

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
BIOLOGICKÁ FAKULTA
České Budějovice 2007



MAGISTERSKÁ PRÁCE

Molekulární a environmentální faktory spojené s diapauzou
a stárnutím hmyzu

Autor: Lenka Zdechovanová, Bc.
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Magdalena Hodková, CSc.

MAGISTERSKÁ PRÁCE

Zdechovanová, L., 2007: Molekulární a environmentální faktory spojené s diapauzou a stárnutím hmyzu. [Molecular and environmental factors connected to diapause and aging in insect. Mgr. Thesis, in Czech.] – 46 p., Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANOTACE

Current models state that insect peripheral oscillators are directly responsive to light, while mammalian peripheral clock genes are coordinated by a master clock in the brain via intermediate factors, possibly hormonal. We show that the expression levels of two circadian clock genes, *period* (*per*) and *Par Domain Protein 1* (*Pdp1*) in the peripheral tissue of an insect model species are inversely affected by contrasting photoperiods. The effect of photoperiod on *per* and *Pdp1* mRNA levels was found to be mediated by the juvenile hormone. Our results provide the first experimental evidence for hormonal regulation of circadian clock gene expression in insects.

Tato práce je součástí projektu č. 206/05/2222 financovaného Grantovou agenturou České republiky.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích 23.4.2007

.....

Chtěla bych poděkovat své školitelce Doc. RNDr. Magdaleně Hodkové, CSc. za poskytnutí zajímavého tématu, odborné vedení a allatektomie, především však za velkou trpělivost a příjemnou spolupráci. Doc. RNDr. Ivo Šaumanovi, Ph.D. za to, že mi umožnil pracovat ve své laboratoři, za izolace RNA a za jeho ochotu mi kdykoliv poradit či pomoci. Mgr. Honzovi Stehlíkovi za jeho trpělivou pomoc v uvedení do metodické problematiky *real-time* PCR. Za cenné rady velmi děkuji RNDr. Davidu Doleželovi, Ph.D. Paní Mikešové patří můj dík za chovy a pitvy komplexů. Hance Vaněčkové, Bc. děkuji za kamarádský přístup, všeobecnou oporu a spolupráci.

OBSAH

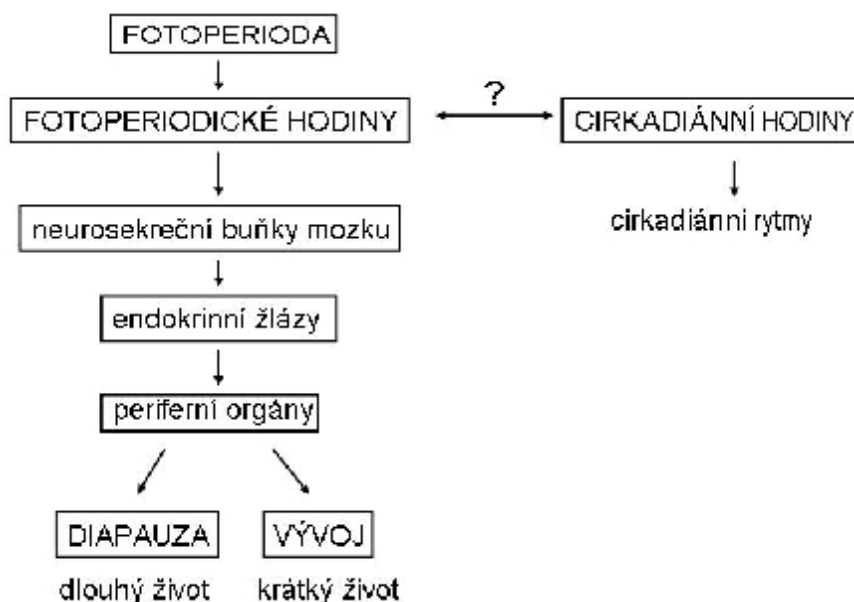
1.	ÚVOD.....	5
1.1.	Cirkadiánní rytmy.....	6
1.1.1.	Molekulární mechanismus v tkáních hlavy.....	6
1.1.2.	Hmyzí model <i>Drosophila melanogaster</i>	7
1.1.3.	Cirkadiánní regulace v periferních orgánech.....	8
1.1.4.	Diapauza versus cirkadiánní hodiny.....	9
1.1.5.	<i>Pyrrhocoris apterus</i> , diapauza a cirkadiánní geny.....	10
1.2.	Stárnutí.....	11
1.2.1.	Obecný mechanismus stárnutí.....	11
1.2.2.	Modifikace rychlosti stárnutí.....	12
1.2.3.	Insulin/IGF-like signální dráha (IIS).....	13
1.2.3.1.	IIS dráha, výživa a reprodukce.....	13
1.2.4.	Stárnutí a diapauza.....	14
2.	CÍLE PRÁCE.....	16
3.	MATERIÁL A METODY.....	17
3.1.	Pokusná zvířata.....	17
3.2.	Analýza exprese cirkadiánních genů <i>per</i> a <i>Pdp1</i> pomocí metody <i>real-time</i> RT PCR.....	17
3.2.1.	Změny exprese dvou genů cirkadiánních hodin během dne.....	19
3.2.2.	Vliv juvenilního hormonu na expresi genů <i>per</i> a <i>Pdp1</i>	19
3.3.	Detekce bombyxinu v CNS <i>P.apterus</i> pomocí imunohistochemie...	22
3.4.	Detekce proteinů insulin a bombyxin pomocí metody Western blot.....	23
3.5.	Grafické a statistické zpracování dat.....	25
4.	VÝSLEDKY.....	26
4.1.	Vztah mezi diapauzou a expresí genů cirkadiánních hodin v tukovém tělese	26
4.1.1.	Expese dvou genů cirkadiánních hodin během dne.....	27
4.1.2.	Vliv juvenilního hormonu na expresi genů <i>per</i> a <i>Pdp1</i>	29
4.2.	Stárnutí a diapauza.....	31
4.2.1.	Detekce insulin-like peptidů v CNS <i>P. apterus</i> pomocí imunohistochemie.....	31
4.2.2.	Detekce insulin-like peptidů v CNS <i>P. apterus</i> pomocí metody Western blot.....	34
5.	DISKUZE.....	35
5.1.	Expese genů cirkadiánních hodin a diapauza.....	35
5.2.	Insulin-like peptidy a diapauza.....	38
6.	ZÁVĚR.....	39
7.	LITERATURA.....	40
8.	PŘÍLOHA.....	46

1. ÚVOD

Život je dynamický systém. Organismus, který nereaguje na neustálé změny svého životního prostředí, je organismus odsouzený k zániku. Tyto změny se bohužel velmi často dějí v periodických cyklech a tak si organismy v průběhu evoluce, kdy byly vystaveny těmto denním a sezónním změnám, vyvinuly způsoby chování, jak se vypořádat se změnami ve svém okolí a jak jim přizpůsobovat svůj vývoj a fyziologické procesy.

Jedním z velmi důležitých faktorů, který usnadňuje živočichům orientaci, v jaké části „cyklu“ se zrovna nacházejí, je fotoperioda. Fotoperiodický systém vyžaduje několik základních součástí: 1. fotoreceptory, rozlišující světlo a tmu, 2. fotoperiodické hodiny, které měří délku dne a noci, 3. fotoperiodický počítač (též nazývaný paměťový článek), který kumuluje krátkodenní či dlouhodobé periodické signály, 4. endokrinní systém, který přímo řídí adaptační změny v cílových tkáních (Saunders 2002).

Zpracování fotoperiodického signálu centrálním nervovým systémem hmyzu na změny v hormonálním prostředí nebylo ještě zdaleka objasněno. Otázkou například zůstává, zda se řízení fotoperiodických hodin účastní i geny, které řídí hodiny cirkadiánní. Výstup fotoperiodického systému je však prostudován poměrně dobře. Informace o délce dne/noci je (spolu s teplotou) organismem vyhodnocena a podle toho buď pokračuje vývoj, nebo nastává tzv. diapauza. Je známo, že diapauza, jakožto hormonálně řízený stav, značně prodlužuje délku života (Obr.1). V této práci jsem se proto zaměřila na vztah mezi diapauzou, cirkadiánními hodinami a stárnutím.



Obr.1. Obecné schéma vztahu mezi fotoperiodou, cirkadiánními hodinami, diapauzou a délkou života u hmyzu

1.1. Cirkadiánní rytmy

Výše uvedené pravidelné střídání životních podmínek organismů vedlo k tomu, že téměř všechny děje v organismech, zejména biochemické reakce, probíhají rytmicky. A to jak na úrovni celého organismu, tak v tkáních či buňkách. Biologické rytmy se dělí podle délky periody. Přičemž perioda je doba, která uběhne, než se daná proměnná (např. koncentrace určitého hormonu v krvi) vrátí do výchozího stavu. Takto můžeme rozdělit biologické rytmy na ultradiánní, cirkadiánní a infradiánní. Ultradiánní rytmy mají periodu kratší než 20 hodin a jsou to např. rytmy srdeční aktivity. Infradiánní rytmy jsou rytmy s periodou delší než 24 hodin a patří mezi ně např. reprodukční cykly zvířat. Rytmy s periodou přibližně 24 hodin se nazývají cirkadiánní (circa = přibližně, dies = den). Tyto cirkadiánní rytmy musí však kromě periody splňovat i další vlastnosti. (1) Musí být endogenní, tj. geneticky determinované. V konstantních podmínkách (v konstantní tmě) běží s endogenní periodou, neboť není možné nastavit periodu dle světla). (2) Mají schopnost znovunastavení podle stimulů vnějšího prostředí (zejména světlem). K tomuto seřízení (entrainment) vnitřních biologických hodin dochází každý den v době svítání a stmívání. Zároveň mají (3) teplotní kompenzaci a tak jsou jen málo ovlivněny teplotou prostředí a jdou tedy stejně rychle v létě i v zimě.

1.1.1. Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin v tkáních hlavy

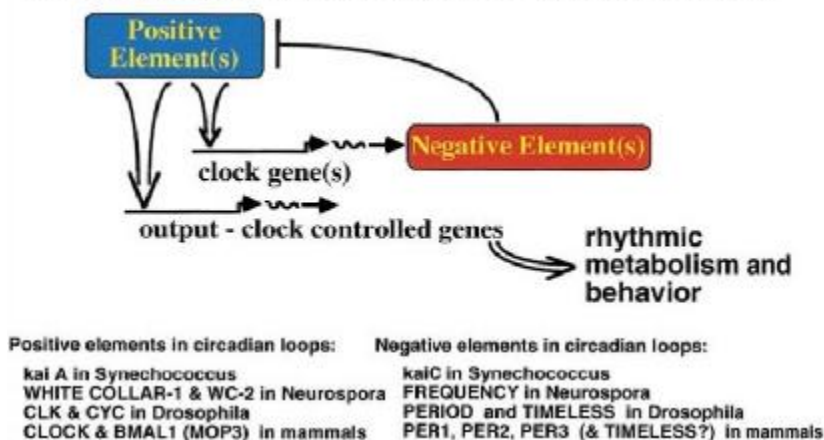
Geneticky podmíněný mechanismus cirkadiánních hodin je tvořen třemi částmi:

1. vstupní část (*input* systém). Tato část zajišťuje přenos informací z vnějšího prostředí do vnitřního prostředí vlastních biologických hodin. Mezi nejdůležitější stimuly vnějšího prostředí patří střídání světla a tmy a právě tyto informace slouží k synchronizaci vnitřních hodin.
2. hlavní oscilátor (*pacemaker*), tj. skupina buněk, ve kterých dochází k expresi genů biologických hodin a k tvorbě příslušných proteinů
3. výstupní část (*output* systém), která zajišťuje přenos informace z hodin do zbytku těla, do buněk, kde ovlivňuje expresi genů, které jsou řízeny biologickými hodinami.

Molekulární mechanismus cirkadiánních hodin je v současné době studován u mnoha modelových organismů, mezi které patří sinice *Synechococcus* (Kondo a Ishiura 2000), houba *Neurospora* (McWatters et al. 1999), octomilka *Drosophila melanogaster* (Stanewsky 2002), martináč *Antheraea pernyi* (Šauman a Reppert 1996) a myš *Mus musculus* (Hastings a Maywood 2000).

U těchto organismů bylo identifikováno několik genů, které jsou hlavními komponentami ve funkci cirkadiánních hodin, a zároveň byl popsán mechanismus fungování cirkadiánních hodin na molekulární úrovni. Obecně by se dalo říct, že se jedná o poměrně složité regulace na úrovni buněk, kdy transkripce některých cirkadiánních genů vede k translaci proteinů - negativních elementů, které blokují aktivitu jiných proteinů - pozitivních elementů, jejichž úkolem je aktivace cirkadiánních genů. Tak vzniká zpětná smyčka a realizace jedné této smyčky trvá zhruba 24 hodin (Obr.1). Pozitivní elementy jsou vedle aktivace cirkadiánních genů schopny aktivovat i geny, které nejsou přímo spjaty s biologickými hodinami, ale jejichž produkty jsou důležité pro jiné fyziologické procesy. Výsledkem je vznik cirkadiánně regulovaného metabolismu či chování.

Common Elements in the Design of Circadian Oscillators



Obr 2. Mechanismus zpětné vazby (převzato z Dunlap 1999)

1.1.2. Hmyzí model *Drosophila melanogaster*

Většina prací se zabývá studiem komponent a mechanismem regulace cirkadiálních hodin v nervové tkáni hlav. U hmyzu byl a je nejvíce zkoumán a popisován tento mechanismus pomocí genetických modifikací u octomilky *Drosophila melanogaster*. Geny, které zde hrají ústřední roli, jsou *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *clock* (*clk*), *cycle* (*cyc*), *double time* (*dbt*), *cryptochrome* (*cry*), *Pair Domain Protein 1* (*Pdp1*), *vriille* (*vri*), *shaggy* (*sgg*) a *casein kinase 2* (*CK2*). Klonováním cirkadiálních genů u dalších druhů hmyzu, například martináče *A. pernyi* (Reppert et al. 1994) a ploštice *P. apterus* (Syrová et al. 2003), byla zjištěna sekvenční homologie se známými cirkadiálními geny *D. melanogaster* a proto se u nich předpokládala i platnost stejného modelu řízení cirkadiálních hodin.

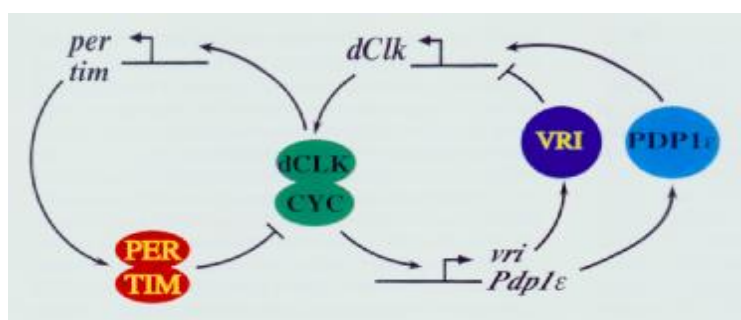
Výzkum cirkadiálních hodin u *Drosophila melanogaster* začal studií mutantů s porušeným cirkadiálním rytmem svlékání a lokomoční aktivitou (Konopka a Benzer 1971). Mutace označená jako *per⁰* způsobovala arytmičné líhnutí vajíček a pohybovou aktivitu. Druhá mutace – *per^S* – zkrátila periodu denní aktivity a líhnutí vajíček a naopak třetí mutace – *per^L* – prodloužila periodu cirkadiálního chování oproti divokému typu *D. melanogaster*. Všechny tři mutace ležely v jednom lokusu na chromozomu X, který byl pojmenován jako gen *period*. Později byl protein PERIOD (PER) detekován v některých neuronech a gliálních buňkách, ve fotoreceptorech složených očí, ve střevě, v *corpora cardiaca* a slinných žlázách (Hall 1995). Dále bylo zjištěno, že množství proteinu PER a *per* mRNA výrazně osciluje během dne a noci. Mezi největší akumulací *per* mRNA a maximálním množstvím proteinu PER je šestihodinová prodleva, což odpovídá autoregulační zpětné vazbě, ve které protein PER inhibuje svou vlastní transkripci (Hardin et al. 1990).

Jako druhý gen byl u *D. melanogaster* klonován *timeless* (*tim*) (Gekasis et al. 1995). TIMELESS (TIM) protein stejně jako *tim* mRNA vykazuje oscilaci během dne s přibližně stejnou fází jako u PER a *per* mRNA. Zároveň jsou proteiny PER a TIM exprimovány ve stejných fotoreceptorových buňkách a buňkách centrálního mozku u *D. melanogaster* (Sehgal et al. 1994, Hunter-Ensor et al. 1996). Protein TIM může tvořit s proteinem PER heterodimer. Tato interakce je nutná pro přechod proteinu PER do jádra. Protein TIM je citlivý na světlo, které ho degraduje (Iwasaki a Thomas 1997), proto při svítání dochází k rychlému rozpadu TIM a tím i

heterodimeru PER-TIM. Tato degradace proteinu TIM je mechanismem znovunastavení (*entrainmentu*) cirkadiálních hodin.

Dalším studiem mutantů s arytmiickým chováním vedlo k objevení dalších genů biologických hodin octomilky – genu *double-time (dbt)* (Kloss et al. 1998), *clock (clk)* (Allada et al. 1998) a *cycle (cyc)* (Rutila et al. 1998). Proteiny CLK a CYC mají funkci transkripčních faktorů. Tvoří heterodimery a mají schopnost vázat se na E-box promotorů genů *per* a *tim* a tím spustit jejich transkripci (Allada et al. 1998, Rutila et al. 1998).

