterie pak není schopná metabolizovat substrát X-Gal na modře zbarvený produkt 5,5'-dibromo-4,4'-dichloro-indigo. Kolonie s inzertem PCR produktu jsou tudíž bílé, zatímco kolonie s prázdným plasmidem, tedy i funkční β galaktosidázou se barví modře.

Materiál:

- agaróza (Sigma)
- LB medium (Ducheva Biochemie)
- ampicilin (Ducheva Biochemie) - 0,1 g/ml
- X-Gal (Ducheva Biochemie) – 20 mg/ml
- IPTG – isopropyl β - D-thiogalactopyranosid (Ducheva Biochemie) –240 mg/ml
- Petriho misky – sterilní

Postup:

Začneme přípravou 250ml sterilní živné půdy, kterou budeme rozlévat do Petriho misek. Do Erlenmeyerovi baňky navážíme 2,5g agarózy, 5g LB media, doplníme destilovanou vodou do 250ml a krouživým pohybem promícháme. Necháme povařit v mikrovlnné troubě, opět promícháme a dáme sterilizovat do autoklávu na 25 min (120°C). Necháme vychladnout nejméně na 60°C a přidáme 250 μ l ampicilinu (finální koncentrace

v půdě 100 µl/ml). Promícháme a rozlijeme do Petriho misek (na misku o průměru 8 cm nalijeme asi 20 ml média). Pracujeme sterilně, v čistém neprašném prostředí nebo lépe ve flow boxu. Po zatuhnutí půdy napipetujeme 20µl X-Galu a 5µl IPTG (analog laktózy, stimuluje expresi β galaktosidázy), ihned sterilní kličkou nebo skleněnými kuličkami rovnoměrně rozetřeme a necháme krátce vsáknout do půdy. Misky s tuhým LB mediem lze připravit v předstihu a uchovávat je v lednici, ovšem X-Gal a IPTG nanášíme vždy čerstvé těsně před použitím.

Na hotové plotny nanese a rozetřeme 50µl transformovaných bakterií (inzerní gen *Met*, *Tai*, *Kr-h1*, pozitivní a background kontrola - každé na svou vlastní plotnu). Misky otočíme dnem vzhůru, aby kondenzující voda nekapala do rostoucích bakteriálních kolonií, a dáme je kultivovat do termostatu na 18 hodin při 37°C. Druhý den vybereme pozitivní kolonie (bílé) a pomocí sterilních špiček je přeneseme na čerstvé médium (vytvoříme křížky, tzv. překřížkujeme) a ze spodu na misce označíme číslem pro snadnou identifikaci kolonie. Znovu necháme narůst v termostatu za stejných podmínek. Pozitivní a background kontrolu nepřeneseme, pouze vyhodnotíme.

Dříve než budeme pokračovat v další práci s buňkami, přesvědčíme se, zda námi vybrané a překřížkované kolonie opravdu obsahují náš inzert. Malé, téměř nepatrné množství kolonie přeneseme špičkou do PCR reakce, která obsahuje specifické primery pro náš zaklonovaný fragment. PCR provádíme za standardních podmínek jako v kapitole 3.3.3 a vyhodnotíme elektroforeticky. Jelikož jsme dříve jednotlivé křížky označili číslem, snadno identifikujeme, které jsou správně zaklonovány a s těmi budeme dále pracovat.

4.3.7. Izolace plasmidu z bakteriální kultury

Plasmidy nebudeme izolovat rovnou z překřížkovaných kolonií, ale nejprve si je namnožíme v tekutém LB mediu (tzv. miniprepy) a k izolaci použijeme komerční kit. Plasmidovou DNA skaldujeme v -20°C a můžeme ji kdykoliv využít pro zpětnou transformaci a následnou izolaci nové plasmidové DNA.

Materiál:

- LB medium (Ducheve Biochemie)
- ampicilin (Ducheve Biochemie) – 100mg/ml
- izolační kit Plasmid Mini Kit (Qiagen)

Postup:

Připravíme si 2% LB medium, dáme ho sterilizovat do autoklávu na 25 min a po vychladnutí přidáme ampicilin ze zásobního roztoku (100 mg/ml) tak, aby jeho konečná koncentrace v médiu byla 100 μ g/ml. Množství media přizpůsobme počtu křížků, které podle PCR vyšly pozitivně na naše geny a které chceme dále používat. Médium rozdělíme do 2ml zkumavek a sterilní špičkou do něj přeneseme bakterie z agarové misky. Inkubujeme za stálého třepání 180 rpm při 37°C 12 – 16 hodin.

V 1,5ml zkumavkách postupně stočíme celý objem napěstovaných bakterií z miniprepů při 13000 rpm 2 min. Supernatant vylíváme do kádinky. Pelet rozsuspendujeme v 300 μ l pufru P1, přidáme 300 μ l pufru P2 a důkladně promícháme, dokud není celý obsah modrý. Následně přidáme 300 μ l předem vychlazeného pufru P3, promícháme a odložíme na 5 min na led. Suspenze by měla opět zbělet. Stočíme ji při 13000 rpm 10 min. Mezitím si nachystáme kolonky z kitu tak, že jimi necháme prokapat 1 ml QBT pufru. Dále na ně naneseeme připravený supernatant, necháme prokapat a 2x promyjeme 2ml QC pufru. Kolonky přendáme nad čisté 1,5ml zkumavky a eluujeme DNA přidáním 800 μ l QF pufru. Kolonku odstraníme a do zkumavky napipetujeme 560 μ l isopropanolu, promícháme. Vložíme do centrifugy a stočíme 14000 rpm 30 min při 4°C. Supernatant opatrně slijeme a pelet (není viditelný) promyjeme 70% ethanolom a znovu centrifugujeme za stejných podmínek. Supernatant opět vylijeme a pelet necháme volně sušit 5-10 min. Nakonec plasmidovou DNA rozpustíme ve 20 μ l H₂O a změříme její koncentraci na NanoDropu.

4.3.8. Sekvenování zaklonovaného úseku DNA

Sekvenční analýza vyrobených plasmidů je nutná, abychom se ujistili, že do požadovaných genů nebyla vnesena žádná mutace, která by mohla pozměnit nebo zablokovat jejich funkci. K sekvenování se používají primery specifické k oblasti ohraničující klonovací místo ve vektoru. Pro pGEM T-Easy Vector jsou to SP6 (ATTTAGGTGACTATAG) a T7 (TAATACGACTCACTATAGGG). Vzorčky, o požadovaném objemu a koncentraci DNA (každá laboratoř má své vlastní požadavky), jsou posílány do specializované laboratoře, osekvenovány a výsledné sekvence jsou odeslány zpět emailem, načež mohou být porovnány s genovou databází.

Postup:

Do malých 0,2 ml mikrozkušavek napipetujeme 5 μ l izolovaných plasmidů o koncentraci 500 ng/ μ l. Vyplníme příslušný formulář a vše vložíme do obálky, kterou odevzdáme na sběrném místě. Sekvenaci provede firma Seqme.cz

4.3.9. Výroba dsRNA pomocí kitu MEGAscript®

Před samotnou syntézou dsRNA pomocí MEGAscriptu je nutné vhodně upravit templátovou DNA (plasmidy s našimi geny). Plasmid musí být linearizován a poté musí být přidán fágový promotor na 5' konec tohoto regionu.

Materiál:

- RNase free certifikovaný plast (zkumavky, špičky s filtrem)
- PCR Master mix (One Taq® Quick-load, BioLab)
- termocycler
- primery (M13-F, pGem-R)
- MEGAscript® high Yield Transcription Kit (Ambion)
- Fenol (Sigma)
- směs chloroform : isoamylalkohol (24:1)
- isopropanol (Lach-Ner)
- ethanol 70% (Lach-Ner)
- Loading Dye buffer (BioLabs)

Sekvence primerů:

pGEM - R: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGGACACTATAGAATACT-3'

M13 - F: 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC- 3'

Postup:

Nejprve provedeme PCR reakci s reverse primerem, který přidá T7 sekvenci na 3' konec řetězců. Připravíme si 200 μ l PCR mixu pro každý gen (100 μ l PCR Master mix, 8+8 μ l primerů, 76 μ l H₂O, 8 μ l plasmidu naředěného na koncentraci 1 ng/ μ l) a rozdělíme ho

do 8 individuálních reakcí po 25 μ l. Vložíme vzorky do termocycleru a spustíme program dle protokolu:

- iniciace denaturace 94°C/2 min
 - denaturace 94°C/30 s
 - annealing (hybridizace) 58°C/35s
 - elongace 72°C/1min 30s
 - zakončení 72°C/10 min
 - ochlazení 10°C/ ∞
- } 45x

Hotové produkty PCR reakce (3x8 vzorků) zviditelníme na gelu a následně přečistíme podle návodů výše (kap. 3.3.4 a 3.3.5). Čisté DNA změříme koncentraci a naředíme ji na 50 ng/ μ l. Vybereme čtyři reakce od každého vzorku, se kterými budeme dále pracovat a zbytek uschováme do mrazáku na -20°C. Nyní přistoupíme k samotné syntéze dsRNA kitem MEGAscript. Necháme zcela rozpustit 10x Reaction Buffer a jednotlivé ribonukleotidy, promícháme na vortexu a krátce stočíme na stolní centrifuze. Nukleotidy držíme na ledu, ale 10x Reaction Buffer musí mít pokojovou teplotu, aby nedošlo k znovu vysrážení DNA. Připravíme si transkripční reakce o objemu 20 μ l. Jednotlivé komponenty přidáváme v předepsaném pořadí následovně (množství uvedené pro jednu reakci): 4 μ l H₂O, 2 μ l každého nukleotidu, 2 μ l 10x Reaction Buffer, 4 μ l DNA o koncentraci 50 ng/ μ l, 2 μ l T7/T3 Enzym mix. Vše opakovaným nasáváním pipetou promícháme a necháme inkubovat při 37°C 12 hodin. Během této doby se nasyntetizovalo velké množství dsRNA, ke kterému nyní přidáme 1 μ l TURBO DNasy, velmi dobře promícháme a pokračujeme v inkubaci ještě 30 min. Následně přemístíme celý objem reakcí do čistých 1,5ml zkumavek a začneme s přečištěním dsRNA od všech ostatních komponent.

Do zkumavek přidáme 115 μ l Nuclease-free H₂O, 15 μ l AmmoniumAcetate Stop Solution a důkladně promícháme. Přidáme 75 μ l čistého fenolu a 30 sekund vortexujeme. Připipetujeme stejné množství směsi chloroform : isoamylalkohol v poměru 24 : 1 a opět 30 sekund mícháme na vortexu (isoamylalkohol zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu). Stočíme v centrifuze při 13000 rpm 10 min, odebereme vrchní vodnou fázi do nové 1,5 ml zkumavky a proces opakujeme ještě jednou tentokrát jen s 150 μ l směsi chloroform : isoamylalkohol. Znovu odebereme horní fázi a přidáme k ní 150 μ l isopropanolu vychlazeného na -20°C. Vzorky necháme inkubovat přes noc v -20°C. Poté je centrifugujeme při 4°C 15 min na maximální rychlost. Vznikne pelet RNA, od kterého odstraníme

supernatant a promyjeme ho 200 μ l 70% ethanolu. Stočíme 1 min 10000 rpm a tekutinu odstraníme. Krátce sušíme na vzduchu a po odpaření zbytku ethanolu, pelet rozpustíme v 20 μ l RNasa-free H₂O.

