

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

České Budějovice 2010



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Fotoperiodismus jako ekologická adaptace a
metody jeho studia

Autor: Olga Pecková

Vedoucí práce: David Doležel, Mgr. Ph.D.

PECKOVÁ O., 2010: FOTOPERIODISMUS JAKO EKOLOGICKÁ ADAPTACE A METODY JEHO STUDIA [PHOTOPERIODISM LIKE AN ECOLOGICAL ADAPTATION AND METHODS OF ITS STUDY, Bc. THESIS, IN CZECH] 22p., FACULTY OF SCIENCES, THE UNIVERSITY OF SOUTH BOHEMIA, ČESKÉ BUDĚJOVICE, CZECH REPUBLIC.

Anotace : Tento práce představuje návrh grantové žádosti, která se bude zabývat testováním použitelnosti metod pro studium fotoperiodických jevů u ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*).

Annotation : This work perform concept of grant application, its aim is testing of methods for studying and gaining more information on photoperiodic phenomenons in *Pyrrhocoris apterus*.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 30.4.2010

.....

Olga Pecková

PODĚKOVÁNÍ:

Tímto bych chtěla poděkovat především svému školiteli Davidu Doleželovi, Mgr. PhD. za umožnění realizace této práce a její vedení. Děkuji také za jeho vstřícnost, trpělivost a věnovaný čas. Dále děkuji Adamu Bajgarovi, Mgr. a paní Janě Mikešové za spolupráci, pomoc a seznámení s problematikou týkající se experimentů. Závěrečné poděkování za celkovou podporu patří mé rodině.

Abstrakt

Hmyz a ostatní druhy živočichů vyvinuly řadu mechanismů, které jim umožňují vyrovnat se s biotickými i abiotickými vlivy vnějšího prostředí. Přestože každý organismus tyto mechanismy využívá jiným způsobem, u všech živočichů vznikají za stejným účelem. Živé organismy jsou často schopny předpovídat změny okolního prostředí a přizpůsobují se jim prostřednictvím změn v chování a fyziologii.

Tyto mechanismy využívané k vypořádání se s denními a sezónními výkyvy prostředí zaujaly fyziology a vědce zabývající se chováním živočichů již během druhé poloviny 20. století, kdy bylo objasněno množství a různorodost fenoménů týkající se adaptace hmyzu zejména na denní (cirkadiánní) cykly. Vědci tak poukázali na to, že studium těchto procesů by mohlo vést k základnímu porozumění mnohým oblastem hmyzí fyziologie, ekologie a chování.

V posledních desetiletích byly odhaleny klíčové hodinové geny a molekulární mechanismy fungování cirkadiánních rytmů u modelových organismů. Základní a specializované buněčné funkce jsou regulovány prostřednictvím rozmanitých dějů na molekulární úrovni. Transkripty a proteinové produkty hodinových genů tvoří pozitivní a negativní zpětnovazebné smyčky, které jsou podstatou rytmicity. Smyčky tvořené na různých úrovních spolu s dalšími komponenty vytváří strukturu, která je schopná interagovat s ostatními regulátory těchto drah.

Zatímco podstata fungování cirkadiánních rytmů je již známá a prostudovaná na molekulární a buněčné úrovni, o fotoperiodických (sezónních) hodinách živočichů toho víme podstatně méně. Je to zejména proto, že obvyklé modelové organismy používané v molekulární biologii a genetice (myš, háďátka, octomilka) nevykazují přijatelný fotoperiodický fenotyp. Naším záměrem je tedy použít ruměnici pospolnou (*Pyrrhocoris apterus*), která vykazuje solidní fotoperiodický fenotyp a na ni aplikovat molekulární metody.

Tato práce popisuje, jakým způsobem použít metody reverzní genetiky ke studiu fotoperiodických hodin a navrhuje konkrétní experimenty k testování funkce vybraných genů.

Abstract

The insect and other species of animals and plants developed a lot of different mechanisms how face up to the conditions of environment.

The animals use these mechanisms in different ways, but their origin is for the same effect. Due to these abilities they are able to predict varied changes of environment and that's why they can cope with their behavior and physiology with various changes in the different part of world. These ways of behavior were studied in the second half of 20th century when the scientists cleared up lots of phenomenons of adaptation of insect to daily (circadian) cycles.