Autoregulační mechanismus cirkadiálního rytmu v hlavě u *D. melanogaster* by se tedy dal popsat následujícím způsobem. Navázáním komplexu CLK-CYC na promotory genů *per* a *tim* dojde k zahájení jejich transkripce. Hladiny *per* mRNA a *tim* mRNA jsou ráno nízké, během dne se postupně zvyšují a svého vrcholu dosahují chvíli po setmění (Sehgal et al. 1995). Následuje jejich translace. Protein TIM je však citlivý na světlo (Suri et al. 1998) a je během dne fosforylován, označen a následně degradován v proteasomech (Naidoo et al. 1999). Monomer PER je také fosforylován proteinem DBT. Jakmile nastane tma, roste hladina proteinu TIM, který inhibuje protein DBT a tím umožňuje zvýšení hladiny PER monomerů. Proteiny PER a TIM se tak akumulují v cytoplazmě a vytvářejí heterodimer PER-TIM, který přechází do jádra buňky (okolo půlnoci) a blokuje nasednutí dimeru CLK-CYC na promotor a tím i aktivaci transkripce vlastních genů *per* a *tim*. Dimer CLK-CYC v noci aktivuje transkripci genů *vri* a *Pdp1*. Následná exprese proteinů VRI a PDP1 přímo reguluje expresi genu *clk*. Protein VRI se akumuluje jako první a blokuje expresi genu *clk*. Protein PDP1, který se akumuluje později, přibližně v polovině noci (kdy VRI přestává blokovat expresi *clk*), aktivuje transkripci *clk* mRNA. Nově vzniklý protein CLK je neaktivní, kvůli represi ze strany proteinu PER, ale jakmile je PER degradován, CLK-CYC reaktivuje transkripci *per/tim* a *vri/Pdp1* a začíná tak nový cyklus. Takto vlastně vzniká dvoustupňová regulace a mluví se o tzv. *two-loop* modelu (Cyran et al. 2003) (obr.2).

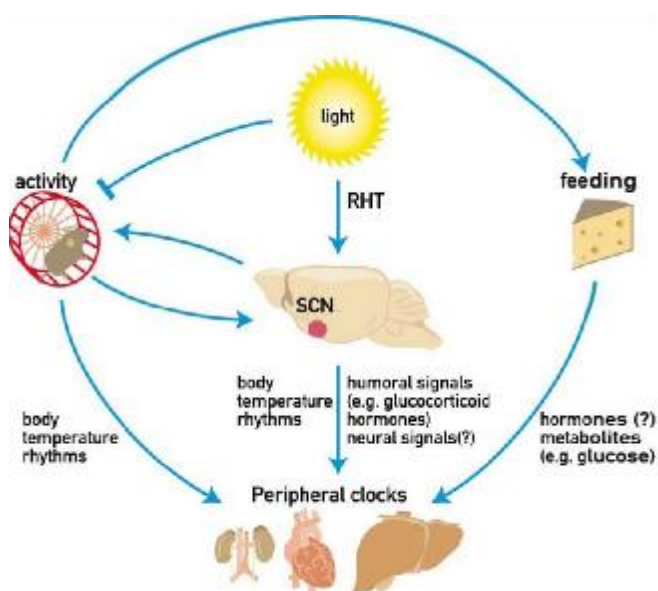


Obr. 3 „Two-loop“ model (převzato z Cyran et al. 2003)

1.1.3. Cirkadiální regulace v periferních orgánech

Většina studií u hmyzu, především u *Drosophila melanogaster* se zabývá mechanismem „zpětné vazby“ v nervových tkáních hlavy, protože jsou zde cirkadiální hodiny zodpovědné za řízení lokomoční aktivity a rytmu svlékání. Ale geny cirkadiálních hodin jsou exprimovány i v jiných tkáních, jako je hrudní ganglion, slinné žlázy, Malpighické trubice, ovaria, varlata, tukové těleso a střevo. A prací, ve kterých by se zkoumaly molekulární rytmy například genu *period* a rytmy chování v těchto periferních tkáních, je podstatně méně.

U savců sídlí hlavní oscilátor (pacemaker) v suprachiasmatickém jádře hypothalamu (SCN). Informace o světelné délce dne obdrží neurony SCN prostřednictvím retinohypothalamického traktu od buněk sítnice. Tento hlavní oscilátor synchronizuje vedlejší oscilátory v periferních tkáních, jako jsou játra, srdce a ledviny. Oscilátory v periferních tkáních nejsou schopny reagovat přímo na světelný podnět jako hlavní oscilátor. Synchronizace oscilátorů v periferních tkáních probíhá zřejmě dvěma způsoby. Přimo, prostřednictvím signálů vysílaných z SCN. Několik pozorování naznačuje, že významnou roli zde bude mít glukokortikoidní signální dráha (Balsalobre et al. 2000, Le Minh et al. 2001). Další cesta synchronizace periferních orgánů obchází SCN a rozhodujícím faktorem je zde obvyklá doba příjmu potravy (obr.3).



Obr.4. Cesty synchronizace periferních orgánů u savců (převzato z Schibler a Sassone-Corsi 2002)

Na rozdíl od savců, se u hmyzu předpokládá, že zde chybí neuro-humorální regulace vedlejších oscilátorů hlavním *pacemakerem*. Má se za to, že oscilátory v periferních tkáních jsou nezávislé na oscilátoru v mozku a hormonálním prostředí a jsou schopny se sami nastavovat prostřednictvím světla (Plautz et al. 1997, Giebultowicz et al. 2001). Výsledky několika prací ukazují, že mechanismus autoregulační zpětné vazby funguje podobně jako v hlavě i v periferních tkáních, ale naznačují, že se chová odlišně v podmínkách konstantní tmy (Hardin 1994). Jedinou zjištěnou výjimkou, kde nebyl zjištěn rytmus v expresi genu cirkadiánních hodin - *period*, jsou ovaria u *D. melanogaster* (Beaver et al. 2007).

1.1.4. Diapauza versus cirkadiánní hodiny

U modelového organismu *D. melanogaster* byla, zejména prostřednictvím genových manipulací, role genů cirkadiánních hodin v rámci cirkadiánních rytmů důkladně studována, ale jejich role ve vztahu k fotoperiodě nebyla ještě zcela pochopena. V tomto směru *D. melanogaster* není nejlepší model, protože vykazuje pouze slabou reprodukční dormanci. Ta je indukována nízkými teplotami okolo 12 °C (Saunders 1990, Denlinger 2002). Cesta k objasnění vztahu mezi geny cirkadiánních hodin a hodinami fotoperiodickými vede především

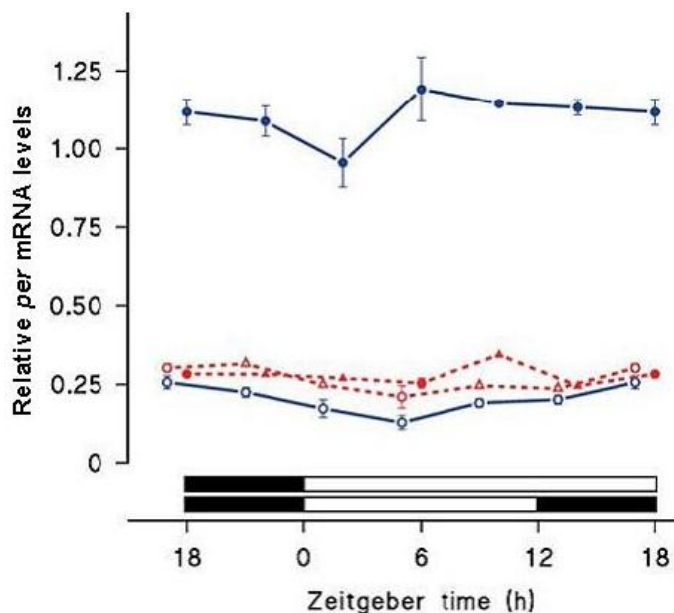
prostřednictvím studia mutantů, kteří nepodléhají diapauze. Mutanti *Chymomyza costata*, kteří nevstupují do diapauzy, nevykazují rytmus v svlékání (Lankinen a Riihimaa 1992), mají v hlavách konstantně nízkou hladinu *per* mRNA (Košťál a Shimada 2001) a dokonce zde nebyla detekována žádná *tim* mRNA (Pavelka et al. 2003). Provedená genetická analýza těchto mutantů odhalila, že ztráta diapauzy je spojena s absencí genu *tim* (Pavelka et al. 2003), gen *per* však u těchto mutantů nechybí (Košťál a Shimada 2001). Navíc bylo pomocí RNA interference prokázáno, že potlačení exprese genu *tim* redukuje četnost diapauzy (Pavelka et al. 2003). Tyto výsledky u *C. costata* demonstrují funkční spojitost mezi expresí genu *tim* a fotoperiodickým systémem. U dalšího zástupce z řádu hmyzu, masařky *Sarcophaga bullata*, je ztráta fotoperiodické odpovědi spojena opět s arytmiickým svlékáním dospělců. Expresí genů *per* a *tim* je však u mutantů vyšší, než u divokých jedinců (Goto et al. 2006). Je možné, že zvýšení exprese těchto genů u nediapauzních mutantů má souvislost s poškozením části systému, který je potřebný jak pro cirkadiální, tak fotoperiodické rytmy.

1.1.5. *Pyrrhocoris apterus*, diapauza a cirkadiální geny

Modelový organismus pro tuto práci, ploštice *Pyrrhocoris apterus* vykazuje silnou fotoperiodickou odpověď a proto by mohla sloužit také jako vhodný model k objasnění vztahu mezi cirkadiálními a fotoperiodickými hodinami. Samice *P. apterus* kladou vajíčka v období od konce dubna do konce května. Následujících 5 larválních instarů se vyvíjí během letních měsíců a koncem srpna/začátkem září vstupují do diapauzy. Diapauza je dokončena koncem prosince a vystřídána obdobím kviescence, která je již ovlivňována přímo vnějšími podmínkami. Pro diapauzu je typická nízká metabolická aktivita, redukce morfogeneze a s tím související zvýšená odolnost vůči extrémním vnějším podmínkám.

O délce dne se dozvídají neurosekreční buňky *pars intercerebralis* centrálního mozku. Pokud je světelná část dne dostatečně dlouhá (Long Day, LD) aktivují tyto buňky endokrinní žlázu *corpus allatum* a ta vylučuje juvenilní hormon. Juvenilní hormon hraje klíčovou roli v regulaci rozmnožování u dospělců. Stimuluje ukládání žloutku v oocytech, syntézu vitelogeninů v haemolymfě u samic a růst akcesorických žláz u samců (Šauman a Sehnal 1997). Avšak v krátkém dnu (Short Day, SD) je *corpus allatum* neurosekrečními buňkami mozku inhibováno (Hodková 1976). Juvenilní hormon se nevylučuje, vitelogeniny v hemolymfě chybí, ale je přítomno velké množství hexamerních, zásobních proteinů (Socha et al. 1991, Sula et al. 1995).

U *P. apterus* byla měřena hladina *period* mRNA (Obr.4) a *clock* mRNA v hlavách během 24 hodin. Bylo zjištěno, že exprese těchto genů vykazuje jen slabý rytmus v průběhu dne, ale výrazně se liší u diapauzních (chovaných v podmínkách SD) a nediapauzních (chovaných v podmínkách LD) jedinců. Hladina *per* mRNA byla až 10x vyšší, hladina *clk* mRNA cca 2x vyšší v podmínkách SD než LD. (Hodková et al. 2003, Surová et al. 2003). V tomto pokusu byly sledovány také mutantní ploštice, reprodukčně aktivní v podmínkách LD i SD. U těchto mutantů, necitlivých vůči fotoperiodě, byly hladiny mRNA obou genů nízké (v podmínkách LD i SD) - podobné hladinám mRNA naměřených u divokých skupin chovaných v podmínkách LD. To by mohlo naznačovat, že sledované geny cirkadiálních hodin mají důležitou funkci ve výstupní dráze k diapauze/reprodukci a nehrají centrální roli v rámci hodin fotoperiodických.



Obr.5. Relativní hladina per mRNA v průběhu 24 hodin v hlavách samic *P. apterus* (převzato z Syrová et al. 2003)

modrá barva- divoký kmen (plný znak-podmínky SD, prázdný znak- podmínky LD)
červená barva- mutantní kmen (plný znak-podmínky SD, prázdný znak- podmínky LD)

Výsledky dalšího experimentu, ve kterém byly stanovovány hladiny *per* mRNA v mozcích, ukázaly, že se hladiny *per* mRNA u diapauzních a nediapauzních samic neliší (Šauman, unpubl.). Protože v hlavách ploštic *P. apterus* je velké množství tukové tkáně, vedlo toto zjištění k předpokladu, že za odlišnou hladinou *per* mRNA v hlavách diapauzních a nediapauzních ploštic stojí tukové těleso.

1.2. Stárnutí

Stárnutí je primární a fascinující životní proces s obrovskou přírodní diverzitou. Krysa žije tři roky, veverka 25 let. Některé organismy stárnou a umírají rychle po spáření, některé organismy mají svoji životní křivku mnohem delší a na mnoha dlouhověkých organismech (některé ryby a želvy) lze proces stárnutí jen těžko postřehnout. Diverzita v procesu stárnutí existuje i u monozygotických dvojčat, projevuje se i v rámci jednoho organismu. Doba života, po kterou organismus existuje, je závislá jednak na zděděné genetické informaci, jednak na velkém množství faktorů vnějšího životního prostředí.

1.2.1 Obecný mechanismus stárnutí

Většina teoretických studií přisuzují stárnutí buňky k akumulaci širokého spektra poškození buněčných struktur. Rychlost, kterou se tyto vady hromadí, je dána geneticky determinovanou investicí do údržby a opravy buňky. Dlouho-žijící organismy věnují větší pozornost údržbě a opravě buňky, než krátce-žijící organismy, a proto hromadění poškození trvá delší dobu. Na molekulární úrovni bylo zaznamenáno několik velice důležitých mechanismů, které poškozují makromolekuly.

Je prokázáno, že s věkem přibývají somatické mutace a další formy poškození DNA. Kapacita pro opravu DNA je důležitý determinant rychlosti stárnutí na úrovni molekul a buňky. Dobře je tento proces ilustrován na studiu enzymu poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), který je klíčový v bezprostřední buněčné odpovědi k stresem indukovanému poškození DNA. Vyšší hladina PARP-1 je spojena s delší délkou života (Grube a Bürkle 1992, Muir et al. 1998).

Neopomenutelným faktorem v procesu stárnutí buněk některých organismů je zkracování délky telomer během dělení buněk. Telomery chrání konce chromozomů a vyvinuly se nejspíše jako ochranný mechanismus proti nekontrolovatelnému buněčnému dělení (nádorové buňky). Zkracování telomerické DNA je připisována tzv. problému konce replikací - neschopnosti při replikaci zcela prodloužit konce nových vláken DNA. Studii bylo dokázáno, že oxidační stres (tvorba volných radikálů) urychluje zkracování telomer (von Zglinicki 2002).

Hlavními zdroji volných radikálů v živých organismech jsou běžné životní pochody, při nichž buňka získává energii nebo štěpí látky nutné pro buněčnou výživu, některé chemické reakce, spontánně probíhající uvnitř buněk (zvláště za přítomnosti cizorodých látek) a ionisující záření, reprezentované nejčastěji ultrafialovým zářením pocházejícím ze Slunce. Primárně působí volné radikály na biologicky důležité makromolekuly, zejména na bílkoviny, tuky a nukleové kyseliny. Důsledkem může být ztráta enzymatické aktivity bílkovin, ztráta informací u DNA, z čehož vyplývá nebezpečí poškození a zániku buňky a vznik rakovinných buněk.

Důležitou souvislostí mezi molekulárním stresem a stárnutím se zdá být akumulace mutací v mitochondriální DNA (mtDNA) s přibývajícím věkem (Wallace 1999). Mutace mitochondriální DNA (které mají povětšinou charakter delecí) jsou příčinou zvýšené citlivosti mitochondriálních membrán k poškození metabolickými produkty, k poruchám metabolických funkcí a v důsledku toho i urychlení degenerativních procesů a buněčného stárnutí. Buňky, ve kterých mtDNA mutace dosáhnou vysoké úrovně se projevují snížením produkce energie ve formě ATP, což má za následek pokles energie v tkáňové bioenergetice.

S věkem tedy obecně přibývá akumulace zbytečných a poškozených proteinů v buňkách a obnovení jejich funkce, případně jejich likvidace v proteasomech prostřednictvím tzv. *chaperonů*, s věkem ztrácí na účinnosti (Carrard et al. 2002).

1.2.2. Modifikace rychlosti stárnutí

Mechanismus stárnutí je podroben během posledních let intenzivnímu výzkumu. Velkou snahou bylo identifikovat geny, které se účastní procesu stárnutí, pomocí geneticky modifikovaných organismů.

U těchto geneticky pozměněných různorodých organismů, například háďátka *Caenorhabditis elegans* (Braeckman et al. 2001, Hekimi et al. 2001), octomilky *Drosophila melanogaster* (Clancy et al. 2001, Tatar et al. 2001) a myši *Mus musculus*, byl nalezen stejný evolučně konzervovaný mechanismus kontroly stárnutí, ve kterém hrají hlavní roli insulinu podobné (insulin-like) peptidy, insulin-like růstový faktor (IGF), steroly a lipofilní signální molekuly.

1.2.3. Insulin/IGF-like signální dráha (IIS)

Expres genů, které ovlivňují délku života, vede k sekreci hormonů, spotřebě energie a výsledkem je signalizace do tkání. Spousta mutací, které prodlužují délku života, mění endokrinní signalizaci do tkání.