V tomto okamžiku máme připravenou dsRNA, kterou je třeba ověřit pomocí ELFO na agarozovém gelu. Od každého vzorku odebereme 0,5 μ l, přidáme 9,5 μ l H₂O a 2 μ l Loading Dye pufru. Naneseme do jamek v gelu a pustíme na 50 min při 100V (gel připravíme stejně jako v kapitole 3.3.1.1). Pod UV světlem zkontrolujeme přítomnost proužků o správné velikosti. Nyní zbývá jen změřit koncentraci dsRNA Nano Dropu a naředit ji na 1 μ g/ μ l. Takto je připravená k injikaci do *P. apterus*. Nespotřebovanou dsRNA uchováváme při -20°C.

4.4. Stanovení celkových proteinů v přídatných žlázách samců metodou BCA

Jedná se o spektrofotometrickou metodu, jejíž jméno je odvozeno od kyseliny bicinchoninové. Podstatou je redukce Cu⁺²iontů na Cu⁺¹ navázáním na peptidovou vazbu proteinu v alkalickém prostředí (tzv. biuretová reakce). Chelatací dvou molekul kyseliny bicinchoninové a jednoho iontu Cu⁺¹ vzniká ve vodě rozpustný modrofialový komplex s absorpčním maximem při 562 nm. Absorbance roztoku je pak přímo úměrná množství proteinů. Nicméně na barevné reakci se nepodílí jen množství peptidových vazeb, ale i makromolekulární struktura proteinu a přítomnost některých aminokyselin (cystein, cystin, tryptofan, tyrozin). Proto je celková koncentrace proteinu vztažena k řadě standardních roztoků o známé koncentraci běžného proteinu, jako je bovinní sérový albumin (BSA).

Materiál:

- Pierce ® BCA Protein AssayKit (ThermoScientific)
- 50 mM KPO₄ pufr (monobasické KH₂PO₄ 340 mg /100ml H₂O, dibasické K₂HPO₄ 871mg/100ml H₂O, - přidáváme monobasický roztok k dibasickému dokud nedosáhneme pH 7.0; na závěr přidáme 41,6 mg EDTA /100 ml roztoku)
- miktotitrační destička
- 0,5 ml zkumavky
- streptomycin 10%

Postup:

Čtrnáct dní starým samečkům *P. apterus* z pokusných skupin (LD, SD, CA, met, tai, kr-h1), chovaných odděleně od samic, odejmeme přídatné žlázy a vložíme je do zkumavky s 50 μ l KPO₄ pufru, vždy po čtyřech kusech. Dáme zamrazit do tekutého dusíku. Po nashromáždění dostatečného množství vzorků je necháme rozmraznout. Vzorky nejprve homogenizujeme mechanicky pístem a poté ještě sonikací. Do každé zkumavky přidáme 5 μ l streptomycinu. Promícháme na vortexu a inkubujeme 15 min při pokojové teplotě. Centrifugujeme 10 min při 4°C 3000 g. Připravíme si pracovní roztok (WR) smísením reagentu A s reagentem B v poměru 50 : 1. Dále si připravíme ředící řadu roztoků albuminu v KPO₄ pufru pro sestavení kalibrační křivky. Na mikrotitrační destičku nanese 200 μ l WR a do jamky přidáme 10 μ l vzorku a řadu standardů, promícháme opakovaným pipetováním a inkubujeme 30 min při 37°C v naprosté tmě. Na spektrofotometru (Spectra Max 384 – Molecular Devices) změříme absorbanci při vlnové délce 562 nm a ze zjištěných hodnot ředící řady standardu sestavíme kalibrační přímku. Obsah proteinů v jednotlivých vzorcích vypočítáme z rovnice kalibrační přímky.

4.5. SDS PAGE hemolymfových proteinů

SDS PAGE, neboli elektroforéza na polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsulfátu sodného, je separační metoda, která díky přítomnosti SDS dělí makromolekuly proteinů pouze na základě jejich molekulární hmotnosti tím, že je linearizuje a dodává všem stejný záporný náboj. Proteiny jsou na gelu zviditelněny roztokem barviva coomassie blue, které se v kyselém prostředí váže na jejich struktury a dochází k barevné změně, která je úměrná množství proteinu.

U jednotlivých pokusných skupin se zaměříme především na změny v obsahu zásobních proteinů, tzv. hexamerinů, jejichž molekulová hmotnost by se měla pohybovat v rozmezí 70 – 90 kDa (Hyršl, 2006)

Materiál:

- pufr A pH 8,8
(Tris 22,75 g, 10% SDS 5 ml, pH upravit koncentrovanou HCl, H₂O doplnit do 500ml)
- pufr B pH 6,8
(Tris 5,25 g, 10% SDS 3,5 ml, pH upravit koncentrovanou HCl, H₂O doplnit do 350 ml)

- polymerační roztok A
(akrylamid 30 g, bisakrylamid 0,8 g, doplnit do 100 ml pufru A)
- polymerační roztok B
(akrylamid 30 g, bisakrylamid 0,8 g, doplnit do 100 ml pufru B)
- elektrodový pufr pH 8,3
(glycin 23,83 g, Tris 2,2 g, 10% SDS 20 ml, pH upravit koncentrovaným roztokem Tris, H₂O doplnit do 2000 ml)
- vzorkový pufr redukující
(pufr B 25ml, glycerol 5ml, 10% SDS 10ml, bromfenolová modř 5mg, merkaptoethanol 2,5 ml, doplnit H₂O do 50 ml)
- vertikální elektroforetická aparatura (Bio-Rad)
- TEMED – tetramethylethylenediamin (Serva)
- Persíran amonný (Lach – Ner)
- proteinový marker - Prestained Protein Ladder (BioLabs)

Postup:

Začneme přípravou gelů pro dvě elektroforetické desky. Spodní gel – separační 10%, připravíme smísením 6ml pufru A, 3ml polymeračního roztoku A a 7,5μl TEMED. Horní gel – velkopórový 3%, 3,375ml pufru B, 0,375ml polymeračního roztoku B a 3,75μl TEMED. Těsně před naléváním do desek přidáme na špičku špachtle persíran a promícháme. Nejprve vléváme separační gel a následně na něj gel velkopórový. Vložíme hřebínky a necháme 30 min tuhnout. Mezitím si připravíme vzorky hemolymfy, odebrané z tykadel čtrnáct dní starých samců *P. apterus*. K 2μl hemolymfy přidáme 95μl redukujícího vzorkového pufru, promícháme a 10 min povaříme. Následně centrifugujeme 10 min 10000 g. Desky se ztuhlým gelem umístíme do elektroforetické aparatury a nalijeme mezi ně elektrodový pufr. Vytáhneme hřebínky a nanese do jamek 10μl supernatantu, který jsme před tím přenesly do čistých zkumavek. Do jedné jamky v každém gelu nanese rovněž 10μl proteinového markeru. ELFO necháme běžet 2 hodiny na 100 V.

4.5.1. Barvení a odbarvení polyakrylamidového gelu

Materiál:

- coomassie brilliant blue R – 250 (Sigma)

- 50% ethanol
- 10% kyselina octová - koncentrovaná (Lach-Ner)
- třepačka s kruhovým pohybem (Rotamax 120, Heidolphinstruments)
- Petriho miska o průměru cca 17 cm

Postup:

Následujícím způsobem si připravíme barvicí lázeň: navážíme 1,25g coomassie blue a rozpustíme v 230ml ethanolu. Přefiltrujeme, abychom odstranily případné hrudky barviva. Přidáme 46ml koncentrované kyseliny octové a doplníme vodou do 500ml. Do velké Petriho misky přeneseme gel se vzorky a přelijeme ho barvicí lázní tak, aby byl celý ponořený a volně se pohyboval. Misku přikryjeme víčkem a umístíme na třepačku, kde necháme gel 4 hodiny za stálého míchání barvit. Poté ho vytáhneme, opláchneme destilovanou vodou a vložíme do čisté Petriho misky. Opět gel přelijeme, tentokrát však odbarvovací lázní, která byla připravena smísením ethanolu, konc. kyseliny octové a vody v poměru 25 : 10 : 65. Misku umístíme na třepačku a odbarvujeme. Lázeň v průběhu odbarvování několikrát vyměníme za čistou, dokud nezůstane čirá nebo jen s lehkým nádechem modré. Po odbarvení na gelu zůstanou jen modré proužky přítomných proteinů, které vyhodnotíme na denzitometru (GS 800, Bio-Rad)

4.6. Real – Time PCR

Díky metodě real - time PCR můžeme zjistit na kolik je vytvořená dsRNA účinná, tím že kvantifikujeme míru exprese námi potlačeného genu. RT – PCR je založena na klasické PCR s tím rozdílem, že přístroj dokáže kontinuálně snímat přírůstky DNA během každého cyklu. Podmínkou je ovšem přítomnost fluorescenčního substrátu. Nejběžněji používaným je SYBR Green, který se nespecificky váže na dvouvláknovou DNA a emituje záření. S přibývajícím množstvím DNA se zvyšuje i síla fluorescence.

Materiál:

- primery (forward-F a reverse-R)
- termocycler
- iQ™ SYBR® Green supermix (Bio – Rad)
- cDNA injikovaných ploštic
- 96 jamková RT destička (Bio – rad)

Tabulka použitých primerů:

Gen	Sekvence primeru	název
<i>Met</i>	5'-TTCTGATGATGGTGAAAAGATG-3'	MetRT-F
	5'-TAT CGC CCC TGA CTA CTT GG-3'	MetRT-R
<i>Tai</i>	5'-ACACGGGAAGCAGCATAAAC-3'	TaiRT-F
	5'-AGAGGCGAGAACGCATAAGA-3'	TaiRT-R
<i>Kr-h1</i>	5'-CCCTACCAGTGTAACCTTTTGC-3'	Krh1RT-F
	5'-GAACGTCTTGTTACACACACC-3'	Krh1RT-R
rp49	5'-CCGATATGTAAACTGAGGAGAAAC-3'	rp49-F3
	5'-GGA GCA TGT GCC TGG TCT TTT-3'	rp49-R1

Postup:

Provedeme pitvu alespoň patnácti čtrnáct dní starých samců, kteří byli první den po svlečení injikováni dsRNA proti genům *Met*, *Tai* a *Kr-h1* a odebereme jim přídatné žlázy. Ze žláz izolujeme celkovou RNA a poté vyrobíme cDNA podle postupů výše (kap. 4.3.1 a 4.3.2.). Rovněž si připravíme cDNA čtrnáct dní starých kontrolních LD samců, ke kterým budeme expresi *Met*, *Tai* a *Kr-h1* vztahovat. Abychom mohli srovnat míru exprese, musíme sledovat kromě našich genů i gen referenční tzv. house keeping, který se vyznačuje kontinuální, nekolísavou expresí v čase. K tomuto účelu nám poslouží gen pro ribozomální protein 49 (rp49).