Nowadays there were explained the mechanisms of the clock genes and molecular pathways of circadian rhythms of the model organisms. Basic and specialized cell functions are regulated by the processes at the molecular level. The transcripts and protein products of clock genes create positive and negative feedbacks, which are the principle of rhythmicity. Loops with other components compose the structure and it can interact with other regulators of these pathways.

While the molecular basis of circadian clocks is understood with great detail, only a little is known about molecular mechanisms underpinning photoperiodic (seasonal) clocks in animals. The main reason for this gap is the absence of suitable photoperiodic phenotype in the usual genetic model organisms (*Drosophila*, mouse, *C. elegans*). Therefore we selected organism with robust photoperiodic phenotype, the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. We propose to introduce molecular genetic techniques into this organism to elucidate basic principles underpinning photoperiodic clock. This study discuss advantages of available reverse genetic techniques and propose specific experiments to test the role of candidate genes in photoperiodic clock.

OBSAH:

1. ÚVOD.....	1
1.1 DŮSLEDKY ZEMSKÉ ROTACE A JEJICH VLIV NA ORGANISMY..	1
1.2.2 CIRKADIÁNNÍ, LUNÁRNÍ A SEZÓNŇÍ RYTMY.....	2
1.2.3 FOTOPERIODISMUS.....	3
1.2.4 DORMANCE A DIAPAUZA.....	4
1.2 METODY STUDIA FOTOPERIODISMU.....	6
1.2.1 METODY REVERZNÍ GENETIKY.....	7
1.2.1.1 RNA INTERFERENCE.....	7
1.2.1.2 ZFNs.....	8
1.2.1.3 PIGGYBAC.....	9
1.2.1.4 VIRUS SINDBIS.....	11
2. CÍL PROJEKTU.....	12
3. NÁVRH EXPERIMENTU.....	12
3.1. RNAi.....	15
3.2. ZFNs.....	16
3.3. PIGGYBAC.....	18
4. ZÁVĚR.....	19
5. LITERATURA.....	20

1. Úvod

1.1 Důsledky zemské rotace

Od té doby, co se na naší planetě objevil život, je ovlivňován denními a sezónními vlivy, tedy rotací Země kolem své osy a kolem Slunce.

Obecně platí, že délka dne se mění během roku v závislosti na zeměpisné šířce. Tato změna je příčinou naklonění zemské osy, směrem k rovině ekliptiky, tedy dráze po níž Země obíhá kolem Slunce a která protíná nebeskou sféru (Stephenson, 1997).

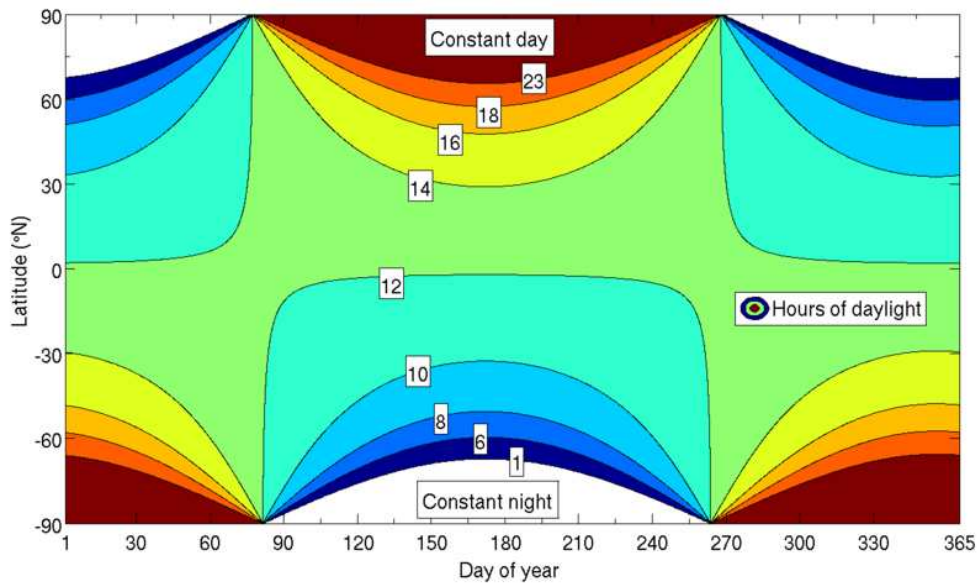
Vzhledem k náklonu zemské osy od roviny oběhu Země okolo Slunce rozlišujeme v průběhu roku na Zemi čtyři zlomové okamžiky, jakými jsou letní a zimní slunovrat a jarní a podzimní rovnodennost, které předznamenávají nástup dalšího ročního období.