Nejlépe prozkoumaná signální dráha je tzv. insulin/IGF-1. Tato signální dráha byla prvně zkoumána u *dauer* larvy háďátka *C. elegans*, kde mutace v genu *daf-2*, kódujícího insulin/IGF-1 receptor, prodlužovala délku života dvakrát (Kenyon et al. 1993). V souvislosti s mutací v tomto regulačním genu byly objeveny další molekuly, které interagují s genem *daf-2*. Pokus s genetickou mozaikou *C. elegans* ukázal, že buňky, které měly mutaci v genu *daf-2* byly schopné poslat signál „dlouhověkosti“ buňkám, které tuto mutaci neměly (Apfeld a Kenyon 1998). U *C. elegans* je v současné době identifikováno mnoho genů, které jsou downstream od insulin/IGF-1 receptoru a mnoho z nich má vliv na délku života. Patří mezi ně antioxidantní geny, metabolické geny, geny zahrnuté v glyoxalátovém cyklu a antibakteriální geny. Spousta těchto genů má vliv na délku života tím, že chrání organismus před vnějšími stresovými faktory, jako například před teplem, UV zářením a oxidativním stresem. Tyto poznatky demonstrovaly, že stárnutí u *C. elegans* je podřízeno hormonální regulaci.

Mutace v receptoru insulin/IGF-1 prodlužuje délku života také u *Drosophila melanogaster* a to až o 80 % (Tatar et al. 2001). Navíc bylo zjištěno, že další mutace, downstream od genu pro receptor insulin/IGF-1, v genech, které mají tzv. FOXO vazebné místo, mají zřetelný vliv na délku života (Junger et al. 2003, Lee et al. 2003, Giannakou et al. 2004). Například tzv. mutace *chico*, prodlužuje život o 40 % (Clancy et al. 2001, Tu et al. 2002).

Insulin/IGF-like signální dráha (IIS), která se tedy zdá být pouze jedním krokem v signální kaskádě ovlivňující délku života, má souvislost i s dalšími biologickými procesy jako je reprodukce, příjem potravy, rezistence ke stresu a diapauza.

1.2.3.1. IIS dráha, výživa a reprodukce

IIS dráha je citlivá na výživu (Ikeya et al. 2002, Nässel 2002). Omezený přísun potravy (ne však tak malý aby docházelo k hladovění) je schopný též prodlužovat délku života. Střídme stravování má blahodárny vliv na délku života u různých živočichů, například kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (Jiang et al. 2000), háďátka *Caenorhabditis elegans* (Houthoofd et al. 2003), octomilky *Drosophila melanogaster* (Chapman a Partridge 1996), hlodavců (Weindruch a Walford 1988), primátů (Lane et al. 2004) i člověka (Fontana et al. 2004).

U modelového organismu *D. melanogaster* byly pozorovány specifické odpovědi na dietu s výrazným prodloužením délky života u samic (méně u samců) (Magwere et al. 2004). Výsledek studie poukazuje na to, že buď dopad výživy nebo IIS signalizace se liší mezi dvěma pohlavími. Toto bylo potvrzeno i dalšími studiemi s trpasličími mutanty (s mutací v insulin-like receptoru; InR) *D. melanogaster*, kde byla délka života také více prodloužena u samic než u samců (Clancy et al. 2001, Tatar et al. 2001).

I když už je po několik let existují důkazy pro vztah mezi délkou života a reprodukcí, je tento vztah neustále diskutován a doupřesňován (Barnes a Partridge 2003, Tu a Tatar 2003). Jak již bylo výše uvedeno, mutace v insulin/IGF-1 signální dráze (IIS) a redukovaný příjem potravy mají schopnost znatelně prodlužovat délku života. Ovšem vliv těchto dvou faktorů na

rozmnožovací schopnost není kladný. Mutace v genech, které kódují komponenty zahrnuté v IIS sice prodlužují délku života, ale zároveň redukuje plodnost. Stejně tak dieta má negativní vliv na rozmnožování.

Energie, která je investována do reprodukce, chybí v dalších procesech (jako údržba a oprava buněčných komponent)- proto rozmnožování obecně zkracuje délku života. Snížená plodnost v souvislosti s malým příjmem potravy je nejspíše evolučně vyvinutý mechanismus. Organismy se tímto snaží překlenout nepříznivé „hubené“ podmínky, snaží se žít déle s vírou v lepší časy a neplodit do této nepříznivé doby své potomky. Avšak ne u všech zkoumaných organismů nutně délka života redukovala plodnost. U *C. elegans* někteří mutanti s redukovanou IIS dráhou vykazovali nesníženou plodnost (Gems et al. 1998) a ani vyoperování gonád neprodlužovalo jejich délku života (Hsin a Kenyon 1999).

1.2.4. Stárnutí a diapauza

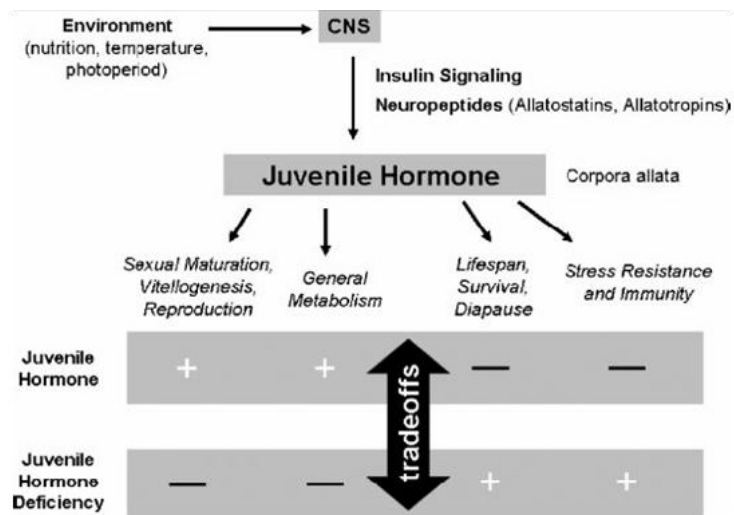
Reprodukční diapauza hmyzu, která značně prodlužuje délku života dospělce (někdy i o několik let), je výborným modelem pro studium řízení délky života u divokých, ne geneticky manipulovaných, organismů.

Jak již bylo v této práci rozebíráno, zkoumaná ploštice *P. apterus* má imaginální reprodukční diapauzu. Do diapauzy vstupují dospělci vlivem krátkých dnů i při poměrně vysoké teplotě 25 °C (Hodek a Hodková 1988). Geny zahrnuté v regulaci diapauzy (reprodukci) nebyly u *P. apterus* identifikovány, ale jsou zde známy mnohé fyziologické skutečnosti, ke kterým během reprodukce / diapauzy dochází. Inhibice (neurosekrečními buňkami centrálního mozku) žlázy *corpus allatum* a absence juvenilního hormonu v diapauze je zodpovědná za další procesy spojené s reprodukcí, jako je inaktivita akcesorických reprodukčních žláz u samců (Sauman a Sehnal 1997) a absence vyžrávání ovarii u samic (Hodková 1976). Absence juvenilního hormonu nevysvětluje však všechny znaky, kterými se diapauza projevuje, například absenci páření (Hodková 1994) a větší pokles respirace u diapauzních než u allatektomovaných samic *P. apterus*. Za nižší respiraci u diapauzních samic se zdají být spolu s juvenilním hormonem zodpovědné i hormony vylučované z *corpora cardiaca*. Je známo, že vyjmutí žláz *corpora cardiaca* u larev má za následek výrazné potlačení růstu a spotřeby kyslíku (Sláma 1965), což naznačuje, že žlázy *corpora cardiaca* mají schopnost ovlivňovat růst, stejně tak jako inzulin-like peptidy (Tu a Tatar 2003).

Průměrná délka života *P. apterus* je delší u samců, než u samic a mechanismus regulace délky života se mezi těmito pohlavími liší (Hodková unpubl.). Narozdíl od samic, allatektomie či diapauza u samců nemá tak zřetelný vliv na spotřebu kyslíku, či spermatogenezi (Sláma 1964). U diapauzních samců je akt páření inhibován taktéž neurosekrečními buňkami pars intercerebralis centrálního mozku, ale žláza *corpus allatum* tuto inhibici nezprostředkovává (Hodková 1994).

Předpokládá se, že juvenilní hormon hraje zásadní roli v zprostředkování rovnováhy mezi reprodukcí a stárnutím (Tatar a Yin 2001, Flatt et al. 2005) (Obr.5). Tento názor byl podpořen výsledky pokusů i u zástupců z řad hmyzu, kde bylo allatektomií, případně aplikací analogu juvenilního hormonu zdokumentován vliv juvenilního hormonu na délku života. Např. u sarančete (Pener 1972), u motýla *Danaus plexippus* (Herman a Tatar 2001) a *Drosophila melanogaster* (Tatar et al. 2001). K objasnění vztahu mezi IIS a juvenilním hormonem přispěla studie u *D. melanogaster*. Dospělí mutanti v insulin-like receptoru (InR), byli malí,

jejich ovaria zůstaly v previtelogenezi, ale život jim byl tímto prodloužen o 85%. Podání juvenilního hormonu těmto trpasličím mutantům vedlo k normální vitelogenezi a normální délce života (Tatar et al. 2001).



Obr.6. Role juvenilního hormonu v procesu stárnutí (převzato z Flatt et al. 2005)

Dalšími hormony zprostředkujícími rovnováhu mezi reprodukcí a stárnutím by mohly být ekdysteroidy. Ovaria InR trpasličích mutantů u *D. melanogaster* produkují málo ekdysonu (Tu et al. 2002). Mutanti v tomto ekdysonovém receptoru se vyznačují zvýšenou délkou života a odolností vůči stresům avšak bez viditelného omezení v plodnosti i aktivitě. Mutanti deficientní v syntéze ekdysonu vykazují podobné znaky, které lze potlačit podáním ekdysonu v potravě (Simon et al. 2003). U dospělých samic komára *Aedes aegypti* se prokázalo, že podání insulinu má přímý stimulující efekt na produkci ekdysteroidů v ovariích (Riehle a Brown 1999).

Insulin-like peptidy jsou u hmyzu exprimovány hlavně v protocerebrálních neurosekrečních buňkách (NSC) a jsou uvolňovány z *corpora cardiaca* (Cao a Brown 2001, Nässel 2002, Rulifson et al. 2002) a z *corpora allata* (Mizoguchi et al. 1990). Za ekvivalent insulinu u savců je označován bombyxin. Bombyxin je peptid syntetizovaný neurosekrečními buňkami mozku housenky bource *Bombyx mori*. Tento peptid je transportován do *corpora allata*, uvolňován do haemolymfy a funguje jako hormon (Mizoguchi et al. 1987, 1990). Jeho uvolňování z mozku je stimulováno přísunem potravy a inhibováno hladověním (stejně tak jako insulinu u savců) (Masumura et al. 1999).

2. CÍLE PRÁCE

Cílem této magisterské práce bylo přinést poznatky o vztahu mezi diapauzou a expresí genů cirkadiálních hodin v tukové tkáni plošnice *Pyrrhocoris apterus*. Dalším úkolem bylo objasnit možnou souvislost mezi diapauzou/reprodukční aktivitou a množstvím proteinů inzulínového typu.

2.1. Vztah mezi diapauzou a expresí genů cirkadiálních hodin v tukovém tělese

Metodou *real-time* RT PCR zjistit:

- zda exprese dvou genů cirkadiálních hodin *period* a *Pair Domain Protein 1* v tukové tkáni vykazuje rytmus během dne
- zda se exprese těchto genů v tukovém tělese liší u diapauzních a nediapauzních ploštic *P. apterus*
- zda a případně jakou úlohu má v tomto procesu juvenilní hormon

2.2. Vliv diapauzy na expresi proteinů inzulínového typu

Detekovat případný kvantitativní rozdíl v expresi tzv. inzulínu podobných peptidů pomocí protilátek proti bombyxinu a lidskému inzulínu v nervové tkáni hlavy u diapauzních a nediapauzních jedinců *P. apterus* metodami imunohistochemie a Western blot.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Pokusná zvířata

V experimentech byly použity pouze samice divokého kmene ploštic *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). Ploštice byly chovány hromadně ve sklenicích (0.5 l) uzavřených síťkou v termostatech při teplotě 26 ± 2 °C a krmeny lipovými semeny a vodou. Ploštice byly udržovány od vajíček jednak v proti-diapauzní fotoperiodě 18 h světla : 6 h tmy (režim dlouhého dne, Long Day, dále jen LD), jednak při pro-diapauzní fotoperiodě 12 h světla : 12 h tmy (režim krátkého dne, Short Day, dále jen SD).

3.2. Analýza exprese cirkadiánních genů *per* a *pdp1* pomocí metody *real-time* RT PCR

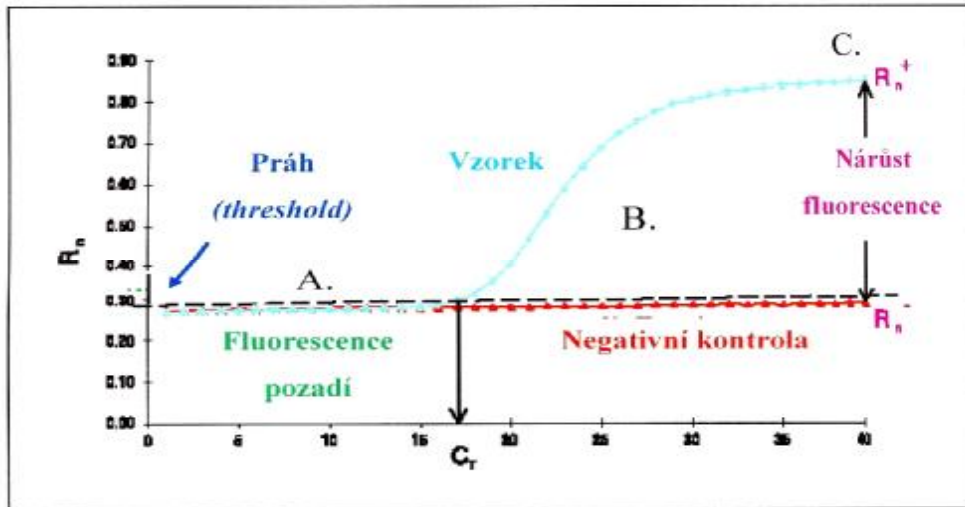
Princip *real-time* RT PCR:

Real-time polymerase chain reaction (*real-time* PCR) je laboratorní technika používaná ke kvantifikaci krátkého úseku DNA (obvykle 100-600 bazí). V kombinaci s reverzní transkripcí tak umožňuje kvantifikovat množství messenger RNA (mRNA) která se v konkrétní buňce nebo tkáni nachází.

Pro to, aby bylo možno odhadnout expresi sledovaného genu, je nutno k příslušné jednovláčkové mRNA pomocí reverzní transkriptázy nasynthetizovat druhé, komplementární vlákno - převést ji na tzv. cDNA. Následující princip se ale nijak neodlišuje od klasické PCR, kde je v každém cyklu nutné oddělení dvou vláken templátové DNA (denaturace, obvykle 92-95 °C), nasednutí primerů a syntéza nových vláken ve směru 5' → 3' pomocí DNA polymerázy.

Přístroj pro *real-time* PCR se odlišuje od běžného přístroje v tom, že dokáže v každém cyklu změřit množství přítomné DNA. K tomu se používala fluorescenční barvička Syber Green I (SG), která (po osvicení) emituje v roztoku nepatrné záření, které vzrůstá po navázání na dvouřetězcovou DNA. Při vhodné koncentraci barvičky je intenzita fluorescenčního signálu přímo úměrná množství dvouřetězcové DNA v přítomném roztoku. Nevýhodou tohoto detekčního procesu je skutečnost, že se Syber Green I váže na jakoukoli DNA (včetně nespecifických produktů) a je tedy nutné navrhovat co nejvíce specifické primery, redukovat tvorbu oligonukleotidových artefaktů (dimerů) a optimalizovat reakční podmínky.

Profil PCR reakce se skládá ze tří oblastí: (A) časná fáze, která trvá do té doby, dokud signál PCR produktu je nižší než signál pozadí; (B) exponenciální fáze (log fáze) a (C) tzv. plató, kdy je PCR reakce satureována a není možné získat více produktu (Obr.1.).



Obr.1. Znárodnění kinetiky *real-time* PCR

osa „y“ (R_n) ... míra fluorescence

osa „x“ ... počet cyklů

C_T ... cyklus prahové hodnoty

převzato z: [http:// dna-9.int-med.uiowa.edu/images/Amplotfig2.gif](http://dna-9.int-med.uiowa.edu/images/Amplotfig2.gif) (upraveno)

Princip vyhodnocování *real-time* PCR

Použitá metoda využívá kvantitativní vztah mezi množstvím cílové sekvence na počátku reakce a množstvím PCR produktu v určitém cyklu během exponenciální fáze. *Real-time PCR* systém umožňuje sledovat průběh PCR v reálném čase a stanovit tak oblast exponenciální fáze reakce, kdy lze kvantitativně hodnotit jednotlivé vzorky. V této exponenciální oblasti je průběh amplifikace popsán následující rovnicí:

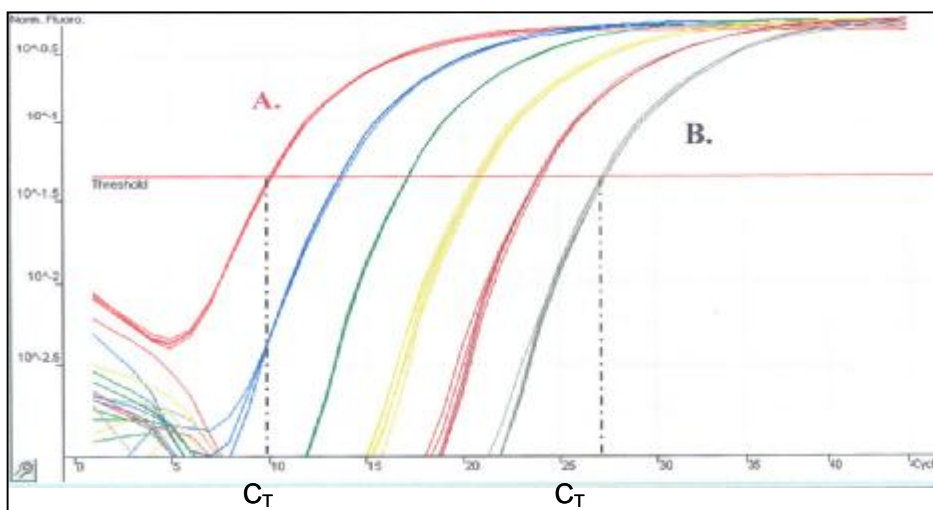
$$T_n = T_0 (E)^n$$

T_n = množství cílové sekvence v cyklu „n“ (*T-target*)

T_0 = počáteční množství cílové sekvence

E = účinnost amplifikace (E - *efficiency*)

V jakém cyklu bude signál vzorku vyšší než signál pozadí závisí na počátečním množství cílové sekvence. Cyklus, ve kterém fluorescence vzorků protne tzv. prahovou hodnotu (*threshold*), se nazývá průsečík prahové hodnoty (C_P), případně cyklus prahové hodnoty (C_T). Tato hodnota označuje cyklus, ve kterém je množství PCR produktu stejné u všech křivek, které jsou analyzovány. Vzorky s menším množstvím cílové sekvence dosáhnou této hodnoty v pozdějším cyklu než vzorky s vyšším množstvím (Obr.2.).