Reakci budeme provádět v objemu 20μl, a to 16μl reakční směsi + 4μl cDNA. Reakční směs si připravíme smísením: 10μl iQ™ SYBR® Green supermix, 0,5μl + 0,5μl primerů, 5μl H₂O. Pro menší pracnost a přesnější pipetování si směs nachystáme ve velkém objemu pro každý gen odděleně (*Met*, *Tai*, *Kr-h1* i *rp49*), který pak rozdělíme po 16μl do příslušných jamek v destičce. Z části cDNA od LD ploštic si ředěním připravíme kalibrační křivku. Ředíme 10x, 20x, 40x a 100x. Zbylé vzorky naředíme 10x. Nyní začneme nanášet 4μl na destičku. První řádek u všech genů bude sloužit pro kalibrační křivku. Každé její ředění sem nanese v triplikátu. Pod kalibrační křivku nanese vzorky v duplikátu (včetně LD ke kterým expresi vztahujeme). Alespoň jednu jamku necháme jako negativní kontrolu a místo cDNA nanese 4μl H₂O. Připravenou destičku umístíme do speciálního termocykleru pro RT-PCR a spustíme program:

- iniciace denaturace 94°C/2 min
 - denaturace 94°C/30 s
 - annealing (hybridizace) 58°C/35s
 - elongace 72°C/45s
- } 39x

Po ukončení PCR výsledky vyhodnotíme dodávaným softwarem (Bio-Rad CFX Manager).

4.7. Pozorování fertility a přežívání samců *Pyrrhocoris apterus*

V experimentu byla pozorována délka přežívání samců, jejich plodnost a zjišťována souvislost mezi těmito hodnotami. Samci byli jednotlivě rozděleni do Petriho misek v počtu patnácti kusů od každé pokusné skupiny. Po celou dobu jejich života jim byla každých sedm dní předkládána nová čtyřdenní samička. Stará byla přendána samostatně do nové Petriho misky a chována tak dlouho, dokud se z jejích snůšek líhli potomci. Snůšky byly rovněž v intervalech sedmi dnů oddělovány od samic, spočítány a nechány čtrnáct dní líhnout. Vylíhlé larvy byly také spočítány. Celý pokus probíhal v podmínkách dlouhého dne.

Pozorované skupiny:

- LD mated – normální, nediapauzní samci
- CA mated – samci s odebraným *corpus allatum*
- Met mated – samci s RNAi proti genu *Met*
- Tai mated – samci s RNAi proti genu *Tai*
- Kr-h1 mated – samci s RNAi proti genu *Kr-h1*

Současně s těmito skupinami byli nezávisle chováni ve stejných podmínkách kontrolní samci, ke kterým samičky nebyly přidávány, a byla pozorována jen délka jejich života.

- LD virgin – normální samci nediapauzní, nepářící se
- CA virgin – samci s odebraným *corpus allatum*, nepářící se

Všichni samci byli kontrolováni každý druhý den a bylo zaznamenáno datum jejich úmrtí.

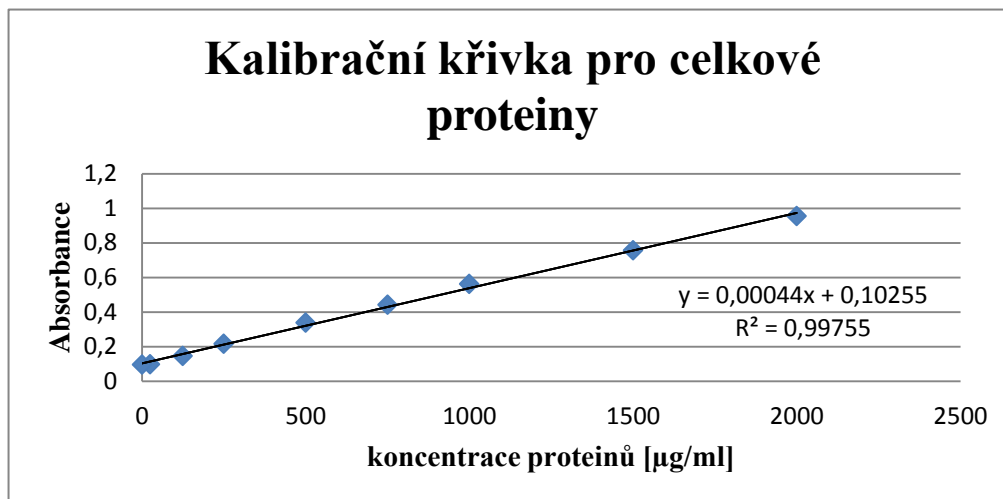
4.8. Statistické metody

Výsledky pokusů byly podle potřeby zpracovány dle následujících statistických metod: jednocestná analýza variance (ANOVA) + Tukey's multiple comparisons test, ANOVA + Dunnett's multiple comparisons test, deskriptivní statistika, t-test, dvoucestná analýza

variance (two way ANOVA), analýza křivky přežívání (Long-rank Mantel-Cox test) a graficky znázorněny programem GraphPad Prism 6.

5. Výsledky

5.1. Množství celkových proteinů v přídatných žlázách



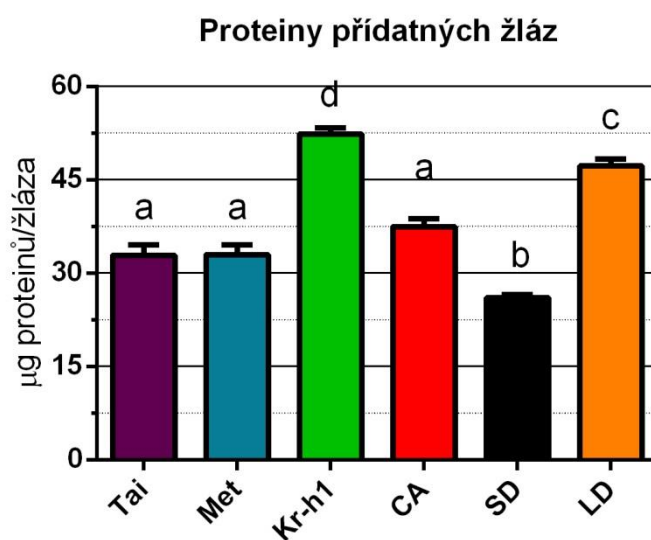
Obrázek 4: Kalibrační křivka albuminu pro výpočet celkových proteinů

Upravením rovnice kalibrační křivky (obrázek 4) byla vypočtena hodnota množství proteinů v jedné žláze: $x = (y - (0,10255)/0,00044)/8$. Výsledné hodnoty byly statisticky zpracovány a znázorněny programem GraphPad Prism 6

Nejvyšší obsah celkových proteinů obsahují žlázy samců injikovaných dsRNA proti genu *Kr-h1* s průměrnou hodnotou 52,36 μg proteinů na žlázu (obrázek 5). Následují nediapauzní LD samci, kteří sice vykazují signifikantní rozdíl oproti *Kr-h1*, ovšem jen malý ($P \leq 0,05$). Nejmenší obsah lze pozorovat u diapauzních SD samců s průměrem 26,02 μg/žláza. Tento výsledek se signifikantně liší od všech ostatních skupin, viz tabulka č. 1. Množství proteinů zbylých kategorií samců se pohybuje uprostřed těchto hodnot a nevykazuje mezi sebou významné rozdíly.

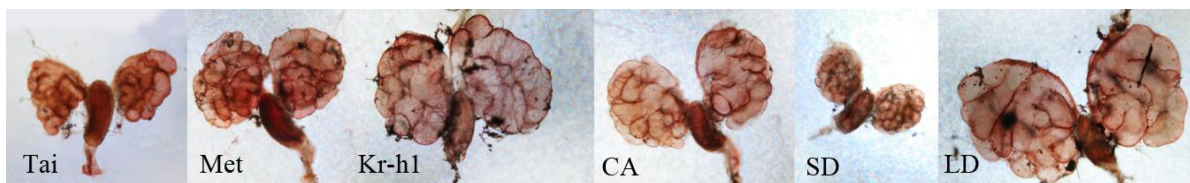
Tukey's multiple comparisons test	P hodnota	Míra signifikance
LD vs. SD	$P < 0,0001$	****
LD vs. Kr-h1	$P \leq 0,05$	*
LD vs. Tai	$P < 0,0001$	****
LD vs. Met	$P < 0,0001$	****
LD vs. CA	$P < 0,0001$	****
SD vs. Kr-h1	$P < 0,0001$	****
SD vs. Tai	$P \leq 0,001$	***
SD vs. Met	$P \leq 0,001$	***
SD vs. CA	$P < 0,0001$	****
Kr-h1 vs. Tai	$P < 0,0001$	****
Kr-h1 vs. Met	$P < 0,0001$	****
Kr-h1 vs. CA	$P < 0,0001$	****
Tai vs. Met	$P > 0,05$	ns
Tai vs. CA	$P > 0,05$	ns
Met vs. CA	$P > 0,05$	ns

Tabulka 1: Míra signifikance mezi jednotlivými pokusnými skupinami



Obrázek 5: množství proteinů v jedné přídatné žláze. Tai – n = 18, medián 35,46µg/žláza, Met – n= 18, medián 34,50µg/žláza, Kr-h1 – n = 21, medián 52,90µg/žláza, CA – n = 24, medián 37,83µg/žláza, SD – n = 31, medián 26,05µg/žláza, LD – n = 18, medián 46,51µg/žláza. Analýza jednocestná ANOVA + Tukey's test. Chybové úsečky průměr + SEM. Signifikantně odlišné hodnoty jsou odlišeny různými písmeny.

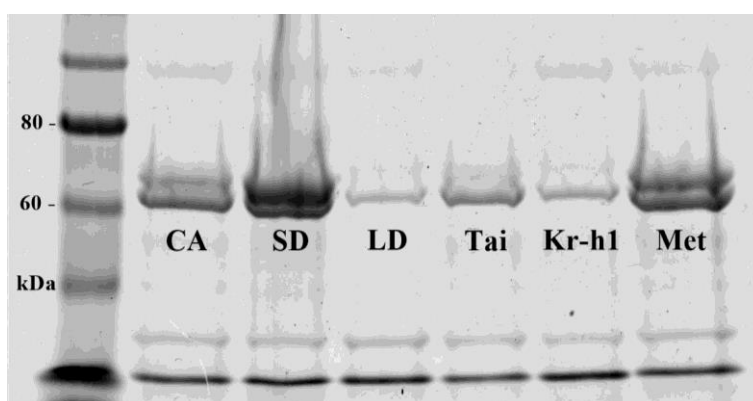
V souvislosti se změnou množství vytvářených proteinů, lze pozorovat i změnu velikosti přídatných žláz, viz ilustrační foto na obrázku 6. Žlázy jsou vyoperovány čtrnáct dní starým samcům, obarveny neutrální červení pro vytvoření kontrastu a vyfoceny v optickém mikroskopu při zvětšení 50x.