V okamžiku letního slunovratu (20.-22. června) je severní pól nakloněn směrem ke Slunci a sluneční paprsky dopadají kolmo na obratník Raka. Den je nejdelší na sever od severního polárního kruhu, kde slunce vůbec nezapadá. Od severního polárního kruhu směrem na jih se den postupně zkracuje přes rovník, kde je trvá 12 hodin, až po jižní polární kruh, kde nastává polární noc.

V zimním slunovratu (20.-22. prosince) nastane opačná situace. Od jižního pólu po jižní polární kruh sluneční svit neustává, dále směrem na sever se den zkracuje až po polární kruh.

V době rovnodennosti (22.-23. září – podzimní, 19.-21. března - jarní), sluneční paprsky dopadají kolmo na rovník a délka dne je všude na Zemi přibližně 12 hodin.

Kromě proměnlivé délky dne můžeme v průběhu roku pozorovat také změnu teploty, ta je dána intenzitou slunečního záření, která závisí na úhlu dopadajících paprsků na zemský povrch. Dopadají-li paprsky kolmo, je intenzita slunečního záření největší, dopadají-li šikmo, intenzita se snižuje. Z toho vyplývá, že v letním slunovratu je nejtepleji v oblastech ležících na obratníku Raka, obdobně je tomu v zimním slunovratu, kdy je nejtepleji na obratníku Kozoroha. Za rovnodennosti je nejteplejší oblastí rovník (Barry, Chorley, 2004).



Obr. 1: Délka dne v závislosti na zeměpisné šířce.

(http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hours_of_daylight_vs_latitude_vs_day_of_year.png)

V důsledku změn v délce trvání dne, noci a střídání ročních období, musí především suchozemští živočichové mnohdy čelit prudkým změnám teploty, vlhkosti a dalším nepříznivým vlivům vnějšího prostředí. Proto se u nich vyvinuly mechanismy, které jim napomáhají vyrovnat se s těmito jevy. Některé z nich jsou přímou odpovědí na změny v jejich okolí, jiné, a to mnohem častější jsou zřejmým projevem endogenní (vrozené) periodicity.

Přirozené rytmy vyskytující se u všech skupin živočichů v závislosti na vnějším prostředí zaujaly francouzského astronoma De Mairana již v 18. století. Ten poprvé popsal pravidelný pohyb listů během dne u rostliny citlivky (*Mimosa*) (Denlinger et al., 2001). Hlavním vnějším signálem pro tuto pohybovou aktivitu je pravidelné střídání dne a noci.

1.1.1 Cirkadiánní, sezónní a lunární rytmy

Zvláštní význam mají endogenní oscilace, které se vyvinuly s periodou blízkou 24 hodinám, tedy cirkadiánní rytmy, které byly pozorovány jak u živočichů, tak i u rostlin. Zdá se, že základ hodin je přítomen v každé buňce a jejich chod je synchronizován centrálními hodinami. O existenci vnitřních hodin svědčí i fakt, že se

rytmicita zachovává po určitou dobu i v případě, že je daný živočich umístěn do temnoty, přičemž délka jednotlivých period se může poněkud zkracovat nebo prodlužovat (Sehgal, 2004).

Cirkadiánní rytmy jsou řízeny zejména vnímáním světla, které je však odděleno od běžného způsobu vidění. U hmyzu je světlo pro nastavení hodin vnímáno specifickými na světlo reagujícími neurony, které obsahují světločivné pigmenty lišící se od pigmentů retiny oka. Podstata fungování hodin je uložena v genomu jednotlivých organismů, jedná se tedy o výdobytek evoluce. Oscilátor, který tyto procesy řídí pracuje na principu zpětné vazby. Hromadící se genový produkt, inhibuje vlastní transkripci, která se znovu rozběhne až poté, co koncentrace produktu poklesne pod určitou mez (Rosato, 2007).