Obr.2. Znárodnění principu stanovení počátečního množství DNA pomocí *real-time* PCR

osa „y“ ... intenzita fluorescence

osa „x“ ... počet cyklů

C_T ... cyklus prahové hodnoty

vzorek **A.** dosáhl prahové hodnoty asi v 10. cyklu ($C_T=10$)

vzorek **B.** dosáhl prahové hodnoty přibližně v 27. cyklu ($C_T=27$)

→ vzorek **A.** obsahuje více cílové DNA než vzorek **B.**

(Real time summary, Version 1.7.; Corbett Research; upraveno)

3.2.1. Změny exprese dvou genů cirkadiálních hodin během dne

V tomto pokusu byly použity samice ploštic *P. apterus* 7 dní staré, chované v podmínkách LD a SD. Z obou těchto skupin zvířat byla každé čtyři hodiny po dobu 24 hodin pitvána tuková tělesa. Jednotlivá tuková tělesa byla pitvána v Ringerově roztoku, poté ihned přenesena do mikrozkuřavky na suchém ledu a do dalšího zpracování umístěna do mrazáku (-80 °C). Výsledky tohoto experimentu měly ozřejmit, zda hladiny *per* a *Pdp1* mRNA v tukovém tělese vykazují cirkadiální rytmus.

3.2.2. Vliv juvenilního hormonu na expresi genů *per* a *Pdp1*

Cílem tohoto pokusu bylo zjistit vztah mezi diapauzou, kde hraje hlavní roli endokrinní žláza *corpus allatum* a expresí dvou genů cirkadiálních hodin v tukovém tělese. V tomto experimentu byly opět použity 7dní staré samice, chované jak v podmínkách dlouhého dne, tak v podmínkách krátkého dne. První skupinu tvořily operované ploštice, kterým bylo odstraněno *corpus allatum* (provedla Dr. Hodková). Druhou (kontrolní) skupinou byly ploštice s cíleně poškozenou krční membránou. Třetí skupina zvířat, bez jakéhokoli zásahu, sloužila také jako kontrolní. Tuková tělesa byla vyjmuta z těla uvedených ploštic 7 - 10 hodin po rozsvícení světla v termostatech.

Hladiny *per* a *Pdp1* mRNA byly měřeny v obou experimentech (3.2.1., 3.2.2.) stejným způsobem metodou *real-time* RT PCR.

Pracovní postup:

a) Izolace celkové RNA za použití RNA Blue Kit (Top Bio)

- 1) Homogenizace:
 - ke tkáni přidat 2 x 0,5 ml RNA Blue, zhomogenizovat
 - inkubace při pokojové teplotě 5 minut (probíhá rozvolňování nukleoproteinového komplexu)
- 2) Fázová separace:
 - přidat 0,2 ml chloroformu
 - důkladně promíchat (vortex)
 - inkubace při pokojové teplotě 10 minut
 - centrifugace při 12 000 g, 15 minut, 4 °C (tímto dojde k rozdělení vzorku na tři fáze; dolní, modrá obsahuje proteiny; prostřední obsahuje DNA a bezbarvá horní RNA)
 - horní vodní fázi opatrně odebereme do nové mikroskopické zkumavky
- 3) Precipitace RNA
 - přidat 0,5 ml isopropanolu
 - mírně promíchat (vortex)
 - inkubace při 4 °C 10 minut
 - centrifugace při 12 000 g, 10 minut, 4 °C
- 4) Promytí RNA v ethanolu
 - odsát supernatant
 - přidat 1 ml 75 % ethanolu
 - důkladně protřepat
 - centrifugace při 12 000 g, 5 minut, 4 °C
 - odsát supernatant (ethanol)
 - centrifugace při 12 000 g, 3 minuty, 4 °C
 - odsát zbytky ethanolu
- 5) Rozpuštění RNA ve vodě
 - odpaření zbytku ethanolu (otevřená mikroskopická zkumavka)
 - přidat 20 µl H₂O bez RNáz
 - inkubace při pokojové teplotě 30 minut
 - promíchání DNA (vortex)
 - uložení do -80 °C

Jednotlivé vyzolované celkové RNA byly nanášeny do jamek na agarózový gel. Pomocí elektroforetogramu byly pak odhadnuty jednotlivé koncentrace RNA, což bylo potřebné pro následující syntézu cDNA (Obr.1., kapitola č.8.).

b) Syntéza cDNA

Použité reagensy: celková RNA, H₂O bez RNáz, směs deoxynukleotidů (dNTP Mix; 10 mM), primer = poly dT₁₂₋₁₈ (10µM), redukční činidlo proti vzniku dimerů - DTT (0,1M), pufr na syntézu komplementárního vlákna (First Strand Buffer) a reverzní transkriptáza (SuperScriptTMII; Invitrogen)

1) Denaturace templátu:

- namíchat reakční směs: dNTP Mix (2,5 mM)...4 µl
primer (10 µM)...1 µl
celková RNA ... max. 5 µg
RNase free H₂O ... doplnit do 12 µl

- inkubace : 65 °C / 5 min
- rychlé zchlazení na ledu (3 min)
- stočit

2) Příprava reakce:

- k reakční směsi přidat : DTT (0,1M) ...2 µl
First Strand Buffer ...4 µl
- inkubace: 42 °C / 2 min
- k reakční směsi přidat RT SuperScript II1 µl (= 200 U)

3) Vlastní syntéza cDNA:

- inkubace: 42 °C / 50 min
- stočit

4) Ukončení reakce:

- inkubace: 70 °C / 15 min
- ředění (25x) a aliquotování na ledu
- uložení cDNA: -20 °C

c) Vlastní *real-time* PCR

V experimentech jsem postupovala dle příručky výrobce (TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version; TAKARA BIO INC):

Použité reagensie:

Hot Start Taq DNA polymeráza (5 U/µl), 10x koncentrovaný pufr, dNTP Mix (10 mM), Syber Green (ředěná 1:1000 v H₂O), H₂O a primery (Tab.1., kapitola č.8.)

Reakční směs (master-mix):

PCR H₂O388,8 µl
dNTP's mix ... 64 µl
PCR pufr80 µl
Syber Green ... 32 µl
Taq DNA polymeráza ...3,2 µl
Primery8 + 8 µl

Reakční směs byla důkladně promíchána a rozpipetována do zkumavek po 15 µl, ke kterým bylo přidáno 5 µl zředěné cDNA. Každý vzorek byl měřen v tripletech. Do kontrolních reakcí bylo přidáno 5 µl H₂O.

Reakční program:

denaturace cDNA a aktivace enzymu: 5 min / 95 °C

40 cyklů: denaturace: 15 s / 94 °C

hybridizace primerů: 30 s / 59 °C

prodloužení dsDNA a načítání na Syber Green kanál: 40 s / 74 °C

načítání na Syber Green kanál: 15 s / 83 °C

Po proběhnutí potřebného množství cyklů následuje minutová inkubace při 50 °C a pak „melting analýza“ (od 50-96°C, rychlosti 1 °C za 10 s), citlivost načítání fluorescence (gain) byla nastavena na hodnotu 5.

d) Elektroforéza PCR produktů

Použité reagensy: agaróza, pufr TAE (4,85 g Tris baze; 1,14 ml 99 % kyseliny octové; 0,2 ml 0,5 M EDTA pH 8; H₂O do 1 l), marker (1kb+, Invitrogen), barvička (25 mg Bromphenol blue; 7,5 g Ficol; H₂O do 50 ml), roztok ethidia bromidu v pufru TAE

Pro ověření, zda se při *real-time* PCR amplifikuje pouze cDNA sledovaného genu, byla provedena elektroforéza. Na 2% agarózový gel bylo nanášeno vždy 15 µl PCR produktu s 3 µl barvičky. Elektroforéza běžela při konstantních 40 V sedm hodin. Gel byl dále ponořen na 20 minut do roztoku ethidia bromidu. Navázáním ethidia bromidu na molekuly DNA a umístěním gelu pod UV záření napojeného na počítač bylo možné DNA pomocí programu Grab It vizualizovat a vyfotit.

e) Hodnocení

Data byla vyhodnocována pomocí softwaru Rotor-Gene 6 (Corbett Research).

Pro analýzu kvantitativních dat byla použita relativní kvantifikace (vzájemné porovnání exprese dvou nebo více genů). Každý vzorek jsem měřila v tripletu a to zároveň pro sledovaný gen (*Pdp1/ per*) a referenční gen, tzv. *housekeeping gene* (zde ribozomální protein 49 = RP49). Pro další zpracování dat jsem používala Microsoft Excel, kde byly pro zjednodušení práce vytvořeny jednoduché vzorce. Kolikrát je v daném vzorku exprese cílového genu větší než exprese referenčního genu určuje následující rovnice (R):

$$R = E_{RP49}^{C_T RP49} / E_{vzorku}^{C_T vzorku}$$

Takto získané hodnoty byly dále normalizovány k jednomu vzorku, který byl opakovaně přítomen v každém měření.

3.3. **Detekce bombyxinu v CNS *P. apterus* pomocí imunohistochemie**

Pomocí imunohistochemie jsem zjišťovala lokalizaci bombyxinu, peptidu podobného inzulinu, v CNS u *P. apterus*. Primární protilátka proti 10-ti aminokyselinám na N-terminálním konci řetězci A bombyxinu I byla laskavě poskytnuta Dr. A. Mizoguchim (Masumura et al. 1999).

Pro tento pokus byly použity samice divokého typu:

- a) stáří 0-1 týden, chované v podmínkách SD
- b) stáří 0-1 týden, chované v podmínkách LD
- c) stáří 1-2 týdny, chované v podmínkách SD
- d) stáří 1-2 týdny, chované v podmínkách LD

Pitva komplexů mozek-suboesophageální ganglion včetně retrocerebrálního komplexu (*corpora cardiaca-corpora allatum*) uvedených skupin byla provedena jak v dopoledních, tak v odpoledních hodinách. Vypreparované komplexy byly přeneseny do porcelánové preparační misky s kapkou Ringerova roztoku. Komplex byl narovnan, nejdříve byla přikápnuta kapka fixážního roztoku, poté byl komplex přenesen do mikrozkušavky s tímto fixážním roztokem a ponechán zde přes noc.

Pro imunohistochemické šetření byla použita nepřímá metoda detekce, antigen byl detekován pomocí sekundární protilátky konjugované s enzymem křenovou peroxidázou (HRP).

Pracovní postup:

- 1) Fixace: 4 % p-formaldehyd (v PBS), přes noc, 4 °C
- 2) Promývání: 3x 10 minut v PBS-Trit. (= 3 % Triton v PBS), točit
- 3) Narušení mezibuněčných spojů uvnitř mozku: 0,5 mg kolagenázy/1 ml PBS, 60 minut
- 4) Dehydratace a následně rehydratace alkoholovou řadou: vždy 10 minut, točit (50 % methanol, 70 % methanol, 100 % methanol, 70 % methanol, 50 % methanol)
- 5) Promývání: 2x 10 minut v PBS-Trit., točit
- 6) Blokování nespecifických míst: 20 % kozí sérum v PBS-Trit., 2 hodiny
- 7) Primární protilátka: M-anti-AN-I 1:5 000 v PBS-Trit., 3 dny, 4 °C (AN-I = monoklonální protilátka IgG proti 10-ti AK na N-terminálním konci řetězce A bombyxinu I)
- 8) Promývání: 3x 10 minut v PBS-Trit., točit
- 9) Sekundární protilátka: G-anti-M IgG HRP 1 : 1 000 v PBS-Trit., 24 hodin, 4°C
- 10) Promývání: 1x 10 minut v PBS-Trit., 3x 5 minut v Tris-HCl (pH 7,6)
- 11) Detekce: 0,25mM DAB (v 0,005M Tris-HCl, pH 7,4) + 0,005 % H₂O₂, 20 minut; zastavení reakce dd H₂O
- 12) Montování: v kapce 80 % glycerolu přenést jednotlivé mozky na podložní sklíčka; krycí sklíčka orámovat lakem na nehty
- 13) Prohlížení a focení

3.4. Detekce proteinů inzulin a bombyxin pomocí metody Western blot

Pomocí metody Western blot (semi-dry) jsem detekovala v mozkové tkáni ploštic *P. apterus* tzv. insulin-like peptidy protilátkami proti lidskému insulinu a bombyxinu. Tento experiment měl objasnit, zda se liší množství těchto proteinů ve stejných tkáních u diapauzních a nediapauzních zvířat.

Princip:

Western blot je metoda umožňující detekci specifického proteinu ve směsi proteinů. Nejdříve jsou proteiny rozděleny pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Poté jsou proteiny z gelu elektroforeticky přeneseny na nitrocelulózovou membránu. K detekci daného proteinu je zapotřebí specifické protilátky. Nitrocelulózová membrána má sama o sobě spoustu nespecifických míst, kam se mohou vázat jak proteiny, tak protilátky. K blokování těchto nespecifických vazeb se používá např. roztok odtučněného sušeného mléka. „Ke zviditelnění“ antigenu byla použita

nepřímá metoda detekce. Primární protilátka se naváže na sledovaný protein a tento komplex protilátka-protein je dále detekován sekundární protilátkou s navázaným enzymem. V tomto případě byl používán enzym křenová peroxidáza (HRP), který v přítomnosti luminiscenčního roztoku způsobuje chemickou reakci, při níž se uvolňují fotony. Pomocí CCD kamery a počítače tak lze následně detekovat množství a pozici antigenu na membráně.

Příprava vzorků:

Použité reagensie:

Triple-detergent Lysis Buffer:

0,5 ml 1 M Tris.Cl pH 8
0,3 ml 5 M NaCl
0,1 ml 10 % SDS
0,1 ml Nonidet P-40
0,5 ml 10 % Sodium Deoxycholat
50 µl BM
20 µl 10 % Sodium Azide
dd H₂O do 10 ml

SDS-PAGE vzorkový pufr (5x):

5,8 ml 4x Tris.Cl/SDS pH
6,8
2,5 ml glycerol
0,8 g SDS
0,6 ml β-Mercaptoethanol
1,2 mg Bromphenol blue
dd H₂O do 10 ml

Komplexy (mozek + suboesophageální ganglion + *corpora cardiaca* + *corpus allatum*) byly vypitvány v Ringerově roztoku, poté ihned přemístěny do mikrozkuhavky na suchém ledu a nakonec skladovány v mrazáku (-80 °C) do dalšího zpracování. Celkem bylo vypitváno 40 komplexů ze samic o stáří 1-3 týdny chovaných v podmínkách LD a 40 komplexů ze samic téhož stáří chovaných v podmínkách SD.

Při dalším zpracování byly mozky homogenizovány v mikrozkuhavce umístěné na suchém ledu s 25 µl Triple-Detergent Lysing Buffer a stočeny (tento krok byl opakován cca 3x dokud pelet mozků nezmizel). Poté se přidalo 25 µl 5x SDS-PAGE vzorkového pufru, vzorky byly povařeny (100 °C/10 minut), stočeny (4 °C, 12 000 g, 5 minut) a supernatant byl přenesen do čisté mikrozkuhavky.

SDS elektroforéza:

Použité reagensie: gel gradientový 10-20 %, Tris-HCl (BIO-RAD), proteinový marker (Kaleidoscope Prestained Standards; BIO-RAD), elektrodový pufr (0,025 M/l Tris; 0,192 M/l Glycin; 0,1 % SDS; pH 8,3)

Vzorky byly nanášeny na gel po 15 µl, což přibližně odpovídalo proteinovému extraktu z jedenácti mozků. Elektroforéza probíhala při konstantních 30 mA po dobu přibližně 1,5 hodiny.

Blotování:

Použité reagensie: nitrocelulózová membrána (0,2 µm; BIO-RAD), Whatman 3MM blotovací papír, gel po elektroforéze, katodový pufr (25 mM Tris.Cl; 40mM Glycin; 20 % Methanol; pH 9,4), anodový pufr I (0,3 M Tris.Cl; 20 % Methanol; pH 10,4), anodový pufr II (25 mM Tris.Cl, 20% Methanol; pH 10,4)

Gel byl umístěn na třepačku do katodového pufru (15-30 min). Membrána o rozměru gelu byla umístěna do ddH₂O (5 min) a do anodového pufru II (5 min). Na blot byly postupně vrstveny na sebe 2 blotovací papíry namočené v anodovém pufru I, 1 blotovací papír namočený v anodovém pufru II,

membrána, gel a nakonec 4 blotovací papíry namočené v katodovém pufru. Blotování s konstantním nastavením proudu (2,5 A/cm² gelu) probíhalo 30 min.