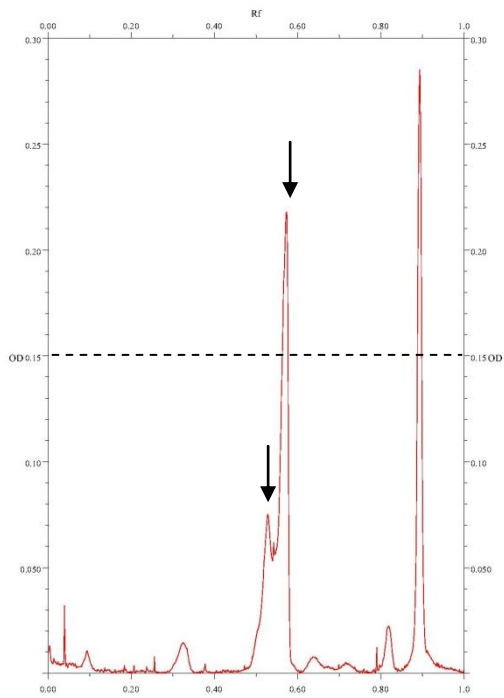
Obrázek 6: Přídatné žlázy samců *Pyrrhocoris apterus* čtrnáct dní starých. Zvětšení 50x

5.2. Změny v množství hexamerních proteinů v hemolymfě

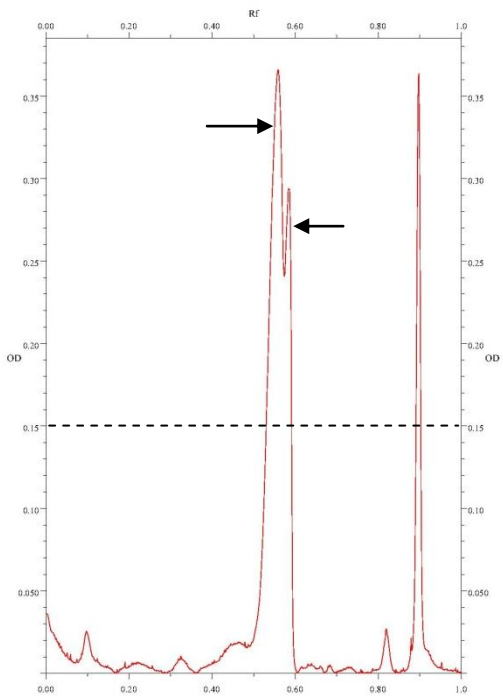
Zásobní hexamerní proteiny, neboli hexameriny se u *P. apterus* pohybují v oblasti okolo 60 – 70 kDa (obrázek 7). Na první pohled jsou patrné rozdíly v jejich množství mezi jednotlivými kategoriemi samců. Jednoznačně nejvyšší relativní kvantum hexamerinů vykazují diapauzní samci (SD), následováni samci Met. Oproti tomu hemolymfa LD a Kr-h1 samců je na zásobní proteiny velmi chudá. S tímto přímo koreluje míra optické denzity (OD) jednotlivých bandů na gelu. Obrázek 8 znázorňuje graf optické denzity pro každý rozdělený proteinový pruh zvlášť. Šipky ukazují na píky zkoumaných hexamerinů. Některé vzorky (SD, Met, CA) mají píky dva, zatím co jiné (LD, Kr-h1, Tai) jen jeden. To by mohlo znamenat, že nedochází jen ke změně kvantitativní, ale rovněž i ke změně ve složení, respektive v zastoupení jednotlivých proteinů.



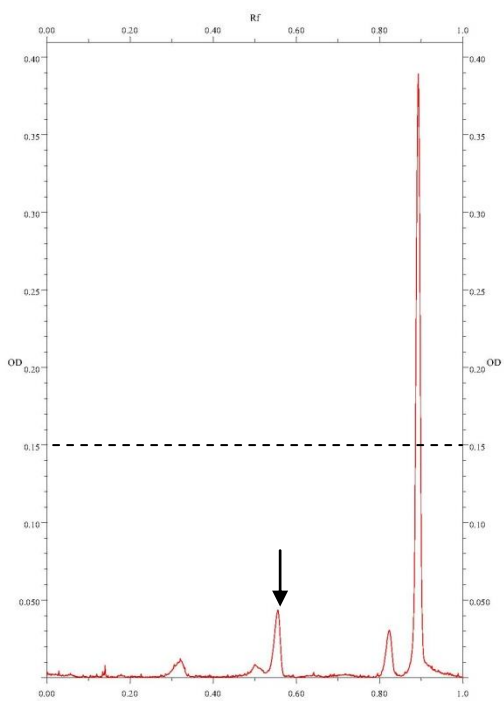
Obrázek 7: polyakrylamidový gel se vzorky hemolymfy (2µl). Hexamerní proteiny jsou pozorovatelné v oblasti 60 – 70 kDa.



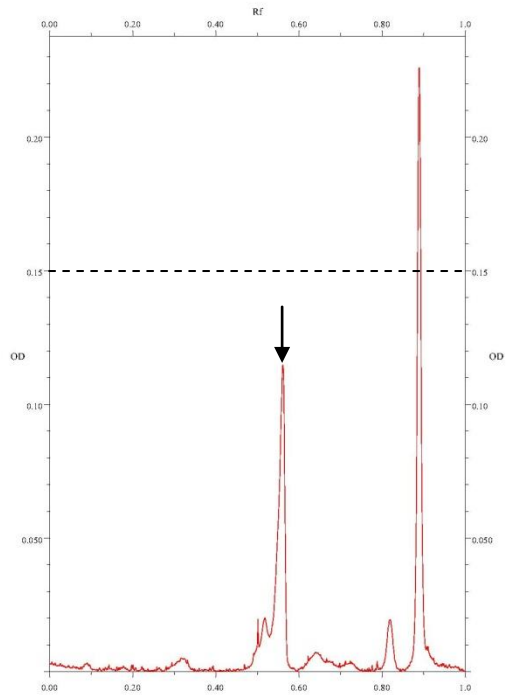
vzorek CA



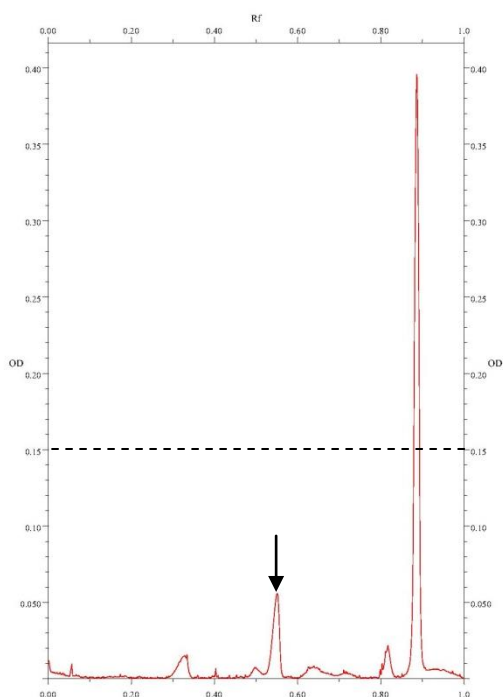
vzorek SD



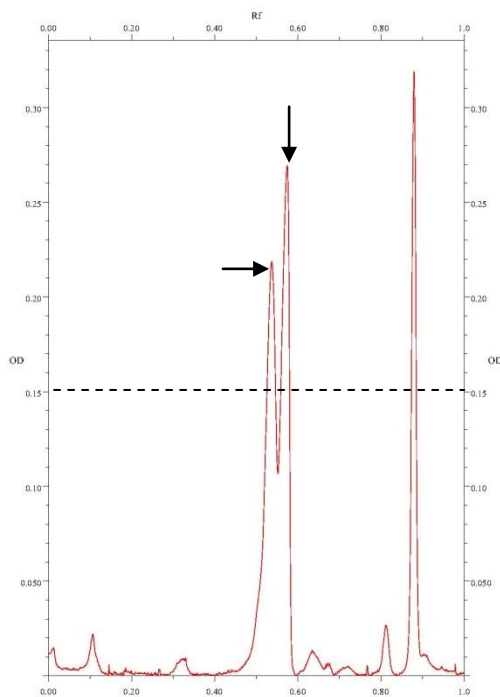
vzorek LD



vzorek Tai



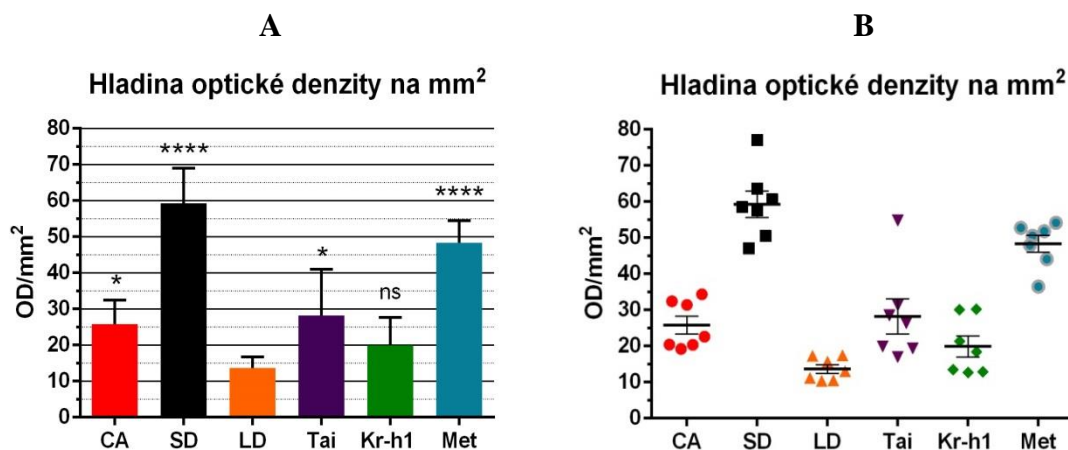
vzorek Kr-h1



vzorek Met

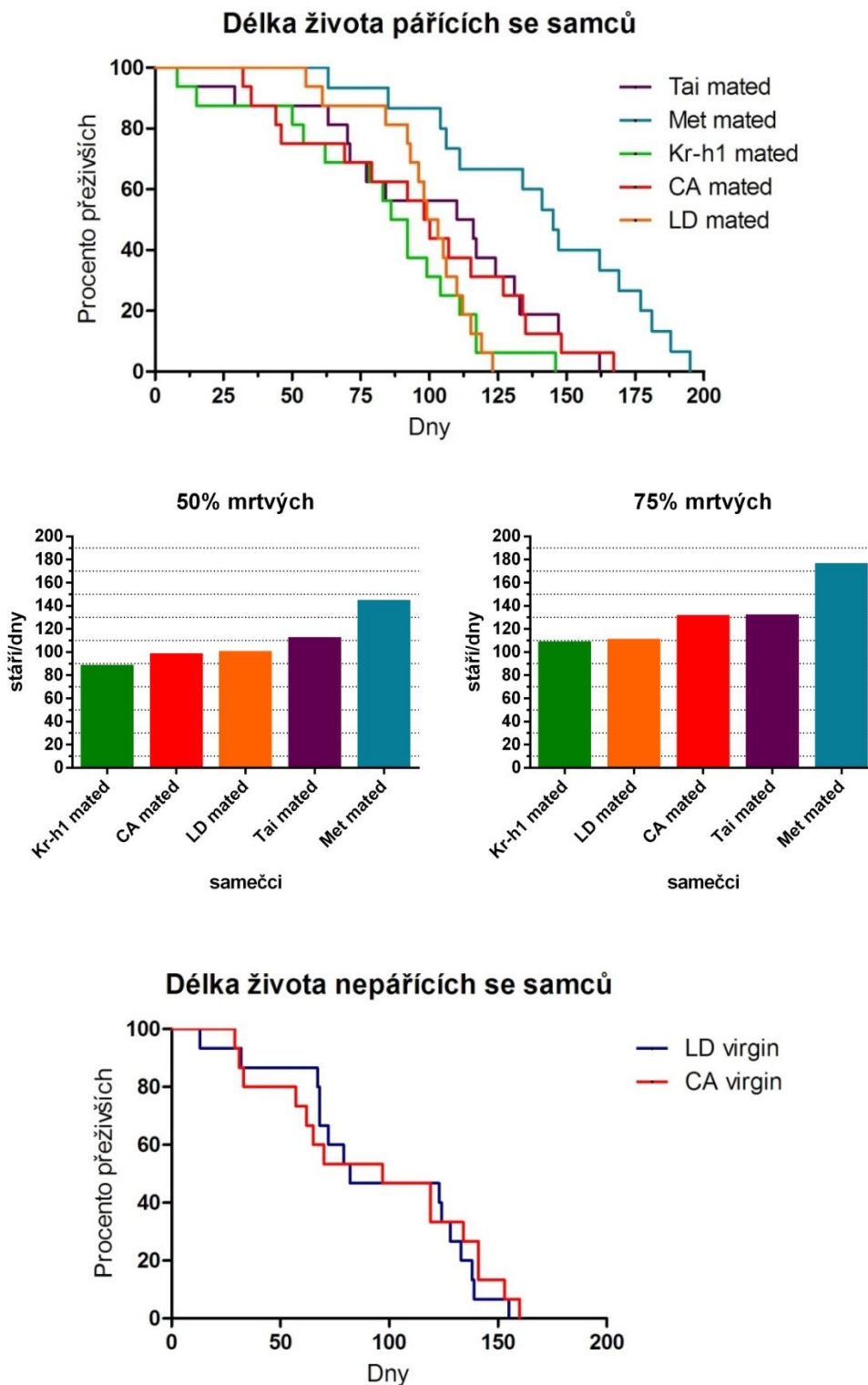
Obrázek 8: Píky optické denzity (OD) jednotlivých pruhů vzorků hemolymfy na gelu v pořadí: CA, SD, LD, Tai, Kr-h1, Met. Šípky označují pik/y hexamerních proteinů. Šrafovaná čára znázorňuje OD 0,15.