Kromě rytmů cirkadiánních existují i rytmy s delší periodou jakými jsou například rytmy lunární nebo sezónní. Lunární rytmy jsou často ovlivňovány přílivem a odlivem, proto je lze pozorovat především u živočišných druhů vázaných na mořskou vodu, například u korýšů. Sezónní rytmy, jak už bylo řečeno, souvisí s množstvím dopadajícího energie na zemský povrch, které se mění spolu s poměrnou délkou dne a noci směrem od rovníku a samozřejmě i spolu se střídáním ročních období. Na určité roční období je například vázána pohlavní aktivita a vnějším podnětem je pro ni změna délky dne (Hodkova, 1976). Adaptací na takto pravidelně se měnící délku dne během roku vzniká fotoperiodismus. Příkladem může být sezónní výskyt dormantních stádií či diapauzních stádií v životní cyklu nebo migrace motýlů monarchů (Sauman *et al.*, 2005).

Relativní délka dne často reguluje veškerý vývoj živočichů i rostlin. Kromě rozmnožování jsou i další aspekty fyziologie a chování hmyzu řízeny biologickými hodinami, patří mezi ně: pohyb, příjem potravy, kuklení, apod., jejichž aktivita je omezena na přesnou část roku, dne či noci (Saunders *et al.*, 2002).

1.1.2 Fotoperiodismus

Fotoperiodismus tvoří směsici jevů, jejichž pomocí jsou organismy schopny rozlišit dlouhé dny letních měsíců od kratších dnů podzimu či zimy. Tím tedy získají informaci z prostředí ohledně toho, v jaké fázi roku se právě nacházejí.

Fotoperiodismus jako přírodní fenomén byl poprvé popsán Garnerem a Allardem roku 1920 (Garner, Allard, 1920), kteří zjistili, že mnoho rostlin včetně tabáku, sóji, ředkvičky, mrkve a dalších může kvést a rodit pouze při dlouhém dni. Již tyto první vědecké výzkumy dospěly k tomu, že sezónní aktivita ať už hmyzu, ptáků, plazů nebo savců funguje podle stejného principu. U hmyzu je nejrozšířenějším projevem fotoperiodismu indukce a ukončení diapauzy (Saunders et al., 2002). Fotoperiodismus jako prostředek adaptace na sezónní vlivy závisí na její vhodném vhodném načasování a ostatních reakcích spojených s výkyvy během sezóny. U všech jedinců nedochází k rozhodnutí stejně – obvykle jej zobrazujeme fotoperiodickou křivkou a podmínky, kdy 50% jedinců diapauzuje označujeme jako kritickou fotoperiodu, která je určena geneticky. Kritická fotoperioda liší v závislosti na zeměpisné šířce, je tedy ovlivněná dlouhodobým přizpůsobením živočicha danému prostředí. Je delší v severkých oblastech (na severní polokouli), kde je studenější klima a kratší vegetační období než v jižněji položených oblastech (Denlinger et al., 2001, (Lumme *et al.*, 1975; Lankinen & Forsman, 2006; Lankinen, 1986).

1.1.3 Dormance a diapauza

Ekologicky je možné rozlišit tři typy dormance: hibernaci a estivaci, třetím zvláštním typem je diapauza. Fyziologické mechanismy jejich řízení jsou velmi různorodé.

Hibernace a estivace jsou stavy sobě velmi podobné, kdy je živočich nucen vzhledem k nepříznivému klimatickému období v průběhu roku zredukovat své metabolické pochody na minimum, snížit srdeční tep a tělesnou teplotu, aby šetřil energií a byl schopen přečkat v tomto stavu nepříznivé období zimy či sucha (Wilz, Heldmaier, 2000).

V tropických oblastech je nejčinnější obdobím pro hmyz období dešťů a stává se dormantním s nástupem období sucha. V temperátních oblastech hmyz zahajuje své nejčinnější období na jaře a přechází do dormantního stádia v zimě. V některých subtropických oblastech, kde jsou léta horká a suchá a zimy studené nebo chladné, mohou nastat dvě období spojená s vegetačním klidem - v zimních a letních měsících (Hodek & Kostal, 1997).