Další postup:

Použité reagensy: sušené odtučněné mléko, PBS, PBS-Tw (= 0,3 % Tween20 v PBS), peroxidový a luminolový roztok (Pierce), sek. protilátky s navázanou křenovou peroxidázou (Pierce), prim. protilátka – Insulin (polyklonální protilátka proti 25-110 AK lidského inzulinu; Rb-králičí; H-86; Santa Cruz Biotechnology, Inc.), prim. protilátka - Bombyxin (viz. Kapitola 3.3.)

- blokování nespecifických vazeb: 5 % mléko v PBS, 1 hod, třepačka
- promývání: 3 x 10 min v PBS-Tw, třepačka
- primární protilátka: Rb-anti-insulin 1: 1000 (v PBS-Tw)
M-anti-Bombyxin 1: 50 000 (v PBS-Tw)
4 °C, přes noc, třepačka
- promývání: 6 x 10 min v PBS-Tw
- sekundární protilátka: G-anti-Rb IgG HRP 1: 20 000 (v PBS-Tw)
G-anti-M IgG HRP 1: 20 000 (v PBS-Tw)
pokojová teplota, 2 hod, třepačka
- promývání: 6 x 10 min v PBS-Tw
- aplikace peroxidového a luminolového roztoku: poměr 1:1 (0,125 ml / cm² membrány), 5 min

Membrána byla poté přenesena do detekčního zařízení, schopného vyhodnocovat emitované záření (detekční zařízení složené z CCD kamery a počítače, kde byl použit program Las 3000 pro vyhodnocení výsledků).

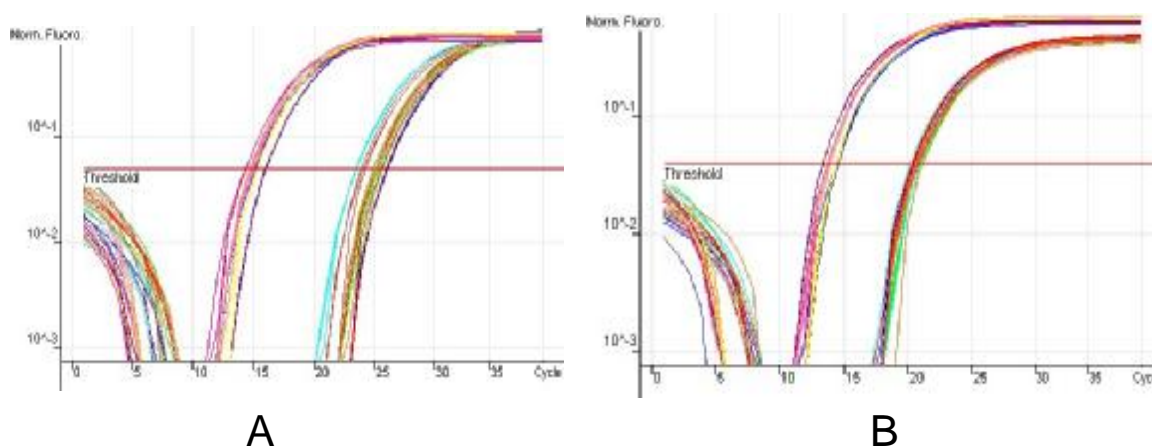
3.5. Grafické a statistické zpracování dat

Grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Excel a GraphPad Prism. Do grafů byly vyneseny průměrné hodnoty spolu se směrodatnou odchylkou (SEM). K statistickému vyhodnocení u *real-time* RT PCR byla použita jednocestná (3.2.2.) a dvoucestná (3.2.1.) ANOVA. Ke kvantifikaci množství peptidů u metody Western blot byl použit program ImageQuan verze 1.5.1.

4. VÝSLEDKY

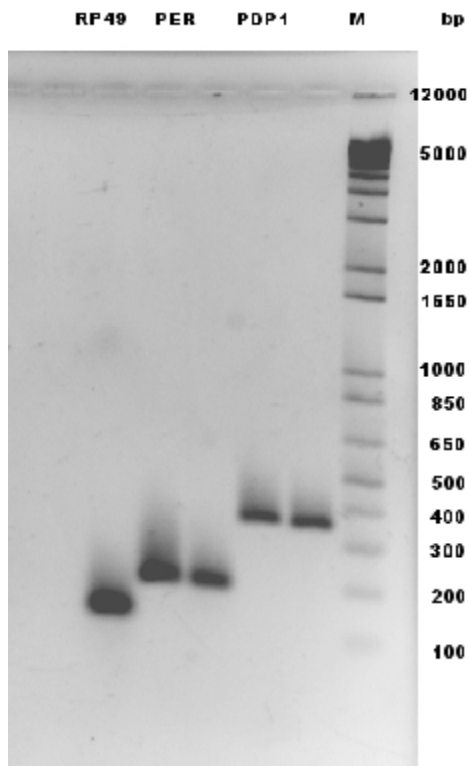
4.1. Vztah mezi diapauzou a expresí genů cirkadiálních hodin v tukovém tělese

Intenzitu fluorescenčního signálu v průběhu 40 cyklů znázorňuje „Graf A“ a „Graf B“. „Graf A“ ukazuje intenzitu normalizovaného fluorescenčního signálu získanou amplifikací *per* cDNA a RP49 cDNA během 40-ti cyklů. Cyklus prahové hodnoty, ve kterém je množství PCR produktů ve všech vzorcích stejné, je pro gen *period* (*per*) v rozmezí 22-27 cyklů. „Graf B“ znázorňuje intenzitu normalizovaného fluorescenčního signálu získanou amplifikací *Pdp1* cDNA a RP49 cDNA. Pro gen *PairDomainProtein1* (*Pdp1*) je cyklus prahové hodnoty v rozmezí cyklů 20-22. Cyklus prahové hodnoty pro referenční gen, kterým je ribozomální protein 49 (RP49), leží v intervalu cyklů 11-15.



- Graf A:** Intenzita normalizovaného fluorescenčního signálu jednotlivých cDNA genů RP49 a *per* v průběhu 40 cyklů *real-time* PCR
 $C_T(\text{RP49}) \dots 11-15$
 $C_T(\text{per}) \dots 22-27$
- Graf B:** Intenzita normalizovaného fluorescenčního signálu jednotlivých cDNA genů RP49 a *Pdp1* v průběhu 40 cyklů *real-time* PCR
 $C_T(\text{RP49}) \dots 11-15$
 $C_T(\text{Pdp1}) \dots 20-22$

Pro ověření, zda hodnoty naměřené pomocí metody *real-time* PCR odpovídají opravdu pouze expresi sledovaných genů v tukové tkáni, byla provedena elektroforéza. Na agarózový gel byly po amplifikaci jednotlivých cDNA nanášeny produkty sledovaných genů *per*, *Pdp1* a RP49. Na výsledném elektroforetogramu je patrné, že se při PCR amplifikovaly pouze cDNA sledovaných genů (Obr.1.). Z toho vyplývá, že byla dále kvantifikována opravdu pouze exprese daného genu.



Obr.1. Elektroforetogram PCR produktů

Při real-time PCR se amplifikuje pouze cDNA sledovaných genů *per*, *Pdp1* a *RP49* a vzniká tak vždy pouze jeden produkt pro daný gen.

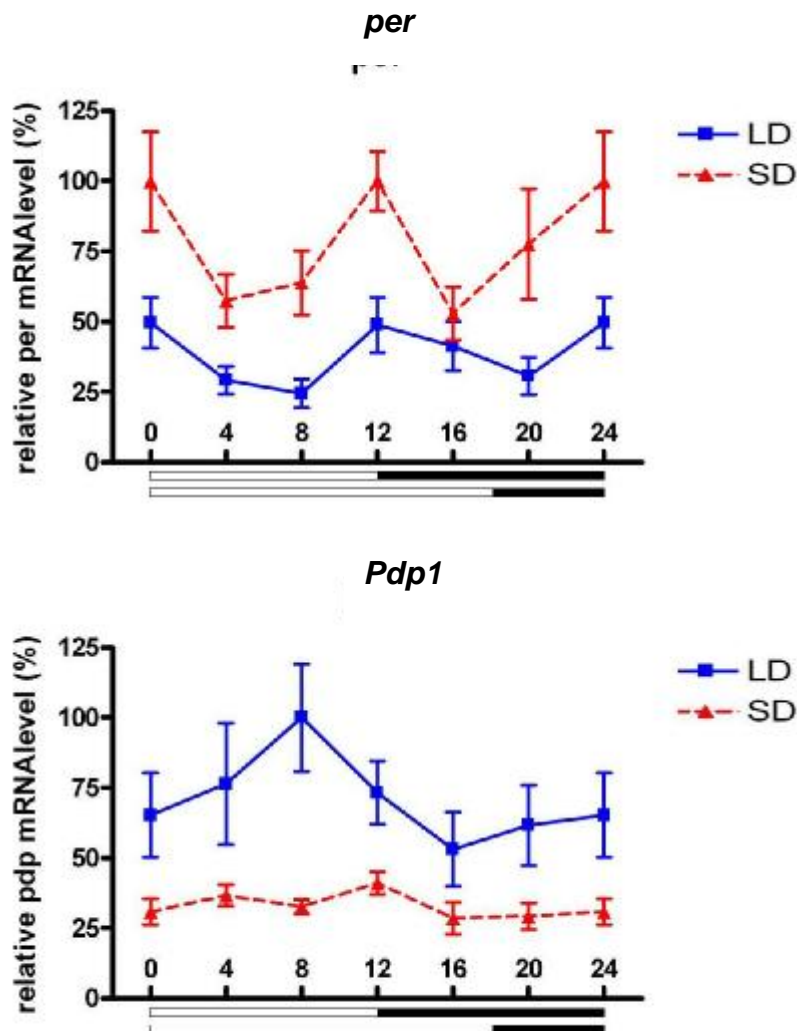
Hodnoty získané měřením hladin sledovaných genů *per/Pdp1* mRNA jednoho vzorku tukové tkáně byly porovnávány s hodnotami naměřenými pro referenční gen *RP49* mRNA téhož vzorku. Získané hodnoty byly vždy vztaženy k hodnotě jednoho vzorku, který byl opakovaně měřen v každém měření (přesný postup uveden v kapitole 3.2). Tímto způsobem zpracované relativní hodnoty byly dále zpracovány statistickým programem GraphPad Prism.

4.1.1. Exprese dvou genů cirkadiálních hodin během dne

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda exprese dvou genů cirkadiálních hodin *period* a *Pair Domain Protein 1* v tukové tkáni vykazuje rytmus během dne a zda se exprese těchto genů v tukovém tělese liší u 7 dní starých diapauzních a nediapauzních ploštic *P. apterus*. Každé 4 hodiny v průběhu 24 hodin bylo vypitváno pět tukových těles, a to jak ze samic chovaných v podmínkách SD, tak ze samic chovaných v podmínkách LD.

Výše popsaný postup zpracování naměřených hodnot (4.1.) poskytl data pro další vyhodnocení. Vyhodnocení bylo provedeno statistickou funkcí dvoucestná ANOVA, která provedla vyhodnocení výsledků (relativní hladiny *per/Pdp1* mRNA) v závislosti na dvou faktorech – kolísání hladin mRNA genů *per* a *Pdp1* během dne a fyziologickém stavu jedince (diapauza / reprodukce).

Zobrazené výsledky (Obr.1.) reprezentují vždy průměr hodnot z pěti vzorků \pm SEM. Graf „A“ znázorňuje relativní hodnoty *per* mRNA, graf „B“ *Pdp1* mRNA v tukovém tělese v průběhu 24 hodin.



A

B

Obr.2. Relativní hladiny *per* (A) a *Pdp1* (B) mRNA v tukovém tělese v průběhu 24 hodin

pod časovou osou x je grafické znázornění délky světla a tmy

pro podmínky SD (12 h světla : 12 h tmy), pro podmínky LD (18 h světla : 6 h tmy)

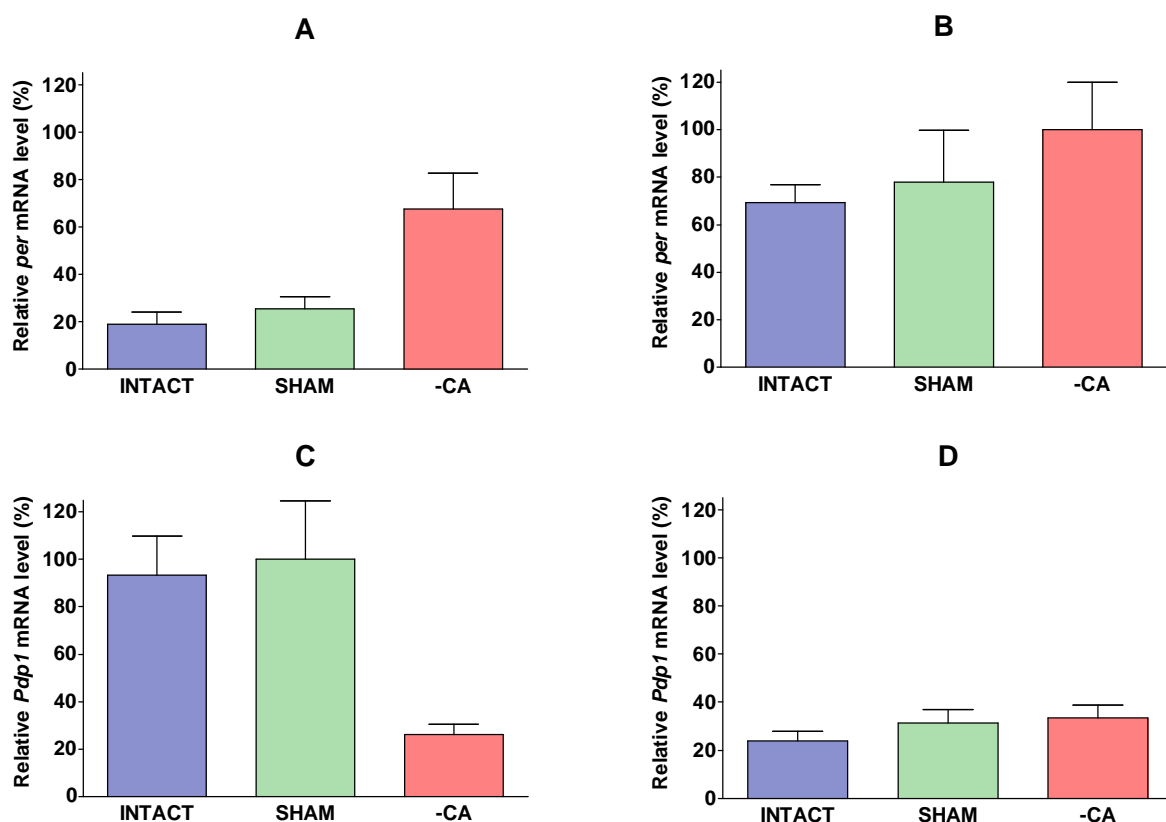
n=5 pro každý bod, hodnoty představují průměr ± SEM

Statistická analýza testem dvoucestná ANOVA ukázala vliv času na expresi genu *per* jako signifikantní ($P < 0.05$) a nesignifikantní na expresi genu *Pdp1*. Jako vysoce signifikantní vyšel vztah mezi fotoperiodou a expresí obou genů ($P < 0.0001$). Zhodnocení testem jednocestná ANOVA demonstrovalo, že jak v LD, tak SD, nejsou časové změny v expresi obou genů signifikantní.

Zhodnocení neukázalo žádné statisticky významné změny v hladinách *per/Pdp1* mRNA během 24 hodin. Fotoperioda měla však významný efekt ($P < 0.0001$) na hladiny obou, *per* i *Pdp1*, mRNA. Hladiny *per* mRNA (cca 2x) byly u diapauzních jedinců chovaných v podmínkách krátkého dne vyšší než u nediapauzních jedinců chovaných v dlouhém dnu. Opačné výsledky byly zaznamenány u genu *Pdp1*, kde byly hladiny *Pdp1* mRNA u ploštic chovaných v SD nižší (cca 2x) než u ploštic chovaných v LD. Skutečnost, že u jedinců chovaných v SD byla naměřena vyšší hladina *per* mRNA a nižší hladina *Pdp1*, znamená, že hladiny transkriptů těchto genů se u nediapauzních a diapauzních samic prokazatelně liší a nemohou být zkresleny vztahováním naměřených hodnot *per/Pdp1* mRNA k referenční RP49 mRNA.

4.1.2. Vliv juvenilního hormonu na expresi genů *per* a *Pdp1*

Výsledky experimentu popsaného v 4.1.1. vedly ke snaze zjistit vazbu mezi diapauzou, kde hraje hlavní roli endokrinní žláza *corpus allatum*, a expresí dvou genů cirkadiálních hodin v tukovém tělese. V experimentu byly opět použity samice divokého kmene (6-7 dní staré), chované od vajíček jak v podmínkách dlouhého dne, tak v podmínkách krátkého dne. Výše zmíněné ploštice bez jakéhokoli zásahu do těla tvořily kontrolní skupinu (INTACT). Ploštice, jimž byla vyjmuta žláza *corpus allatum*, tvořily sledovanou skupinu (-CA). Poslední skupina obsahovala ploštice, kterým byla proříznuta krční membrána (SHAM) za účelem vytvořit sekundární srovnávací skupinu, jejíž výsledky měly prokázat nebo vyloučit vliv zranění na expresi genů cirkadiálních hodin. Poškození krční membrány bylo provedeno proto, že skrze řez touto membránou se *corpus allatum* odstraňuje z těla ploštic.