V grafech A a B na obrázku 9 jsou vyneseny hodnoty optické denzity bandů na mm^2 . Při srovnání výsledků s OD LD vzorků můžeme sledovat větší či menší míru signifikance u všech skupin, kromě Kr-h1, který není signifikantně rozdílný.



Obrázek 9 : Graf A ukazuje míru optické denzity zásobních, hexamerních proteinů a míru signifikance srovnávanou s OD LD samců ($n = 7$). Hladina OD: CA –medián 22,63, SD –medián 58,50, LD –medián 13,02, Tai – medián 26,38, Kr-h1 –medián 18,46, Met –medián 50, Graf B pracuje s týmiž hodnotami, ovšem znázorňuje rozptýlení jednotlivých měření ($n = 7$). Analýza ANOVA + Dunnett's test. Chybové úsečky průměr + SEM.

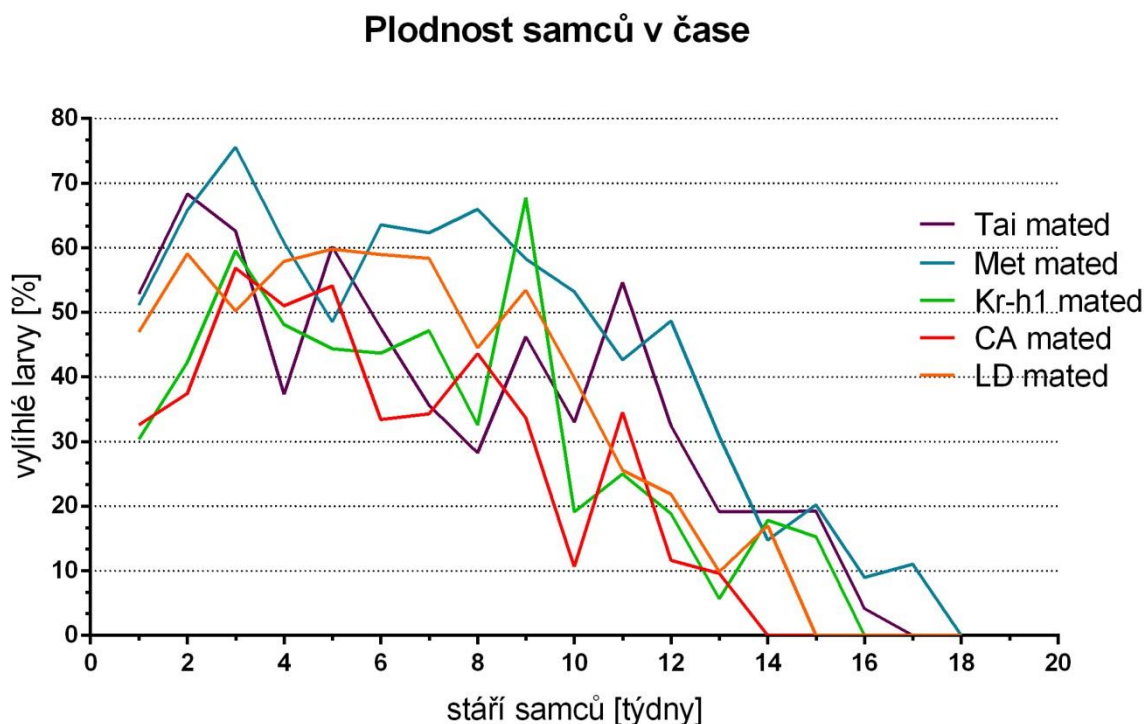
5.3. Délka života zkoumaných skupin samců



Obrázek 10: Horní graf: délka života pářících se samců uváděná ve dnech (n = 16). LD – medián 101, CA – medián 99, Kr-h1 - medián 89, Met – medián 145, Tai – medián 113. Pod ním vlevo histogram křivek přežívání při 50% mrtvých a 50% živých jedincích. Vpravo histogram křivek při 75% mrtvých jedincích. Dolní graf: délka života nepářících se kontrol uváděná ve dnech (n = 15). LD virgin – medián 82, CA virgin – medián 97. Analýza křivky přežívání + Long-rank Mantel-Cox test.

Pokus s longevitou samců skončil velmi překvapivě, protože žádná skupina, kromě Met, nevykazuje signifikantní rozdíl v délce života (obrázek 10). Dokonce ani v porovnání s nepářícími se kontrolami. Met jako jediná zaznamenala signifikantní nárůst délky života ve srovnání k ostatním skupinám. Proti pářícím se LD samcům se longevita zvedla o 43,6 % a oproti nepářícím se LD kontrolám dokonce o 76,8%. CA pářící se samci by teoreticky měli dosahovat stejného věku jako Met, ovšem v tomto pokusu se jejich věk liší o 46,5 %. (všechny procenta počítány z mediánu). Jak je možné vidět na histogramech křivek přežívání, od 50% mrtvých jedinců se začíná projevovat námi předpokládaný trend longevity, i když rozdíly v délce života mezi jednotlivými skupinami byly očekávány vyšší.

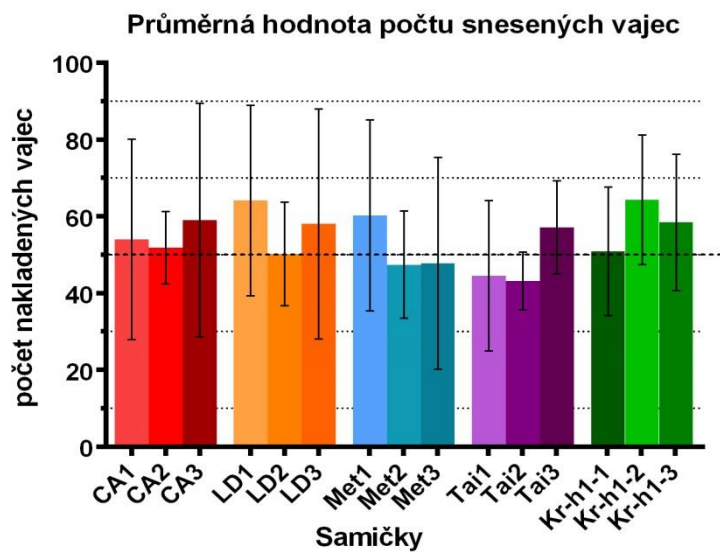
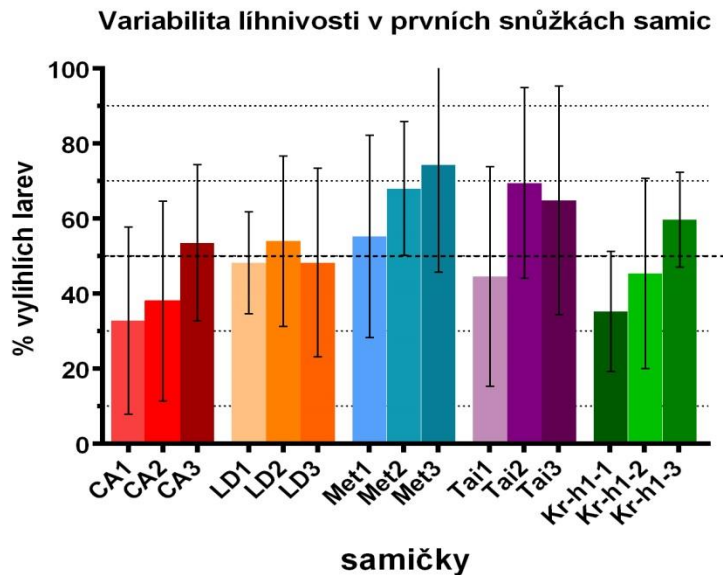
5.4. Fertilita samců v průběhu života



Obrázek 11: graf znázorňující procento vylíhlých larev v prvních snůškách samic u různě starých samců. Analýza Two – way ANOVA: Row Factor – $P < 0,0001$, Column Factor $P < 0,0001$

V grafu na obrázku 11 je vynesena závislost procent vylíhlých larev na stáří samců. Podle očekávání je u všech skupin patrný klesající trend plodnosti s rostoucím věkem. Je možno rovněž pozorovat signifikantní rozdíly v délce plodného období. Se zvyšujícím se gradientem lze samce dle období plodnosti seřadit takto: $CA < LD < Kr-h1 < Tai < Met$. Jednoznačně nejlépe si stojí samečci Met, kteří jsou plodní o celé čtyři týdny déle než

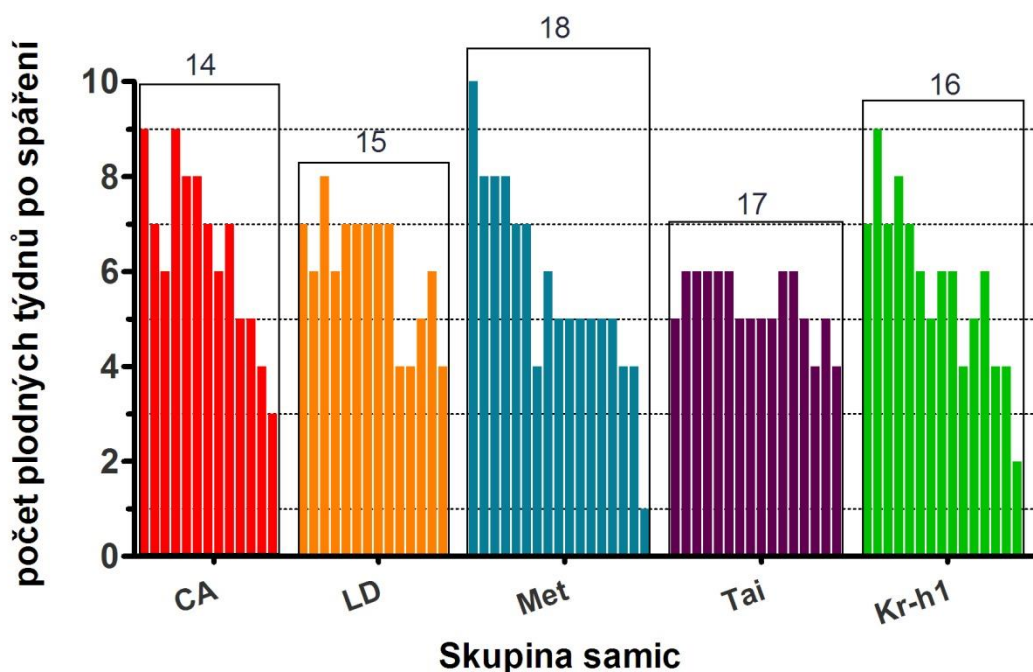
allatektomovaní CA samci a procento líhnivosti jejich potomků se velmi dlouho pohybuje kolem nebo nad hranicí 50%. Oproti tomu líhnivost CA přesahuje hranici 50% jen do pátého týdne stáří a samečci jsou plodní ze všech skupin nejkratší dobu – pouze čtrnáct týdnů.