V případě dormance se začne organismus zotavovat hned po odeznění nepříznivých podmínek a jeho metabolismus se zcela obnoví. Například hmyz ve stavu

strnulosti vlivem nízkých teplot pokračuje v činnosti, když teplota stoupne nad určitou mez.

Diapauza je dědičně podmíněná dormance, která synchronizuje životní cyklus druhu s roční dobou. Jedná se o aktivně indukovaný proces, který často zahrnuje změny neurokrinní aktivity a počátek diapauzy je často způsoben prostřednictvím faktorů z vnějšího prostředí, které signalizují nástup nepříznivých podmínek. Mezi tyto faktory patří například teplota, vlhkost či změna fotoperiody, která má nejdůležitější vliv. (Jervis, 2005). Navíc může být diapauza mnohdy vyvolána s předstihem, a to v době, kdy jsou vnější podmínky ještě přijatelné, ale hrozí zhoršení, které je živočich schopen předpovědět na základě zkracujícího se dne. Podnět vyvolávající diapauzu v tomto případě často působí na dřívější vývojové stádium než je to, ve kterém se pak projeví. Tento mechanismus tak může sloužit k synchronizaci životního cyklu s ročním obdobím (Adkinsson, Roach, 1971). Diapauza v sobě zahrnuje zastavení dalšího vývoje nebo hmyzí proměnu, skladování charakteristických metabolitů v hemolymfě, snížení metabolismu, rezistenci k vysychání a někdy také stavbu specializovaných zimovišť (Kostal *et al.*, 2008). Jak je informace determinující diapauzu v organismu uchována však není doposud známo.

Hmyzí diapauza je klasifikována na několik typů. Liší se podle toho, v jaké fázi životního cyklu k ní dojde, další kritériem je například to, jestli se jedná o obligatorní nebo fakultativní diapauzu. Vstup do obligatorní diapauzy se děje bez ohledu na vlivy vnějšího prostředí. Do diapauzy fakultativní vstupuje jedinec jen tehdy, pokud to podmínky prostředí vyžadují (Jervis, 2005). Klasifikaci typů provedl Müller, který rozlišuje tři základní typy, a to parapauzu, eudiapauzu a oligopauzu (Müller, 1970).

Parapauza je obligatorní diapauza pozorovaná u jednogeneračních druhů. Její nástup je pro každý druh specifický a dochází k němu v konkrétním vývojovém stupni larválního stádia hmyzu (instar). Počátek tohoto typu diapausy je geneticky determinován a ukazuje se, že je nezávislý na vlivu vnějšího prostředí.

Eudiapauza je obvykle indukována fotoperiodickým způsobem a bývá ukončena výraznější změnou teploty, která je spojena s nástupem chladnějšího období. Jedná se tedy o vzájemné propojení biologických hodin a biologického kalendáře.

Oligodiapauza má rovněž fakultativní povahu, která spočívá ve fotoperiodické citlivosti. (Saunders *et al.*, 2002).

Přestože jsme relativně dobře schopni pozorovat tyto procesy na různých druzích živočichů, jejich podstata na molekulární úrovni je stále nejasná. Za účelem

komplexního pochopení, jak fungování vnitřních hodin, tak i přizpůsobení organismů podmínkám vnějšího prostředí, je třeba využít rozličné metody molekulární biologie, které by nám pomohly rozšířit dosavadních znalostí o těchto jevech.

1.2 Metody studia fotoperiodismu

Metody studia, které by měly přispět k pochopení molekulárních mechanismů řídících fotoperiodismus, lze rozdělit do dvou kategorií. Jednak na **klasickou genetiku**, při které izolujeme jedince, který se liší fenotypem od jiných jedinců, přičemž genetický rozdíl není znám a ten právě potřebujeme nalézt. Výhodou klasické genetiky je, že umožňuje nalézt mutace prakticky na všech možných úrovních regulace (poškození promotorů, vytvoření stop kodonu v genu, nebo naopak vzniku dominantních mutací). O to pracnější je potom tyto mutace nalézt – zejména u nemodelových organismů to může být takřka nemožné, nebo velmi komplikované.