Obr.3. Porovnání relativního množství *per* a *Pdp1* mRNA mezi sledovanými skupinami v podmínkách LD/SD

Grafy A, B: exprese *per* mRNA u sledovaných skupin chovaných v podmínkách SD (graf A) a LD (graf B)

Grafy C, D: exprese *Pdp1* mRNA u sledovaných skupin chovaných v podmínkách SD (graf C) a LD (graf D)

n= 7-9 pro každý sloupec, hodnoty představují průměr ± SEM

Statistická analýza provedená testem jednocestná ANOVA ukázala signifikantní efekt allatektomií na expresi genu *per* ($P < 0.05$) a genu *Pdp1* ($P < 0.01$) u samic chovaných v podmínkách LD. U skupin ploštic chovaných v podmínkách SD nemělo odstranění žlázy *corpus allatum* signifikantní vliv na expresi obou genů.

Výsledky pokusu potvrdily zjištění z předchozího experimentu (4.1.1.). Hladiny *per/Pdp1* mRNA se výrazně odlišují u diapauzních (chovaných v podmínkách SD) a nediapauzních (chovaných v podmínkách LD). Hladina *per* mRNA je vyšší u kontrolních ploštic chovaných v SD, hladina *Pdp1* mRNA je vyšší u ploštic chovaných v LD.

Grafy „A“ a „B“ ukazují hladiny *per* mRNA v podmínkách LD a SD. Allatektomované ploštice (skupina –CA) chované v podmínkách LD (graf „A“) mají hladinu *per* mRNA signifikantně vyšší ($P < 0.05$) než jsou hladiny *per* mRNA ploštic obou srovnávacích skupin chovaných v LD (INTACT, SHAM). Expese genu *per* odpovídá u těchto allatektomovaných ploštic chovaných v LD úrovni expese genu *per* naměřených u všech třech skupin chovaných v SD (graf „B“).

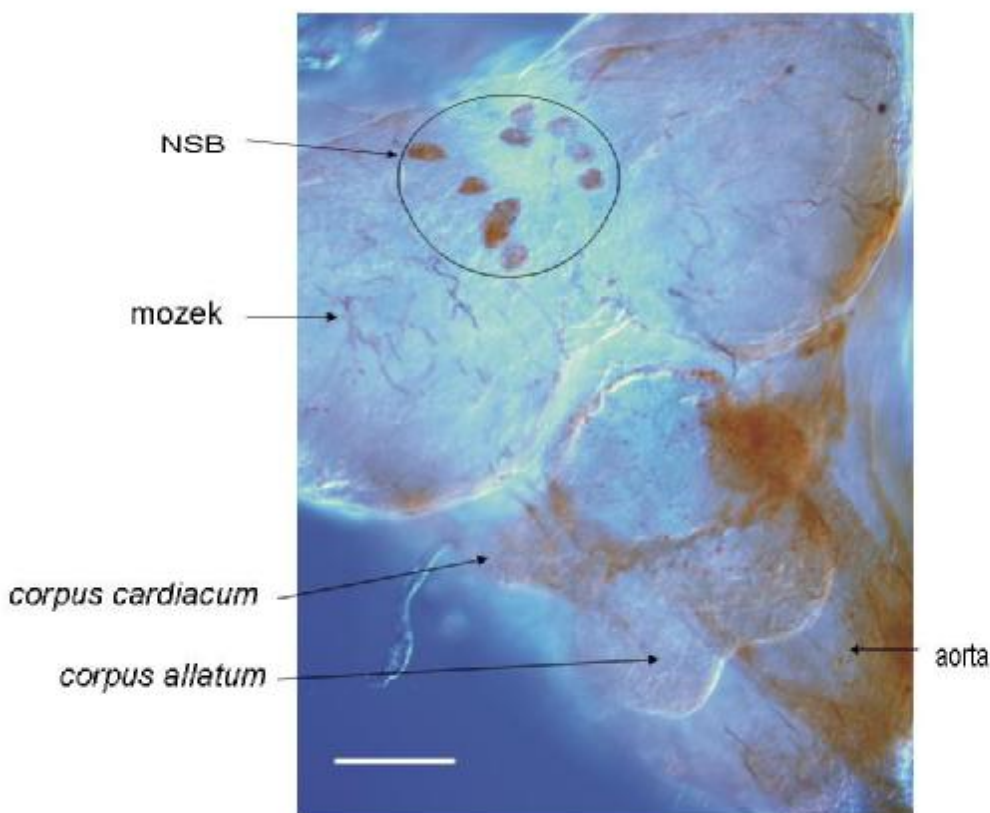
Grafy „C“ a „D“ ukazují hladiny *Pdp1* mRNA v podmínkách LD a SD. Allatektomované ploštice (skupina –CA) chované v podmínkách LD (graf „C“) mají hladiny *Pdp1* mRNA signifikantně nižší ($P < 0.01$) než jsou hladiny *Pdp1* mRNA ploštic obou srovnávacích skupin chovaných v LD (INTACT, SHAM). Expese genu *Pdp1* odpovídá u těchto allatektomovaných ploštic chovaných v LD opět úrovni expese genu *Pdp1* naměřených u všech třech skupin chovaných v SD (graf „D“).

Naměřené hladiny *per* a *Pdp1* mRNA referenčních skupin SHAM jsou srovnatelné se změřenými hladinami skupin INTACT. Z tohoto faktu vyplývá, že chirurgický zásah do krční membrány ploštic skupin SHAM nemá sám o sobě vliv na expresi genů cirkadiálních hodin *per* a *Pdp1*. Nejdůležitější výsledky vyplývající z tohoto pokusu jsou, že chirurgické odstranění endokrinní žlázy *corpus allatum* má u samic chovaných v podmínkách LD zřetelný vliv na expresi genů *per* a *Pdp1*, zatímco allatektomie u samic chovaných v podmínkách SD expresi sledovaných genů neovlivňuje. Zjištěné skutečnosti jasně dokazují, že juvenilní hormon, jakožto produkt žlázy *corpus allatum* má určující vliv na expresi genů cirkadiálních hodin *per* a *Pdp1*.

4.2. Stárnutí a diapauza

4.2.1. Detekce insulin-like peptidů v CNS *P. apterus* pomocí imunohistochemie

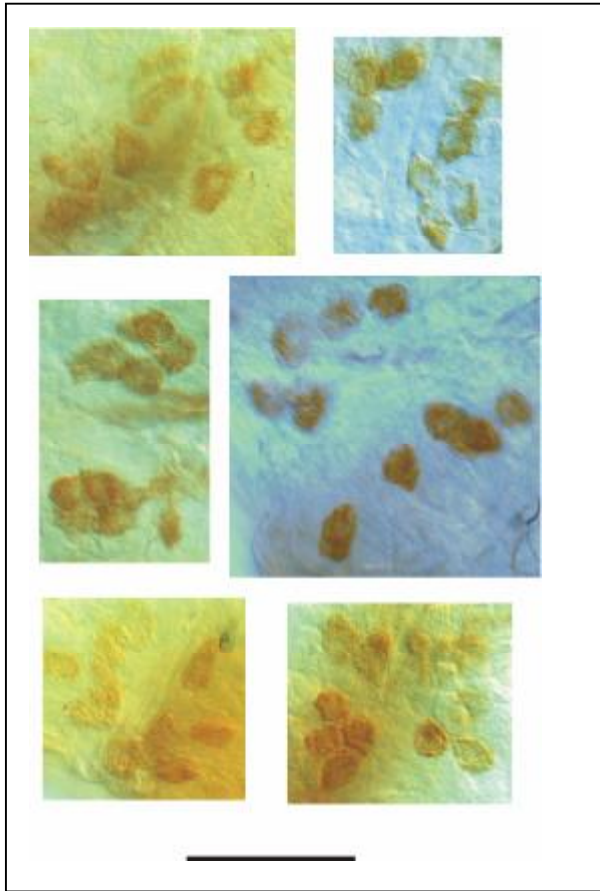
Protilátka proti bombyxinu pozitivně reagovala v neurosekrečních buňkách *pars intercerebralis* centrálního mozku a s materiálem v aortě (Obr.4). Celkem bylo vyhodnoceno 40 imunoendokrinních komplexů (mozek + *corpora cardiaca* + *corpus allatum*) s aortou. Několik vybraných vzorků ukazují obr. 5 a 6.



Obr.4. : Lokalizace insulin-like peptidů v CNS *P. apterus* (měřítko= 0,1mm)

NSB = neurosekreční buňky *pars intercerebralis*

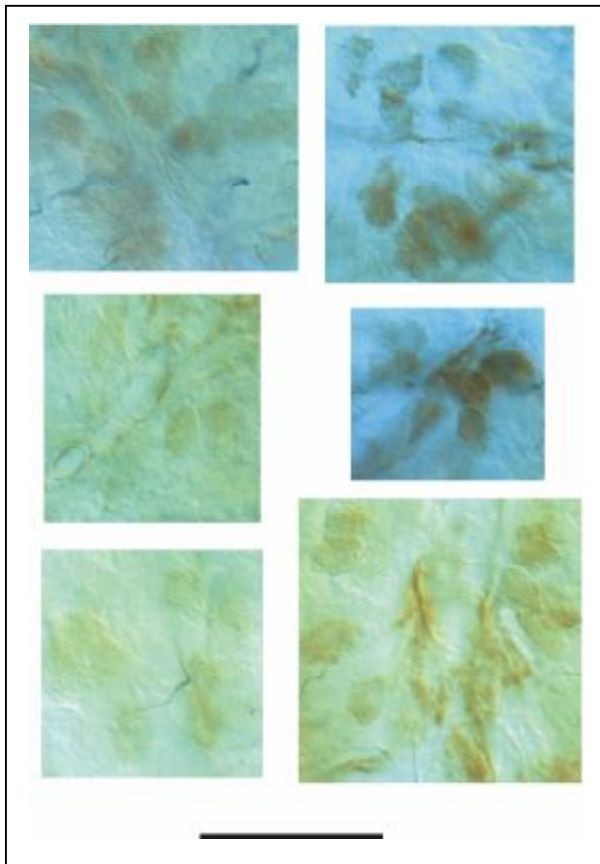
Na intenzitu zbarvení nemá vliv denní doba provedení pitvy (odpoledne/dopoledne). Více imunoreaktivních peptidů bylo obecně u starších ploštic, 1-2 týdny starých, ale intenzita a množství detekovaných peptidů v CNS byla variabilní u jedinců stejného stáří i v rámci jedné skupiny (diapauzní/nediapauzní). Intenzita zbarvení v neurosekrečních buňkách centrálního mozku se však obecně jevila silnější u diapauzních ploštic chovaných v podmínkách SD, než u nediapauzních ploštic chovaných v podmínkách LD (Obr.5).



A

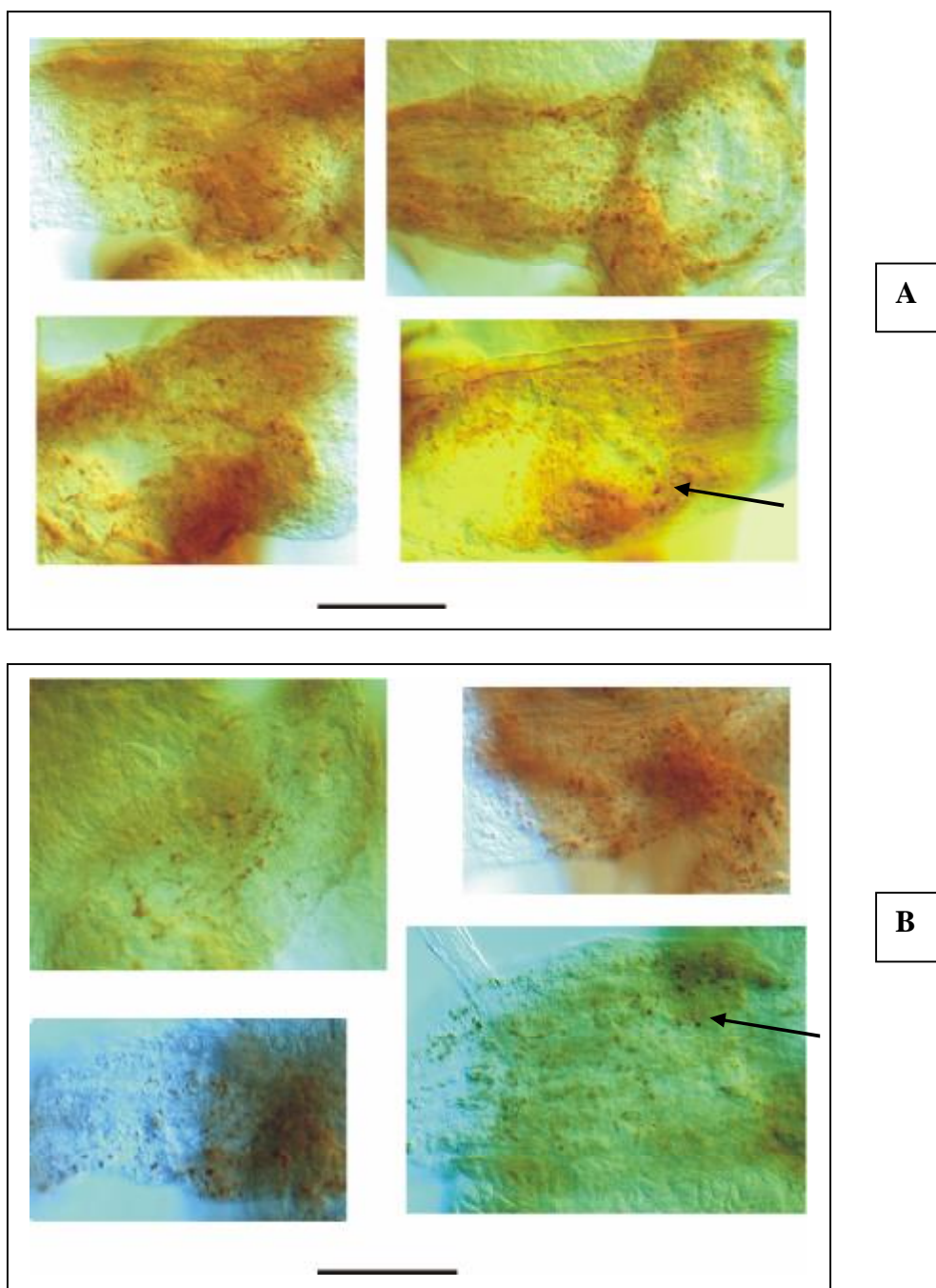
Obr.5. Peptidy reagující s protilátkou proti bombyxinu v buňkách *pars intercerebralis* (měřítko=0,1mm)

A – ploštice chované v podmínkách SD
 B – ploštice chované v podmínkách LD



B

Naproti tomu rozdíl v množství imunoreaktivních peptidů v aortě (tmavě zbarvené granule) nebyl mezi skupinami ploštice chovaných v podmínkách LD a SD tak zřejmý (Obr.6).



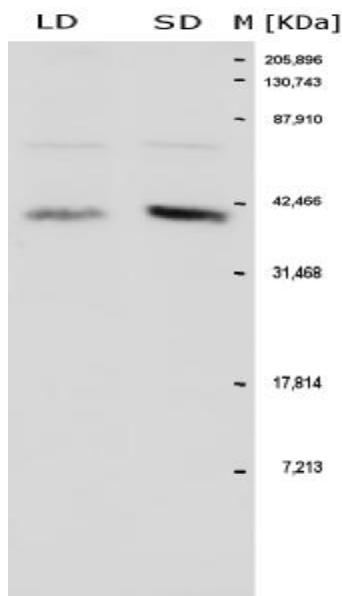
Obr.6. Peptidy reagující s protilátkou proti bombyxinu v aortě (měřítko = 0,1 mm)

A – ploštice chované v podmínkách SD

B – ploštice chované v podmínkách LD

4.2.2. Detekce insulin-like peptidů v CNS *P. apterus* pomocí metody Western blot

V tomto experimentu byly detekovány insulinu podobné peptidy v CNS (v komplexu mozek + suboesophageální ganglion + corpora cardiaca + corpus allatum) *P. apterus* pomocí protilátek proti bombyxinu a lidskému insulinu. Obr.7. ukazuje pozice všech peptidů, které byly detekovány protilátkou proti lidskému insulinu.



Obr.7. Detekce insulin-like peptidů v CNS metodou Western blot protilátkou proti lidskému insulinu

LD- směs 11 komplexů ze samic o stáří 1-3 týdny chovaných v podmínkách LD

SD- směs 11 komplexů ze samic o stáří 1-3 týdny chovaných v podmínkách SD

Protilátka reagovala u obou sledovaných skupin (diapauzních a nediapauzních samic) se dvěma typy peptidů. Pozice těchto peptidů odpovídala přibližně molekulové hmotnosti 75 kDa a 40 kDa. Množství peptidu o molekulové hmotnosti cca 75 kDa bylo stejné u skupin ploščic chovaných v podmínkách LD a SD, šlo zřejmě o nespecifickou vazbu protilátky. Toto množství bylo použito jako standard a normalizací k jeho množství bylo možné kvantifikovat množství peptidu o molekulové hmotnosti cca 40 kDa. Množství tohoto peptidu (cca 40 kDa) bylo 2x větší u skupiny chované v podmínkách SD, než u skupiny chované v podmínkách LD. Protilátka proti bombyxinu reagovala s peptidy o stejné molekulové hmotnosti jako protilátka proti insulinu, ale bohužel, i při různém ředění, velice slabě (není přiloženo).

5. DISKUSE

5.1. Exprese genů cirkadiálních hodin a diapauza

Výsledky této práce potvrdily domněnku, že rozdílné hladiny *period* mRNA v hlavách diapauzních a nediapauzních samic *P. apterus* (Hodková et al. 2003) jsou dány tukovým tělesem. Hladina transkriptů genu *per* v tukovém tělese byla, podobně jako v hlavách, vyšší u ploštic chovaných v podmínkách SD a nevykazovala zřetelný cirkadiální rytmus.