Obrázek 12: Horní graf: procento vylíhlých larev v první snůžce u prvních tří skupin samic, pářících se se samečký dané kategorie (n = 16 pro každý sloupec). Znáznorněna hodnota SD (standard deviation). Mediány – CA1 = 36,17, CA2 = 29,95, CA3 = 55,86, LD1 = 44,21, LD2 = 52, LD3 = 51,03, Met1 = 62,79, Met2 = 62,75, Met3 = 77,40, Tai1 = 47,08, Tai2 = 73,94, Tai3 = 67,85, Kr – h1-1 = 32,52, Kr – h1-2 = 48,41, Kr – h1-3 = 61,39. Dolní graf: průměrná hodnota nakladených vajec u stejných samic. CA1 = 54, CA2 = 51,83, CA3 = 59,06; LD1 = 64,14, LD2 = 50,23, LD3 = 58; Met1 = 60,1, Met2 = 47,4, Met3 = 47,78; Tai1 = 44,46, Tai2 = 43,14, Tai3 = 57; Kr-h1-1 = 50,87, Kr-h1-2 = 64,28, Kr-h1-3 = 58,42. Analýza deskriptivní statistika.

Líhivost dosahovala maximálních hodnot v prvních třech reprodukčních týdnech a v prvních snůškách samic. Pro bližší pohled jsou procenta líhivosti z tohoto období vynesena v grafu na obrázku 12. Velká směrodatná odchylka je dána vysokou variabilitou líhnutí vajíček mezi snůškami jednotlivých samic téže skupiny. Počet kladených vajec se zdá být samci neovlivněn.

Na obrázku 13 můžeme vidět maximální dobu, po kterou skupiny samic byly schopné klást oplodněná vajíčka. Nejdéle sperma vydrželo samicám oplodněným v prvních týdnech samcova života. S postupujícím časem kvalita spermatu klesá. Této tendenci neodpovídají pouze samičky oplodněné Tai samečkou, které kladly oplodněná vajíčka přibližně stále stejnou dobu, a k neplodnosti došlo náhle při osmnáctém páření.

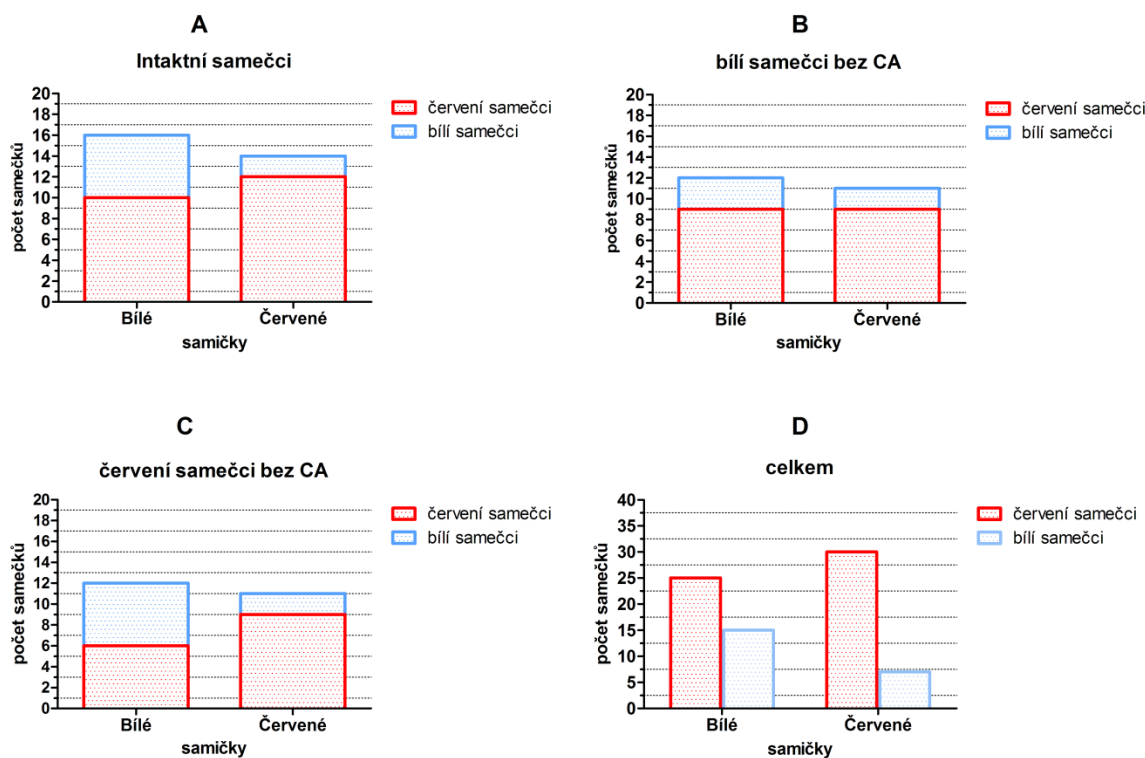


Obrázek 13: Graf ukazující maximální počet týdnů, po které vydrželo samicám po spáření sperma k oplodnění vajíček. Jednotlivé sloupce v kategoriích zastupují skupinu samic přidávanou po týdnu k samečkům. Čísla nad kategoriemi udávají počet skupin samic, které byly samečci schopni oplodnit.

5.4.1. Priority samic při výběru pohlavního partnera

V tomto dodatečném pokusu byly zkoumány priority samic při výběru pohlavního partnera a možné znevýhodnění sameček bez CA. Červeným a bílým samicám byli předloženi intaktní a allatektomovaní samečci jak bílé, tak červené barvy a bylo sledováno, kterého z partnerů si zvolí pro kopulaci.

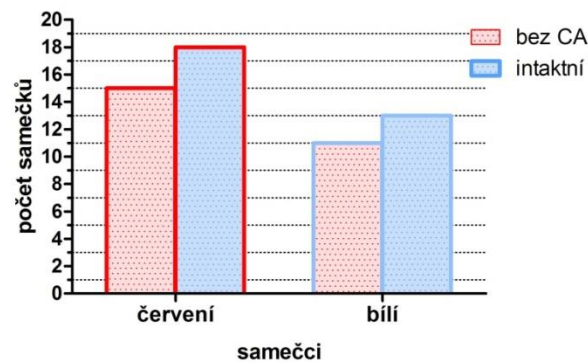
Většina samic dává přednost samcům červené barvy, bez ohledu zda podstoupili odstranění CA nebo ne (obrázek 14). Bílé zbarvení se zdá být neatraktivní. Na základě tohoto zjištění byl proveden další pokus, kde allatektomovaní a intaktní samečci byli stejného fenotypu, odlišeni pouze malou barevnou značkou na thoraxu, tím se eliminoval vliv zbarvení.



Obrázek 14: priorita samic při výběru partnera pro páření. (A) Obě skupiny samců intaktní; bílé samičky – 10x červený partner, 8x bílý partner; červené samičky – 12x červený partner, 2x bílý partner. (B) Bílí samečci s odebraným *corpus allatum*; bílé samičky – 9x červený partner, 3x bílý partner; červené samičky – 9x červený partner, 3x bílý partner. (C) Červeným samečkům odebráno *corpus allatum*; bílé samičky – 6x červený partner, 6x bílý partner, červené samičky – 9x červený partner, 2x bílý partner. (D) Celkový počet pářících se červených a bílých samečků; bílé samičky – 25x červený sameček, 15x bílý sameček, červené samičky – 30x červený sameček, 7x bílý sameček.

Samice si svého partnera vybíraly více méně náhodně a allatektomie na jejich volbu neměla žádný signifikantní vliv (obrázek 15). Dá se tedy usuzovat, že sameček bez CA není nikterak znevýhodněn a tudíž se tato skutečnost neprojeví v reprodukční úspěšnosti.

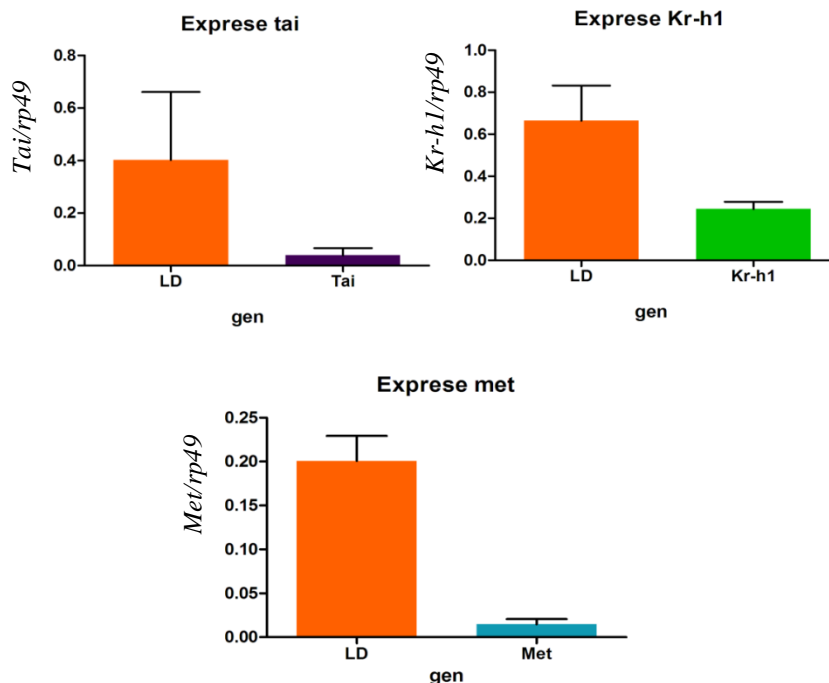
počet spáření intaktních a allatektomovaných samečků



Obrázek 15: preferování samečci při páření s červenými samicemi. Bílí samečci bez CA = 11, bílí samečci intaktní = 13; červení samečci bez CA = 15, červení samečci intaktní = 18

5.5. Míra inhibice genů *Met*, *Tai* a *Kr-h1*

Expresi genu *Tai* se podařilo díky RNA interferenci snížit oproti kontrolním LD samcům na 9,76%, genu *Met* na 7,33% a genu *Kr-h1* na 36,73% (obrázek 16). Procenta jsou počítána z průměrných hodnot exprese. V pokuse byla použita mRNA pouze z přídatných žláz samců a jako srovnávací gen byl použit gen pro ribosomální protein 49 – *rp49*.



Obrázek 16: Míra exprese genů *Tai*, *Kr-h1*, *Met* po injekci interferentní dsRNA. Expresse *Tai*: průměr LD = 0,4016, tai = 0,03919; expresse *Kr-h1*: průměr LD = 0,6649, *Kr-h1* = 0,2442; Expresse *Met*: průměr LD = 0,2008, *Met* = 0,01471. Analýza t-test. Chybové úsečky průměr + SEM.