Skutečnost, že exprese sledovaných genů cirkadiálních hodin v periferním orgánu u *P. apterus* nejeví rytmus během dne, je v rozporu s většinou dosavadních výsledků získaných u jiných druhů hmyzu (Giebultowicz et al. 2001, Whitmore et al. 2000). Relativní hodnoty *per* a *Pdp1* mRNA jsou však velice variabilní a odlišují se i v rámci jedné skupiny ploštic chované ve stejných podmínkách a stanovené ve stejnou dobu. Je možné, že exprese sledovaných genů má přeci jen nějaký rytmus, s periodou kratší než 24 hodin. Tento ultradiální individuální rytmus by mohl odpovídat zjištěné variabilitě jedinců stejné skupiny, protože při periodě kratší než 24 hodin není způsob podle kterého by se hladina těchto genů v tukovém tělese různých jedinců mohla synchronizovat. Tato hypotéza se však experimentálně nedá prokázat.

U ploštice *P. apterus* nebyl však, narozdíl od jiných zástupců z řádu hmyzu (Saunders 2002), nalezen zjevný rytmus v expresi genů cirkadiálních hodin v průběhu dne ani v hlavách (Hodková et al. 2003), což nabízí otázku, jakou funkci tyto cirkadiální geny u *P. apterus* vůbec mají. Hypotéza, zda je exprese genu *per* u *P. apterus* důležitá v přenosu fotoperiodického signálu do endokrinní soustavy, nemůže být bohužel přímo testována, protože mutanti v genu *per* zatím nejsou u *P. apterus* k dispozici. Experiment s mutanty, necitlivými vůči fotoperiodě (Syrová et al. 2003), však naznačil, že sledované geny cirkadiálních hodin mají důležitou funkci ve výstupní dráze k diapauze/reprodukci.

Výsledky této práce dále demonstrují, že je exprese dvou genů cirkadiálních hodin v periferní tkáni u *P. apterus* řízena juvenilním hormonem. Aktivita endokrinní žlázy *corpus allatum* a vylučování juvenilního hormonu je zásadní faktor, kterým se od sebe odlišují diapauzní a nediapauzní ploštice *P. apterus* (Hodková 1976). Odstranění žlázy *corpus allatum* vedlo u samic chovaných v podmínkách LD, u kterých je za normálních okolností žláza *corpus allatum* aktivní, k výrazně odlišné expresi genů cirkadiálních hodin *per* a *Pdp1* v tukovém tělese, podobné expresi těchto genů u samic chovaných v podmínkách SD. V podmínkách SD, kde je aktivita žlázy *corpus allatum* inhibována fyziologicky, neměla allatektomie žádný vliv na expresi sledovaných genů.

Takovéto zjištění je jedinečné a překvapující, protože výsledky obdobných studií především u *Drosophila melanogaster* vedly k obecnému předpokladu, že se cirkadiální hodiny v periferních tkáních hmyzu nastavují sami prostřednictvím světla, nezávisle na CNS nebo endokrinní soustavě (Plautz et al. 1997, Giebultowicz et al. 2001).

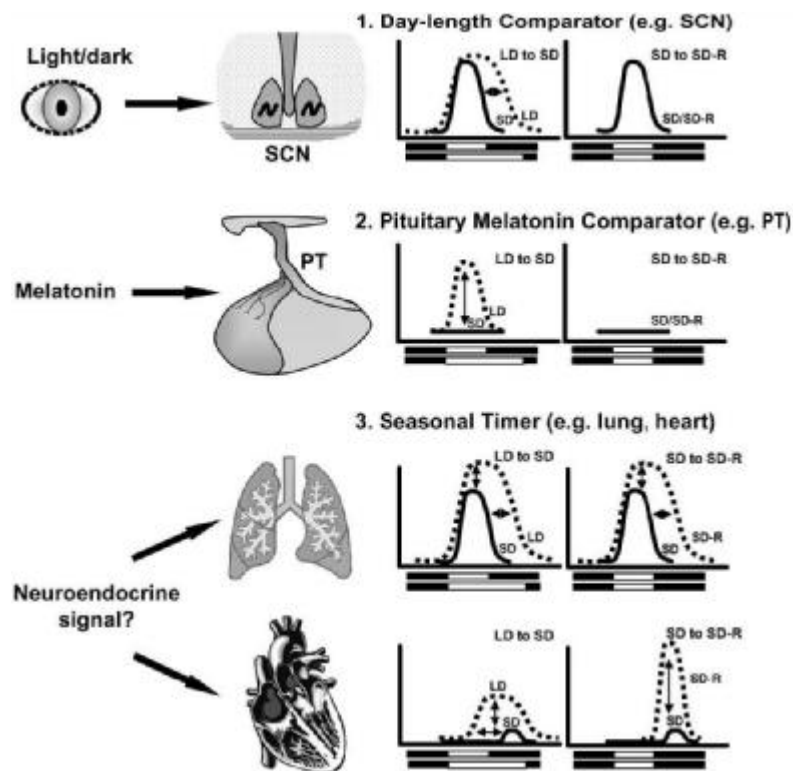
U savců se předpokládá, že hlavní oscilátor umístěný v suprachiasmatickém jádře hypothalamu (SCN) řídí cirkadiální hodiny v periferních tkáních. V tomto procesu synchronizace cirkadiálních hodin v periferních tkáních (nastavení fáze) má zřejmě významnou roli glukokortikoidní signální dráha, protože aplikace glukokortikoidů do periferních orgánů měla schopnost změnit fázi exprese

cirkadiálních genů (Balsalobre et al. 2000, Le Minh et al. 2001). Hypotéza, ve které by měl juvenilní hormon u *P. apterus* podobnou roli jako glukokortikoidy u savců, by byla ve své podstatě nesmyslná, protože v tukovém tělese *P. apterus* chybí signifikantní rytmy v expresi sledovaných genů cirkadiálních hodin během 24 hodin. Navíc se u *P. apterus* hladiny *per* a *Pdp1* mRNA v podmínkách LD a SD liší během celého dne.

Nedávná studie u savců ukázala, že ne vždy se musí geny cirkadiálních hodin v periferních tkáních chovat „hodinově“, tj. ztrácejí rytmus své exprese. Zjistilo se, že u myši dokáže odpověď na stres, prostřednictvím glukokortikoidní signální dráhy, vyvolat transkripci genu *Per1*, a to bez nastavení fáze cirkadiálních hodin na molekulární úrovni (Yamamoto et al. 2005). Podobné výsledky byly zaznamenány i u savců, ve varlatech myši, kde exprese určitých genů cirkadiálních hodin nejeví rytmus během dne a dokonce je nezávislá na synchronizaci hlavního oscilátoru v hypothalamu (Alvarez et al. 2003, Morse et al. 2003).

Analogicky, v odpovědi na fotoperiodu, by tedy mohl být juvenilní hormon zahrnut v ne-cirkadiální regulaci genů *per* a *Pdp1* v tukovém tělese u *P. apterus*. Skutečnost, že i u jiných druhů hmyzu bylo nalezeno zvláštní chování molekul účastnících se cirkadiální regulace, tuto myšlenku podporuje. Například ne-rytmická exprese *per* mRNA v průběhu 24 hodin ve folikulárních buňkách ovaríí dospělých samic *D. melanogaster* (Beaver et al. 2007). V experimentech byly pozorovány geneticky modifikované samice *D. melanogaster*, které postrádaly buď gen *per* nebo *tim*. Protein PER je zde primárně cytoplasmatický. Proteiny PER a TIM spolu interagují, ale nevstupují do jádra buňky. Jejich hladina v ovariu není ovlivňována světlem. Nedochozí tedy k degradaci proteinu TIM (prostřednictvím genu *cry*) a tím ani k seřizování (entrainment) podle vnějšího prostředí. Hladina proteinů PER a TIM není v ovariu ovlivněna ani prostřednictvím pozitivních elementů *clk* a *cycle*. Z tohoto plyne, že geny *per* a *tim* jsou v ovariu *D. melanogaster* regulovány jiným způsobem než u ostatních cirkadiálních oscilátorů. U těchto samic, postrádajících buď gen *per* nebo *tim*, byl pozorován signifikantně nižší počet potomstva v důsledku nižší rychlosti zrání vajíček, než u divokých samic (Beaver et al. 2007). Pozorovaná snížená plodnost tedy naznačuje, že v ovariu by mohl mít gen *period* jinou funkci, než jakou má v rámci cirkadiálních rytmů. Navíc možnost funkční všestrannosti alespoň frakce hodinových molekul byla již dříve diskutována (Hall 1996).

Zajímavá je modulace exprese *Per1* v periferních tkáních fotoperiodou u křečka syrského (Obr.1). U tohoto sezónního hlodavce je reprodukce a metabolismus aktivován dlouhými letními dny (LD) a inhibován krátkými dny v zimě (SD) (Goldman 2001). Po několika měsících v podmínkách SD se hlodavci stávají tzv. refraktorní k této fotoperiodě a fyziologie jejich těla se spontánně navrácí k fyziologii typické pro LD (Gwinner 1986). Mnohé fyziologické roční rytmy jsou u savců kontrolovány hlavním oscilátorem (SCN) regulovanou sekrecí melatoninu z hypofýzy, což poskytuje vnitřní endokrinní signál reprezentující fotoperiodu.



Obr.1. Expresse genu *Per1* v SCN, hypofýze, plicích a srdci u křečka syrského (převzato z Carr et al. 2003)

Expresse *Per1* během 24 hodin se vyznačuje v podmínkách SD rytmem s nízkou amplitudou a krátkým trváním, a naopak v LD rytmem s prodlouženou, vysokou amplitudou. U SD-refraktorních jedinců zůstávají rytmy v expresi genu *Per1* v SCN stejné jako u SD jedinců, což odráží spíše účinek fotoperiody, než fyziologii typickou pro podmínky LD. Naproti tomu v periferních tkáních, ledvinách a srdci, se rytmus v expresi genu *Per1* u SD-refraktorních jedinců navrací k vysoké amplitudě typické pro podmínky LD. Tyto výsledky naznačují, že se cirkadiánní oscilátory v periferních orgánech podílejí na fotoperiodickém měření času a že se v procesu synchronizace cirkadiánních oscilátorů v periferních tkáních účastní určité faktory, které nejsou řízeny pouze prostřednictvím SCN, jak se předpokládalo (Carr et al. 2003).

U allatektomovaných samic *P. apterus* chovaných v podmínkách LD se hladiny *per* a *Pdp1* mRNA navrací také k hladinám těchto transkriptů naměřeným v podmínkách SD. Hladiny těchto transkriptů tedy spíše odráží hormonální prostředí typické pro podmínky SD než okolní fotoperiodu. Hypoteticky by odlišné amplitudy v rytmu genů cirkadiánních hodin u křečků a odlišné základní hladiny cirkadiánních molekul u *P. apterus* mohly mít stejné role, zejména v hormonální regulaci tkáňové fyziologie.

5.2. Insulin-like peptidy a diapauza

Výsledky této části práce jsou spíše předběžné a k objasnění vztahu mezi množstvím insulinu podobných peptidů a diapauzou/reprodukcí bude třeba provést podrobnější studium. Nicméně se podařilo detekovat peptidy reagující s protilátkou proti bombyxinu v neurosekrečních buňkách CNS *P. apterus*, což odpovídá hlavní lokalizaci insulin-like peptidů i u jiných druhů hmyzu (Cao a Brown 2001, Nässel 2002, Rulifson et al. 2002). Celkové množství těchto s bombyxinem reagujících peptidů v buňkách *pars intercerebralis* je větší u diapauzních, tedy déle žijících, než reprodukčně aktivních samic. Pokud má redukční zásah do insulinové signální dráhy prodlužující efekt na délku života, což potvrzují mnohé výsledky na modelových organismech, např. u nematod (Wolkow et al. 2000, Gerisch et al. 2001, Jia et al. 2002), hmyzu (Tatar et al. 2001, Clancy et al. 2001), i savců (Bluher et al. 2003), mohou se zdát tyto výsledky zarážející. Očekávalo by se, že množství insulin-like peptidů bude u déle-žijících diapauzních ploštic menší než u reprodukčně aktivních. Je však možné, že větší množství peptidů reagujících s bombyxinem u diapauzních ploštic odpovídá pouze většímu hromadění v neurosekrečních buňkách a nekoresponduje s jejich vyplavováním do těla. Naopak menší množství detekovaných peptidů u reprodukčně aktivních ploštic chovaných v podmínkách LD může odpovídat silnějšímu vyplavování těchto peptidů do tkání.

V metodě Western blot reagovala protilátka proti bombyxinu bohužel velice slabě, ale osvědčila se protilátka proti lidskému insulinu. V CNS *P. apterus* se touto protilátkou podařilo detekovat peptid o molekulové hmotnosti cca 40 kDa. Množství tohoto peptidu bylo dvakrát větší u diapauzních ploštic, než reprodukčně aktivních, což vykazuje podobnost s výsledky získanými s protilátkou proti bombyxinu u imunohistochemie. Detekovaná molekula má však příliš velkou molekulovou hmotnost, než aby odpovídala nízkomolekulární molekule bombyxinu o 3-5 kDa (Vafopoulou a Steel 2002). Je možné, že se detekce těchto nízkomolekulárních peptidů nepodařila kvůli malému počtu mozků v analyzovaném vzorku. Součástí dalšího studia by tedy mělo být opakování tohoto experimentu s vyšší koncentrací mozků v extraktu.

Protilátka proti bombyxinu dále pozitivně reagovala s peptidy v neurohemálním orgánu, aortě. Z dosavadních výsledků není patrný rozdíl v jejich množství mezi diapauzními a reprodukčně aktivními plošticemi *P. apterus*. Vyplavování bombyxinu z mozku do hemolymfy je popsáno u bource *Bombyx mori* (Mizoguchi et al. 1987, Mizoguchi et al. 1990). Jeho uvolňování je u *B. mori* stimulováno přísunem potravy a inhibováno hladověním (Masumura et al. 1999). U *P. apterus* se však menší množství těchto peptidů v aortě u diapauzních, nepřijímajících potravu, tímto pokusem prokázat nepodařilo.

6. ZÁVĚR

- Exprese genů cirkadiálních hodin *period* a *PairDomainProtein1* v tukové tkáni plošnice *P. apterus* nevykazuje rytmus během 24 hodin.
- Exprese genů *period* a *PairDomainProtein1* v tukovém tělese je u plošnice *P. apterus* řízena prostřednictvím juvenilního hormonu.
- Množství insulinu podobných peptidů v CNS *P. apterus* je větší u diapauzních než reprodukčně aktivních ploštic.

7. LITERATURA

- Allada, R., White, N.E., So, W.V., Hall, J.C. and Rosbash, M. (1998) A mutant *Drosophila* homolog of mammalian *Clock* disrupts circadian rhythms and transcription of *period* and *timeless*. *Cell* 93: 791-804
- Alvarez, J.D., Chen, D., Storer, E., Sehgal, A. (2003) Non-cyclic and developmental stage-specific expression of circadian clock proteins during murine spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 69: 81-91
- Apfeld, J., and Kenyon, C. (1998) Cell nonautonomy of *C. elegans* *daf-2* function in the regulation of diapause and life span. *Cell* 95: 199-210
- Balsalobre, A., Brown, S.A., Marcacci, F.T., Tronche, F., Kelledonk, C., Reichardt, H.M., Schütz, G., and Schibler, U. (2000) Ressetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science* 289: 2344-2347
- Barnes, A., I. and Partridge, L. (2003) Costing reproduction. *Anim. Behav.* 66: 199-204
- Beaver, L.M., Rush, B.L., Gvakharia, B.O. and Giebultowitz, J.M. (2007) Noncircadian regulation and function of clock genes *period* and *timeless* in oogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Rhythms* 18: 463-472
- Blüher, M., Kahn, B., B., Kahn, C., R. (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299: 572-574
- Braeckman, B.P., Houthoofd, K., Vanfleteren, J.R. (2001) Insulin-like signaling, metabolism, stress resistance and aging in *Caenorhabditis elegans*. *Mechanisms of aging and development* 122:673-93
- Cao, C. and Brown, M.R. (2001) Localization of an insulin-like peptide in brains of two flies. *Cell and tissue research* 304:317-21
- Carr, A.-J.F., Johnston, J.D., Semikhodski, A.G., Nolan, T., Cagampang, F.R.A., Stirland, J.A. and Loudon, S.I. (2003) Photoperiod differentially regulates circadian oscillators in central and peripheral tissues of the Syrian hamster. *Curr. Biol.* 13: 1543-1548
- Carrard, G., Bulteau, A.L., Petropoulos, I., Friquet, B. (2002) Impairment of proteasome structure and function in aging. *The international journal of biochemistry and cell biology* 34: 1461-74
- Clancy, D.J., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leivers, S.J., and Partridge, L. (2001) Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 292: 104-106
- Cyran, S.A., Buchsbaum, A.M., Reddy, K.L., Lin, M., Glossop, N.R.J., Hardin, P.E., Young, M.W., Storti, R.V., Blau, J. (2003) *vriille*, *Pdp1* and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* Circadian Clock. *Cell* 112: 329-341
- Denlinger, D., L. (2002) Regulation of diapause. *Annu. Rev. Entomol.* 47: 93-122
- Dunlap, J., C. (1999) Molecular bases for circadian clocks. *Cell* 96: 271-290
- Flatt, T., Tu, M.-P., Tatar, M. (2005) Hormonal pleiotropy and the regulation of *Drosophila* development and life history. *BioEssays* 27: 999-1010
- Fontana, L., Meyer, T.E., Klein, S., Holloszy, J.O. (2004) Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 6659-6663
- Gekasis, N., Saez, L., Delahaye-Brown, A.M., Myers, M.P., Sehgal, A., Young, M.W. and Weitz, C.J. (1995) Isolation of *timeless* by PER protein interaction:

- defective interaction between *timeless* protein and long-period mutant *per*^L. *Science* 270: 811-815.
- Gems, D., Sutton, A.J., Sundermeyer, M.L., Albert, P.S., King, K.V., Edgley, M.I., Larsen, P.L., Riddle, D.L. (1998) Two pleiotropic classes of *daf-2* mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 150: 129-155
- Gerisch, B., Weitzel, C., Kober-Eisermann, C., Rottiers, V., Antebi, A. (2001) A hormonal signaling pathway influencing *C. elegans* metabolism, reproductive development, and life span. *Developmental Cell* 6: 841-851
- Giannakou, M.E., Goss, M., Junger, M.A., Hafen, E., Leivers, S.J., Partridge, L. (2004) Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science* 305: 361
- Giebultowicz, J.M., Ivanchenko, M. and Vollintine, T. (2001) Organization of the insect circadian system: spatial and developmental expression of clock genes in peripheral tissues of *Drosophila melanogaster*. In: *Insect Timing: Circadian Rhythmicity to Seasonality*, Denlinger, D., L., Giebultowicz, J. and Saunders, D., S. (Eds.), pp. 31-42, Elsevier Science B.V., Amsterdam
- Goldman, B.D. (2001) Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *Journal of Biological Rhythms* 16: 283-301
- Goto, S.G., Han, B., Denlinger, D.L. (2006) A nondiapausing variant of the flesh fly, *Sarcophaga bullata*, that shows arrhythmic adult eclosion and elevated expression of two circadian clock genes, *period* and *timeless*. *Journal of Insects Physiology*. 52: 1213-1218
- Grube, K. and Burkle, A. (1992) Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 11759-63
- Gwinner, E. (1986) *Circannual Rhythms*. In: Springer-Verlag, Berlin
- Hall, J.C. (1995) Tripping along the trail to the molecular mechanisms of biological clocks. *Trends in neurosciences* 18(5): 230-40
- Hall, J.C. (1996) Are cycling gene products as internal zeitgebers no longer zeitgeist of chronobiology? *Neuron* 17: 799-802
- Hardin, P.E. (1994) Analysis of *period* mRNA cycling in *Drosophila* head and body tissues indicates that body oscillators behave differently from head oscillators. *Mol. Cell. Biol.* 14: 7211-7218
- Hardin, P.E., Hall, J.C., and Rosbach, M. (1990) Feedback of the *Drosophila period* gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* 343: 536-540.
- Hastings, M. and Maywood, E.S. (2000) Circadian clocks in the mammalian brain. *Bioessays* 22: 23-31
- Hekimi, S., Burquess, J., Bussiere, F., Menq, Y., Benard, C. (2001) Genetics of lifespan in *C. elegans*: molecular diversity, physiological complexity, mechanistic simplicity. *Trends in genetics* 17(12):712-8
- Herman, W.S. and Tatar, M. (2001) Juvenile hormone regulation of longevity in the migratory monarch butterfly. *Proc. Roy. Soc. London, B- Biol. Sci* 268: 2509-14
- Hodek, I. and Hodková, M. (1988) Multiple role of temperature during insect diapause – a review. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 49: 153-165
- Hodková, M. (1976) nervous inhibition of corpora allata by photoperiod in *Pyrrhocoris apterus*. *Nature* 263: 521-523

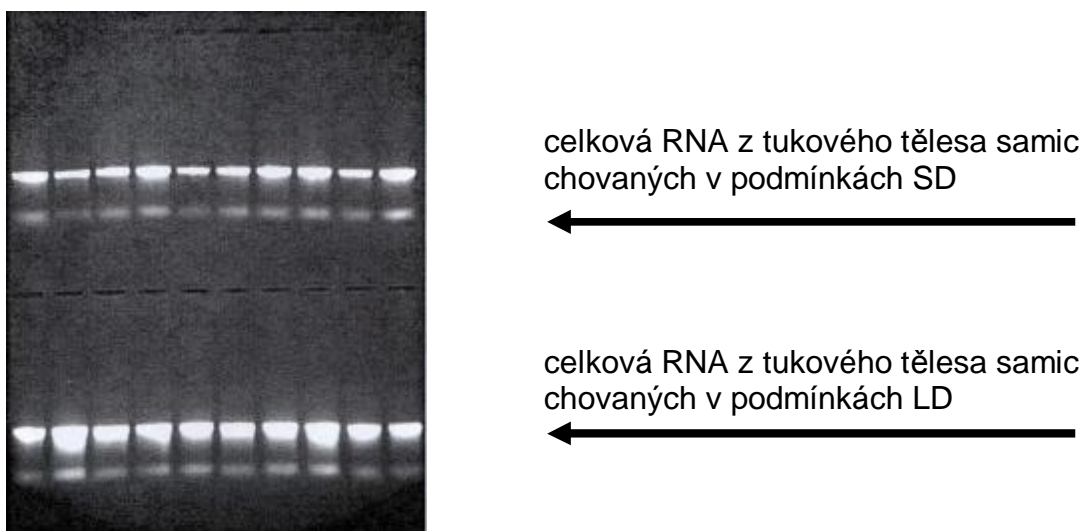
- Hodková, M. (1994) Photoperiodic regulation of mating behaviour in the linden bug, *Pyrrhocoris apterus* is mediated by a brain inhibitory factor. *Experientia* 50: 742-744
- Hodková, M., Syrová, Z., Doležel, D., Šauman, I. (2003) *Period* gene expression in relation to seasonality and circadian rhythms in a heteropteran insect, *Pyrrhocoris apterus*. *European Journal of Entomology* 100: 267-273
- Houthoofd, K., Braeckman, B.P., Johnson, T.E., Vanfleteren, J.R. (2003) Life extension via dietary restriction is independent of the Ins/IGF-1 signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Exp. Gerontol.* 38: 947-954
- Hsin, H. and Kenyon, C. (1999) Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *C. elegans*. *Nature* 399: 562-566
- Hunter-Ensor, M., Ousley, A., and Sehgal, A. (1996) Regulation of the *Drosophila* protein *timeless* suggests a mechanism for resetting the circadian clock by light. *Cell* 84: 677-685
- Chapman, T. and Patridge, L. (1996) Female fitness in *Drosophila melanogaster*: an interaction between the effect of nutrition and of encounter rate with males. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 263: 755-759
- Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K., Hafen, E. (2002) Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Current biology* 12(15):1293-300
- Iwasaki, K. and Thomas, J., H. (1997) Genetics in rhythm. *Trends in genetics* 13(3):111-5
- Jia, K.L., Albert, P.S., Riddle, D.L. (2002) DAF-9, a cytochrome P450 regulating *C. elegans* larval development and adult longevity. *Development* 129: 221-231
- Jiang, J.C., Jaruqa, E., Repnevskaya, M.V., Jazwinski, S.M. (2000) An intervention resembling caloric restriction prolongs life span and retards aging in yeast. *FASEB J.* 14(14):2135-7
- Junger, M.A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J.D., Vegh, M., Radimerski, T., Greenberg, M.E., Hafen, E. (2003) The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *Journal of Biology* 2: 20
- Kenyon, C., Chang, J., Gensch, E., Rudner, A., and Tabtiang, R. (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366: 461-464
- Kloss, B., Price, J.L., Saez, L., Blau, J., Rothenfluh, A. and Young, M.W. (1998) The *Drosophila* clock gene *double-time* encodes a protein closely related to human kinase Iε. *Cell* 94: 97-107.
- Kondo, T. and Ishiura, M. (2000) The circadian clock of cyanobacteria. *Bioessays* 22: 10-15
- Konopka, R.J. and Benzer, S. (1971) Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of National Academy of Sciences, USA* 68: 2112-2116.
- Košťál, V. and Shimada, K. (2001) Malfunction of circadian clock in the non-photoperiodic-diapause mutants of the drosophilid fly, *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology* 47: 1269-1274
- Lane, M.A., Mattison, J.A., Roth, G.S., Brant, L.J., Ingram, D.K. (2004) Effect of long-term diet restriction on aging and longevity in primates remain uncertain. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 59: 405-407
- Lankinen, P. and Riihimaa, A.J. (1992) Weak circadian eclosion rhythmicity in *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae). *J Insect Physiol* 38: 803-811

- Le Minh, N., Damiola, F., Tronche, F., Schutz, G., Schibler, U. (2001) Glucocorticoids hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators. *EMBO J.* 20: 7128-7136
- Magwera, T., Chapman, T., Partridge, L. (2004) Sex differences in the effect of dietary restriction on life span and mortality rates in female and male *Drosophila melanogaster*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59(1):3-9
- Masumura, M., Satake, S.I., Saegusa, H., Mizoguchi, A. (1999) Glucose stimulates the release of bombyxin, an Insulin-Related peptide of the Silkworm *Bombyx mori*. *General and Comparative Endocrinology* 118: 393-399
- McWatters, H., Dunlap, J.C. and Millar, A.J. (1999) Circadian biology: clocks for the real world. *Curr. Biol.* 9: 633-808
- Mizoguchi, A., Hatta, H., Sato, S., Nagasawa, H., Suzuki, A., and Ishizaki, H. (1990) Developmental change of bombyxin content in the brain of the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Insects Physiology* 36: 655-664
- Mizoguchi, A., Ishizaki, H., Nagasawa, H., Kataoka, H., Isogai, A., Tamura, S., Suzuki, A., Fujino, M., and Kitada, C. (1987) A monoclonal antibody against a synthetic fragment of bombyxin (4K-prothoracicotropic hormone) from the silkworm, *Bombyx mori*: Characterization and immunohistochemistry. *Mol. Cell. Endocrinol.* 51: 227-235
- Morse, D., Cermakian, N., Brancorsini, S., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P. (2003) No circadian rhythms in testis: *Period1* expression is clock independent and developmentally regulated in the mouse. *Mol. Endocrinol.* 17: 141-151
- Muiras, M.-L., Miller, M., Schachter, F., Burele, A. (1998) Increased poly(ADP-ribose) polymerase activity in lymphoblastoid cell lines from centenarians. *J. Mol. Med.* 76: 346-354
- Naidoo, N., Song, W., Hunter-Ensor, M. and Sehgal, A. (1999) A role for the proteasome in the light response of *timeless* clock protein. *Science* 285: 1737-1741
- Nässel, D.R. (2002) Neuropeptides in the nervous system of *Drosophila* and other insects: multiple roles as neuromodulators and neurohormones. *Progress in Neurobiology* 68: 1-84
- Pavelka, J., Shimada, K. and Košťál, V. (2003) Timeless: A link between fly's circadian and photoperiodic clocks? *European Journal of Entomology* 100
- Pener, M.P., Girardie, A., Joly, P. (1972) Neurosecretory and corpus allatum controlled effects on mating behavior and color change in adult *Locusta migratoria migratorioides* males. *General and Comparative endocrinology* 19: 494-508
- Plautz, J.D., Kaneko, M., Hall, J.C. and Kay, S.A. (1997) Independent photoreceptive circadian clocks throughout *Drosophila*. *Science* 278: 1632-1635
- Reppert, S.M., Tsai, T., Roca, A.L., Šauman, I. (1998) Cloning of a structural and functional homolog of the circadian clock gene period from the giant silkworm *antheraea pernyi*. *Neuron* 13: 1167-1176
- Riehle, M.A. and Brown, M.R. (1999) Insulin stimulates ecdysteroid production through a conserved signaling cascade in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 855
- Rulifson, E.J., Kim, S.K., Nusse, R. (2002) Ablation of insulin-producing neurons in flies: Growth and diabetic phenotypes. *Science* 296: 1118-1120

- Rutila, J.E., Suri, V., Le, M., So, W.V., Rosbash, M., and Hall, J.C. (1998) CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila period* and *timeless*. *Cell* 93: 805-814.
- Saunders, D.S. (2002) *Insect Clocks*, third ed. Elsevier, Amsterdam
- Saunders, D.S. (1990) The circadian basis of ovarian diapause regulation in *Drosophila melanogaster*: is the period gene causally involved in photoperiodic time measurement? *Journal of Biological Rhythms* 5: 315-331
- Sehgal, A., Price, J.L., Man, B. and Young, M.W. (1994) Loss of circadian behavioral rhythms and *per* mRNA oscillations in the *Drosophila* mutant *timeless*. *Science* 263: 1603-1609
- Sehgal, A., Rothenfluh-Hilfiker, A., Hunter-Ensor, M., Chen, Y., Myers, M.P., and Young, M.W. (1995) Rhythmic expression of *timeless*: a basis for promoting circadian cycles in *period* gene autoregulation. *Science* 270: 808-810.
- Simon, A.F., Shih, C., Mack, A., Benzer, S. (2003) Steroid control of longevity in *Drosophila melanogaster*. *Science* 299: 1407-1410
- Sláma, K. (1964) Hormonal control of respiratory metabolism during growth reproduction, and diapause in female adults of *Pyrrhocoris apterus* L. (Hemiptera). *Journal of Insect Physiology* 41: 793-800
- Socha, R., Šula, J., Kodrík, D., Gelbič, I. (1991) Hormonal control of vitellogenin synthesis in *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Journal of Insect Physiology* 37: 805-816
- Stanewsky, R., Kaneko, M., Emery, P., Beretta, B., Wagner-Smith, K., Kay, S.A., Rosbach, M. and Hall, J., C. (2002) The *cry^b* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95: 681-692
- Suri, V., Qian, Z., Hall, J.C., and Rosbash, M. (1998) Evidence that the TIM light response is relevant to light-induced phase shifts in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 21: 225-234.
- Syrová, Z., Doležel, D., Šauman, I., Hodková, M. (2003) Photoperiodic regulation of diapause in linden bugs: are *period* and *clock* genes involved? *Cellular and Molecular Life Sciences* 60: 2510-2515
- Šauman, I. and Sehnal, F. (1997) Immunohistochemistry of the products of male accessory gland in several hemimetabolous insects and the control of their secretion in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *European Journal of Entomology* 94: 349-360
- Šauman, I. and Reppert, S.M. (1996) Circadian clock neurons in the silkworm *Antheraea pernyi*: Novel mechanism of *period* protein regulation. *Neuron* 17: 889-900
- Šula, J., Kodrík, D., Socha, R. (1995) Hexameric haemolymph protein related to adult diapause in the red firebug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Journal of Insect Physiology* 41: 793-800
- Tatar, M. and Yin, C.-M. (2001) Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Experimental Gerontology* 36: 723-738
- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M., P., Yin, C., M., and Garofalo, R., S. (2001) A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 292: 107-110
- Tu, M., P. and Tatar, M. (2003) Juvenile diet restriction and the aging and reproduction of adult *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* 2: 327-333
- Tu, M., P., Yin, C.M., Tatar, M. (2002) Impaired ovarian ecdysone synthesis of *Drosophila melanogaster* insulin receptor mutants. *Aging Cell* 1: 158-160

- Vafoupoulou, X. and Steel, C.G.H. (2002) Prothoracicotropic hormone of *Rhodnius prolixus*: partial characterization and rhythmic release of neuropeptides related to Bombyx PTTH and bombyxin. *Invertebrate Reproduction and Development* 42: 111-120
- von Zglinicki, T. (2002) Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 27: 339-344
- Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482-1488
- Weindruch, R. and Walford, R.L. (1988) *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction*. Springfield, Illinois: Thomas
- Whitmore, D., Cermakian, N., Crosio, C., Foulkes, N.S., Pando, M.P., Travnickova, Z., Sassone-Corsi, P. (2000) A clockwork organ. *Biological Chemistry* 381: 793-800
- Wolkow, C., A., Komára, K.D., Lee, M.S., Ruvkun, G. (2000) Regulation of *C. elegans* life-span by insulinlike signaling in the nervous system. *Science* 290: 147-150
- Yamamoto, T., Nakahata, Y., Tanaka, M., Yoshida, M., Soma, H., Shinohara, K., Yasuda, A., Mamino, T. and Takumi, T. (2005) Acute physical stress elevates mouse *Period1* mRNA expression in mouse peripheral tissues via glucocorticoid-responsive element. *J. Biol. Chem.* 280: 42036-42043

8. PŘÍLOHA



Obr.1. Elektroforetogram jednotlivých celkových RNA

Pomocí elektroforézy byla zkontrolována kvalita RNA. K syntéze cDNA jsme obvykle použili 4 µl celkové RNA (pokud bylo z tukového tělesa vyizolováno méně RNA, k syntéze cDNA se použilo více než uvedené 4 µl celkové RNA).

Sekvence primeru		
gen	forward	reverse
<i>per</i>	5'ACAGCTAGTGGTGGTGAAGAGG	5'AAAAGTTGTTTCAGTAAGAGCAGTAG
<i>Pdp1</i>	5'CTTAAGTTAGGGGCAGTAG	5'TCTTCATCAGAAAAGGCTCTTG
RP49	5'CCGATATGTAAAAGTGGAGG^AGAAAC	5'GGAGCATGTGCCTGGTCTTTT

^ ...pozice intronu

Tab.1. Primery genů *period*, *Pair Domain Proteinu 1* a *ribozomálního proteinu 49* pro plošnici *P. apterus*

Primery byly navrženy tak, aby fungovaly specificky na cDNA, ale neamplifikovaly produkt z genomické DNA. V případě *RP49* toho bylo docíleno navržením jednoho primeru tak, že překrýval hranici dvou exonů (a tudíž nasedal jen na sestřižený templát, nikoli na genomickou DNA). U *pdp1* a *per* byly primery navrženy tak, že genomický produkt obsahoval též introny (zhruba 1000 bp velké) – při námi užitých podmínkách takto dlouhý produkt vůbec nemohl vzniknout a amplifikoval se pouze cDNA specifický úsek (cca 200 bp) (Doležel unpubl, Doležel et al. 2007).