6. Diskuze

JH svým pleiotropním účinkem ovlivňuje velké množství vývojových a fyziologických procesů. Dlouhodobě stojící otázkou je, jak jeden hormon může vykonávat tolik rozdílných funkcí (Wheeler a Nijhout 2003). První světlo do této problematiky vrhá výzkum signálních molekul juvenilního hormonu. Dřívější práce identifikovaly *Met* jako receptor JH, který je nezbytný pro prevenci metamorfózy (Knopová a Jindra 2007; Minakuchi et al. 2008, 2009; Knopová et al. 2011; Lozano a Bellés 2011), vitellogenezi, vývoji ovárií (Parthasarathy et al., 2010; Li et al., 2011 Zou et al. 2013; Smykal et al. 2013) a diapauzní vs. reprodukční reprogramaci střeva (Bajgar et al., 2013).

Met náleží do rodiny bHLH-PAS proteinů, které mezi sebou tvoří dimery (Godlewski et al. 2006). V přítomnosti juvenilního hormonu interaguje *Met* s jinými proteiny téže rodiny, jako *Tai*, *Cycle* a *Clock* a spolu tvoří heterodimerní transkripční faktory (Shin et al., 2012; Zhang et al., 2011; Charles et al., 2011; Li et al., 2011). Dřívější práce ukázaly, že v různých drahách účinku juvenilního hormonu *Met* používá ke své práci různé partnery. U imág *P. apterus* je pro stimulaci vitellogeneze nutný *Tai* (Smykal et al., 2014), naproti tomu *Cycle* a *Clock* jsou nutné pro diapauzní vs. reprodukční reprogramaci střeva (Bajgar et al., 2013). Zda u larev *Met* působí prostřednictvím dimerizace s jiným partnerem např. při aktivaci *Kr-h1* není doposud známo (Smykal et al., 2014).

Ve své práci jsem testovala, zda geny *Met* a *Tai* jsou nutné pro účinek JH na některé procesy u samců *P. apterus*. Zaměřila jsem se na tři parametry, o kterých je známo, že jsou kontrolovány JH: (1) množství proteinů v přídatných žlázách (Yamamoto et al., 1988), (2) množství hexamerních proteinů v hemolymfě (Šula et al. 1995) a (3) délka života (Blažková et al., 2011; Buřičová a Hodková 2013). Výsledky suprese výše zmíněných genů pomocí RNA interference LD samců s aktivním CA jsem srovnala jednak s výsledky u diapauzních samců, jejichž CA je přirozeně neaktivní a jednak s výsledky u LD samců, kterým byl odstraněn zdroj JH allatekomií.

Injekce *Met* i *Tai* snížila podle očekávání množství proteinů v přídatných žlázách na úroveň allatektomovaných samců (obrázek 5). Naproti tomu vliv na hexamerní proteiny v hemolymfě a přežívání se mezi *Tai* a *Met* kvantitativně lišil. Zatím co, hexamerní proteiny byly po injekci dsRNA *Tai* zvýšeny na úroveň allatektomovaných samců, po injekci *Met* dsRNA, bylo množství hexamerinů téměř stejně vysoké jako u diapauzních samců (obrázek 9). Navíc podle piků optické denzity a SDS PAGE (obrázek 8 a 7) se zdá, že při diapauze a po injekci dsRNA *Met* dochází k významné akumulaci dvou proteinů, zatím co po odstranění

CA a injekci dsRNA *Tai* jen jednoho (obrázek 8). Dřívější experimenty svědčí o prodloužení doby přežívání allatektomovaných samců i samic oproti kontrolám a také prodloužení života u panenských jedinců (Hodková 2008; Hodková a Tatar 2011; Blažková et al., 2011). V současných pokusech jsem zjistila podobný efekt teprve po dosažení mediánu. Například v 75% percentilu je průměrná délka života allatektomovaných samců o 20 dnů a maximální délka života o 44 dnů delší než u kontrolních LD samců. Křivka přežívání *Tai* dsRNA se téměř přesně shodovala s křivkou přežívání samců bez CA. Ještě podstatně více byl prodloužen život samcům injikovaným *Met* dsRNA (obrázek 10). Kontrolní nepáříci se skupiny allatektomovaných a intaktních samců žily o poznání kratší dobu, než bylo předpokládáno dle dřívějších pokusů. Navíc se ani mezi nimi samotnými neprojevil rozdíl v přežívání (obrázek 10 dolní graf). Na vině je zřejmě příliš malá pokusná skupina (n = 15), u které se nestihl dostatečně projevit předpokládaný trend. Pro učinění nějakého závěru bylo příhodné tento pokus opakovat s mnohem větším počtem reprezentujících jedinců.

Výsledky naznačují, že *Met* i *Tai* jsou nutné pro funkci JH. *Met* navíc brání vytvoření podmínek, kdy množství hexamerních proteinů nebo délka života jsou blíže k diapauzním než k allatektomovaným samečkům. Potlačený *Met* však na druhou stranu nebrání páření, kdežto diapauzní samci na samice téměř vůbec nereagují (Žďárek 1968). Také samečci s extirpovanou jak *pars intercerebralis* (PI), tak CA se páří (Hodková 1994). Úloha PI při řízení jiných parametrů nebyla zatím u samců studována, ale samice bez PI+CA žijí déle než samice po pouhé allatektomii (Hodková 2008; Hodková a Tatar 2011). Není vyloučeno, že gen *Met* by mohl, kromě interakce s JH, působit i ve spojení s PI.

Met a *Tai* jsou potřeba pro funkci JH i u samic *P. apterus*. Také zde má injekce *Met* dsRNA intenzivnější efekt než injekce *Tai*. Projevuje se to především u syntézy vitellogeninu. U samic injikovaných dsRNA *Tai* je potlačena syntéza vitellogeninu 1, ale nikoli vitellogeninu 2 v tukovém tělese, kdežto u samic injikovaných dsRNA *Met* je potlačena syntéza obou těchto genů (Smýkal et al., 2013). Stejně jako u samců v této práci je i u samic syntéza hexamerních proteinů v tukovém tělese intenzivnější po injekci *Met* než *Tai* (Smýkal et al., 2013).

Kromě bHLH-PAS proteinů, jsem se zaměřila na transkripční faktor *Kr-h1*, který působí bezprostředně po JH/Met anti-metamorózní dráze u larev *P. apterus*. *Kr-h1* je závislý na JH a zmizí v posledním larválním instaru, kdy dochází k metamorfóze (Knopová et al. 2011). U dospělých *P. apterus* je silně redukován allatektomií nebo diapauzou. Jeho umělá redukce interferencí RNA neměla žádný vliv na zrání ovarii a syntézu vitellogenních proteinů v tukovém tělese (Smýkal et al., 2013). Podobně jsem nezjistila žádný vliv *Kr-h1*

dsRNA na množství proteinů v přídatných žlázách, hexamerních proteinů v hemolymfě ani délku života u dospělých LD samců. Inhibice exprese genu *Kr-h1* (obrázek 16) byla slabší (36%) než inhibice genů *Met* (7%) a *Tai* (9%), což mohlo přispět k negativnímu výsledku. Ačkoliv nemohu vliv slabého zbytku *Kr-h1* zcela vyloučit, tato možnost se nezdá příliš pravděpodobná.

Allatektomie má jen malý vliv na pářící se aktivitu samců *P. apterus* (Žďárek 1962; Hodková 1994; Blažková et al., 2011). V triádách, kde byli krátkodobě pohromadě 1 červený samec, 1 bílý samec a 1 samice (červená nebo bílá) vždy vítězili červení samci v rychlosti, se kterou se spářili, bez ohledu na to, zda měli vyjmuté CA nebo byli intaktní (obrázek 14). Jestliže však oba samci byli červení (nebo bílí), byli pouze nepatrně zvýhodněni intaktní samci před allatektomovanými.

Počet vajíček vykladených samicemi nebyl příliš ovlivněn životní historií samce (CAex, *Met*, *Tai*, *K-h1* dsRNA), se kterými se pářily (obrázek 12, dolní graf). Ani procento vylíhlých larev se velmi nelišilo podle otců, kromě *Met* a *Tai*, u kterých bylo o něco vyšší. Zdá se, že pokud některé proteiny přídatných žláz ovlivňují líhnivost vajíček, nejsou závislé na JH, stejně tak jako není závislá možnost početí potomstva. Není však vyloučeno, že JH otce ovlivňuje fitness potomků v pozdějších fázích života. Například u *Drosophila melanogaster* bylo prokázáno, že jak fyzický akt páření, tak vystavení tekutině obsahující proteiny přídatných žláz, zvyšuje fitness dcer (Priest et al. 2008).

Lze konstatovat, že jak allatektomie, tak *Met* a *Tai* dsRNA snižují množství proteinů přídatných žláz, zvyšují množství hexamerních proteinů v hemolymfě a prodlužují život samcům *P. apterus*, přičemž suprese *Met* má nejsilnější vliv. Potlačení genů *Met* a *Tai* nemělo negativní vliv na fertilitu.

7. Závěr

- Allatektomovaní LD a diapauzní SD samci mají přídatné žlázy s menším množstvím proteinů a jejich hemolymfa obsahuje vyšší množství hexamerních proteinů než LD samci. Ale u diapauzních jedinců jsou oba parametry ovlivněny mnohem silněji než u samců bez CA.
- Pomocí RNA interference (RNAi) se úspěšně podařilo umlčet expresi genů *Met*, *Tai* a s o něco menším účinkem i *Kr-h1*, jejichž vliv na funkci juvenilního hormonu jsem studovala.
- Celkové množství proteinů přídatných žláz bylo u *Met* i *Tai* samců podobné jako u allatektomovaných samců, tedy nižší než u LD samců, ale ne zas tak nízké, aby dosáhlo úroveň diapauzních samců. Po injekci *Kr-h1* se proteiny oproti LD samcům zvýšily jen nepatrně.
- Samcům skupiny *Met* se zvýšilo množství hexamerních proteinů v hemolymfě téměř na úroveň diapauzních samců. Zatím co samcům *Tai* na úroveň allatektomovaných samců. Hemolymfa LD a *Kr-h1* samců obsahuje jen malé množství hexamerních proteinů.
- Samci injikovaní dsRNA proti *Met* žili podstatně déle než samci ostatních skupin. Rovněž jejich plodné období a procento oplodněných vajíček bylo spíše vyšší, tedy opak než bychom očekávali. U ostatních skupin nebyl na líhivost žádný významný vliv.
- Nebyl žádný významný vliv allatektomie, *Met*, *Tai* a *Kr-h1* interference na počet vykladených vajíček samicemi.
- Celkově lze uzavřít, že *Met* a *Tai* jsou nutné pro funkci JH u samců *Pyrrhocoris apterus*. Oproti očekávání allatektomie *Met* RNAi ani *Tai* RNAi neovlivňují negativně fertilitu. *Met* má ještě další funkce, na JH nezávislé.

8. Použitá literatura

Bajgar A., Jindra M., Doležel D. (2013)

Autonomous regulation of the insect gut by circadian genes acting downstream of juvenile hormone signaling. *PANS* 110 - 11; 4416–4421.

Barth R.H. (1962)

The endocrine control of mating behavior in the cockroach *Byrsotria fumigata* (Guérin). *Gen. General and Comparative Endocrinology* 2°(1); 53-69.

Blažková H., Provazník J., Hodková M. (2011)

Novel roles for *corpus allatum* hormone in the cost of sexual interactions in the linden bug *Pyrrhocoris apterus*. *J. Insect Physiol.* 57; 529-535.

Burmester T. (1999)

Evolution and function of the insect hexamerins. *Eur. J. Entomol.* 96; 213 – 225.

Buřičová M., Hodková M. (2013)

Relationship between locomotor activity, oxidative damage and life span in males and females of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus* (heteroptera: Pyrrhocoridae). *Eur. J. Entomol.* 110(3); 443-449.

Dean S.R., Meola R.W. (1997)

Effect of juvenile hormone and juvenile hormone mimics on sperm transfer from the testes of the male cat flea (Siphonaptera: Pulicidae). *J. Med. Entomol.* 34(4):485-488.

Ďoubal S. (2000)

Současné teorie stárnutí. Gerontologické pracoviště, Katedra biofyziky a fyzikální chemie, Farmaceutická fakulta UK v Hradci Králové.
http://apps.faf.cuni.cz/Gerontology/mechanisms/theory/theory_contemporary.asp

Fan Y., Rafaeli A., Gileadi C., Kubli E., Applebaum S.W. (1999)

Drosophila melanogaster sex peptide stimulates juvenile hormone synthesis and depresses sex pheromone production in *Helicoverpa armigera*. *J. Insect Physiol.* 45(2);127-133.

Fernandez F.C., Cruz – Landim C. (2005)

Morphology and ultrastructure of the male accessory gland of *Achroia grisella* (Fabricius) (Lepidoptera, Pyralidae). Braz. J. Morphol. Sci. 22(3); 129 – 136.

Gillott C. (2003)

Male accessory gland secretions: modulators of female reproductive physiology and behavior. Annu. Rev. Entomol. 48; 163-84.

Godlewski J., Wang S., Wilson T.G. (2006)

Interaction of bHLH-PAS proteins involved in juvenile hormone reception in *Drosophila*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 342(4);1305-11.

Hartfelder K. (2000)

Insectjuvenile hormone: from “status quo” to high society. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33; 157 – 177.

Hiruma K, Kaneko Y. (2013)

Hormonal regulation of insect metamorphosis with special reference to juvenile hormone biosynthesis. Current Topics in Developmental Biology103; 73–100.

Hodková M. (1979)

Does the insect brain count larval instar? Experienta 35; 135-136.

Hodková M. (1994)

Photoperiodic regulation of mating behaviour in the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*, is mediated by brain inhibitory factor. Cell. Mol. Life Sci. 50(8); 742-744.

Hodková M. (2008)

Tissue signaling pathways in the regulation of life – span and reproduction in females of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. J. Insect Physiol. 54; 508 – 517.

Hodková M., Tatar M. (2011)

Parallels in understanding the endocrine control of lifespan with the firebug *Pyrrhocoris apterus* and the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Mechanism of Life History Evolution, Oxford University Press, edited by Flatt T., Heyland A. 504; 171-179.

Honěk A., Šrámková K. (1976)

Behavioral regulation of developmental cycle in *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera: Pyrrhocoridae). Oecologia (Berl.) 24; 277-281.

Hyršl P. (2006)

Lipophoriny a zásobní proteiny hmyzí hemolymfy. Zoologické dny Brno 2006. 91-92, 2 s.

Chapman T. (2001)

Seminal fluid-mediated fitness traits in *Drosophila*. Heredity 87; 511-21.

Charles J.P., Iwema T., Epa V.C., Takaki K., Rynes J., Jindra M. (2011)

Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 108, 21128–21133.

Konopová B., Jindra M. (2007)

Juvenile hormone resistance gene Methoprene tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. PNAS 104(25); 10488-10493.

Knopová B., Smýkal V., Jindra M. (2011)

Common and distinct roles of juvenile hormone signaling genes in metamorphosis of holometabolous and hemimetabolous insect. PLoS ONE 6(12): e28728.

Kodrík D. (2012)

Fyziologie hmyzu, učební texty. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Kotaki T., Shinada T., Numata H. (2012)

Structure determination of a natural juvenile hormone isolated from a heteropteran insect. Psyche Volume 2012, Article ID 924256, 7 pages

Kristenová M., Exnerová A., Štys P. (2011)

Seed preferences of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae): Are the respecialized trophic populations? Eur. J. Entomol. 108; 581-586.

Kubli E. (2003)

Sex-peptides: seminal peptides of the *Drosophila* male. Cell. Mol. Life Sci. 60; 1689 – 1704.

Li M., Mead E.A., Zhu J. (2011)

Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 108, 638–643.

Lozano J., Bellés X. (2011)

Conserved repressive function of Krüppel homolog 1 on insect metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous species. Sci. Rep. 1; 163.

Martins J. R., Nunes F. M.F., Cristino A.S., Simões S.L.P, Bitondi M.M.G. (2010)

The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. BMC Molecular Biology 11; 23.

Minakuchi C., Namiki T., Shinoda T. (2009)

Krüppel homolog 1, an early juvenile hormone-response gene downstream of Methoprene-tolerant, mediates its anti-metamorphic action in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. Dev. Biol. 325(2); 341-50.

Monsma S.A., Harada H.A., Wolfner M.F. (1990)

Synthesis of two *Drosophila* male accessory gland proteins and their fate after transfer to the female during mating. Dev. Biol. 142(2); 465-75.

Moshitzky P., Fleischmann I., Chaimov N., Saudan P., Klauser S., Kubli E., Applebaum S.W. (1996)

Sex-peptide activates juvenile hormone biosynthesis in the *Drosophila melanogaster corpus allatum*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 32(3-4); 363-74.

Özlük1 A, Gül N. Muhammed A. (2011)

Ultrastructural description of the *corpora allata* of *Pimpla turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae). African J. Biotechnol. 10(19); 3784-3789.

Parthasarathy R., Tan A., Sun Z., Chen Z., Rankin M., Palli S.R. (2009)

Juvenile hormone regulation of male accessory gland activity in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Mech. Dev. 126(7);563-79.

Parthasarathy R., Sun Z., Bai H., Palli S.R. (2010)

Juvenile hormone regulation of vitellogenin synthesis in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Insect Biochem. Mol. Biol. 40, 405–414.

Pener M.P. (1967)

Effects of allatectomy and sectioning of the nerves of the *corpora allata* on oöcyte growth, male sexual behaviour, and colour change in adults of *Schistocerca gregaria*. 13(5); 665-684.

Piulach M.D., Maestro J.L., Belles X. (1992)

Juvenile hormone production and accessory reproductive gland development during sexual maturation of male *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). Compar. Biochem. Physiol. 3; 477-480.

Priest N.K., Roach D.A., Galloway L.F. (2008)

Cross-generational fitness benefits of mating and male seminal fluid. Biol. Lett. 4; 6-8.

Raikhel A. S., Brown M. R., Belles X (2005)

Hormonal control of reproductive processes. Comp. Mol. Insect Science 3; 433 – 491.

Raina A., Murphy Ch. (2008)

A new gland associated with the retrocerebral complex of the adult cornear worm, *Helicoverpa zea*. Arthropod Structure & Development 37; 535–538.

Riddiford L.M. (1996)

Molecular aspect of juvenile hormone action in insect metamorphosis. *Metamorphosis, Postembryonic Reprogramming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells*. 1st Edition, Academic Press, Inc. USA, edited by Gilbert L. I., Tata J. R., Atkinson B. G. 687; 223 – 253.

Riddiford L.M. (2008)

Juvenile hormone action: A 2007 perspective. *J. Insect Physiol.* 54; 895–901.

Smýkal V., Bajgar A., Provazník J., Fexova S., Buricova M., Takaki K., Hodkova M., Jindra M., Doležal D. (2014)

Juvenile hormone signaling during reproduction and development of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2013 – 2014 in press.

Schuh R. T., Slater J. A. (1995)

True Bugs of the World (Hemiptera Heteroptera), Classification and Natural History. První vydání. USA: Cornell University Press 414 s, 61-62.

Socha R. (1993)

Pyrrhocoris apterus (Heteroptera) – an experimental model species: A review. *Eur. J. Entomol.* 90; 241-286.

Socha R., Šula J. (1992)

Voltinism and seasonal changes in haemolymph protein pattern of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) in relation to diapause. *Physiol. Entomol.* 17; 370 – 376.

Socha R., Šula J., Kodřík D. (2004)

Wingmorph – related proteins in adult males of *Pyrrhocoris apterus* (L.) and their endocrine control. *J. Insect Physiol.* 50; 893 – 901.

Šauman I., Sehnal F. (1997)

Immunohistochemistry of the product of male accessory glands in several hemimetabolous insects and the control of their secretion in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). Eur. J. Entomol. 94; 349 – 360.

Šula J., Kodrík D., Socha R. (1995)

Hexameric haemolymph protein related to adult diapause in the red firebug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). J. Insect Physiol. 41 (9); 793-800.

Tatar M., Bartke A., Antebi A. (2003)

The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. (medical research). Science 299 (5611); 1346-1351.

Tatar M. (2004)

The neuroendocrine regulation of *Drosophila* aging. Experimental Gerontology 39; 1745-1750.

Tatar M. (2010)

Reproductive aging in invertebrate genetic models. Ann. N Y Acad. Sci. 1204; 149–155.

Tissenbaum H.A. (2012)

Genetics, life span, health span, and the aging process in *Caenorhabditis elegans*. J. Gerontol A Biol. Sci. Med. Sci. 67(5); 503–510.

Tojo S., Liu Y., Zheng Y. (2012)

Dynamics of storage proteins in Lepidoptera: hemolymph proteins and functional peptides. Recent Advances in Insects and Other Arthropods (Volume 1) edited by Tufail M. and Takeda M., Bentham Science Publishers 191; 32 – 61.

Troen B.R. (2003)

The biology of aging. Mt Sinai J. Med. 70(1); 3-22.

Weinert B.T., Timiras P.S. (2003)

Invited review: Theories of aging. *J. Appl. Physiol.* 95; 1706–1716.

Wheeler D.E., Nijhout H.F. (2003)

A perspective for understanding the modes of juvenile hormone action as a lipid signaling system. *Bioessays* 25, 994–1001.

Wigglesworth V.B. (1936)

The function of the *corpus allatum* in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quart. J. Microscop. Sciences* 2-79; 91-121.

Wilson T. G., DeMoor S., Lai J. (2003)

Juvenile hormone involvement in *Drosophila melanogaster* male reproduction as suggested by the *Methoprene – tolerant*²⁷ mutant phenotype. *Insect Bioch. Mol. Biol.* 33; 1167 – 1175.

Yamamoto K., Chadarevian A., Pellegrini M. (1988)

Juvenile hormone action mediated in male accessory glands of *Drosophila* by calcium and kinase C. *Science* 239(4842); 916-9.

Zimniak P. (2008)

Detoxification reactions: Relevance to aging. *Ageing Research Reviews* 7; 281–300.

Zhang Z., Xu J., Sheng Z., Sui Y., Palli S.R. (2011)

Steroid receptor co-activator is required for juvenile hormone signal transduction through a bHLH-PAS transcription factor, *Methoprene tolerant*. *J. Biol. Chem.* 286; 8437–8447.

Zou Z., Saha T.T., Roy S., Shin S.W., Backman T.W., Girke T., White K.P., Raikhel A.S. (2013)

Juvenile hormone and its receptor, methoprene-tolerant, control the dynamics of mosquito gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110(24); 173-81.

Žďárek J. (1970)

Mating behaviour in the bug, *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera): Ontogeny and its environmental control. *Behaviour* 37; 3-4.