Reverzní genetika naopak postupuje opačným směrem – nejprve známe gen a u toho se snažíme zjistit jeho úlohu (Michels, 2002).

Existuje hned několik možností, jak toho lze docílit. Mezi nejznámější metody patří :

RNA interference

ZFNs (Zinc finger nucleases – zinkové prsty)

PiggyBac

Virus Sindbis

Metoda **RNA interference** je z těchto metod nejjednodušší. Pracnějšími metodami reverzní genetiky jsou postupy, kdy se přímo vyrobí transgenní organismus. Možností je celá řada a stále se objevují jejich modifikace.

Dříve byla transformace omezena jen na druhy zvířat, pro které byly k dispozici vhodné transpozóny umožňující včlenění DNA do genomu. Ukazuje se ale, že existují i transpozóny schopné fungovat v širším spektru živočišných druhů. Mezi nejuniverzálnější patří **piggyBac**.

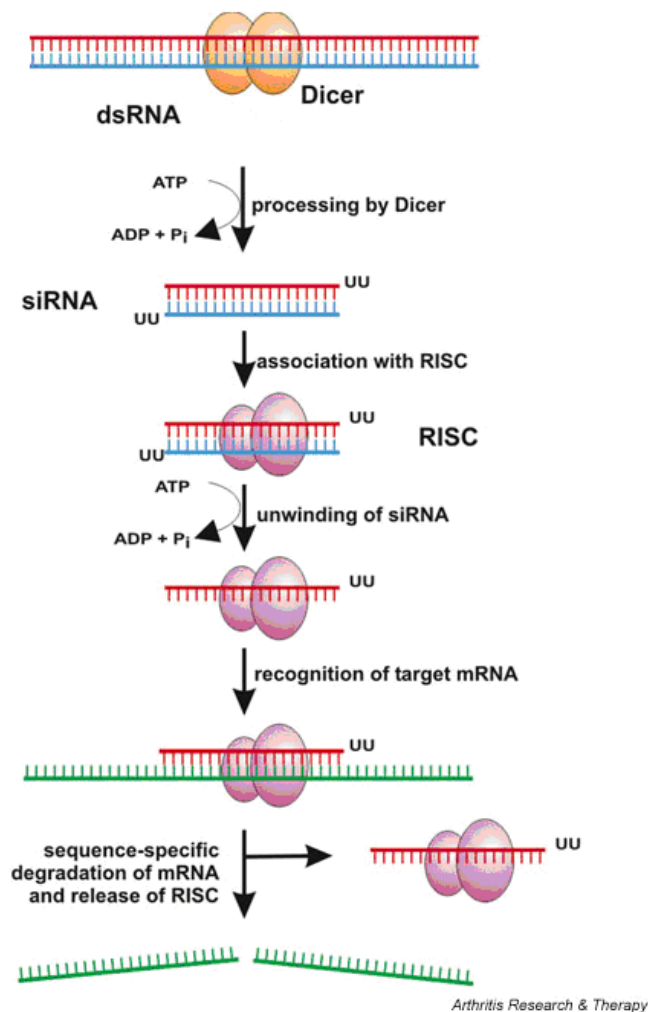
1.2.1 Metody reverzní genetiky

1.2.1.1 RNA interference

RNA interference je jednou z nejjednodušších metod reverzní genetiky. Jedná se o vysoce konzervovaný a evolučně starý mechanismus eukaryotických organismů, jehož funkcí je ochrana eukaryotických buněk vůči cizorodým organismům, např. proti virům (Ratcliff et al., 1999).

Pomocí tohoto účinného a velmi specifického procesu jsme schopni regulovat transkripci a expresi genů, a to tím, že injikujeme do embrya v ranném stádiu vývoje dvouvláknovou RNA (dsRNA). Krátké fragmenty dsRNA vpravené do jedince aktivují specifickou RNázu III. třídy zvanou Dicer, která je rozštěpí ještě na kratší sekvence, tzv. „small interfering“ RNA duplexy (siRNAs). Specifickým rysem siRNAs je charakteristický způsob vytváření zlomů vyznačující se svým přesahem dvou nukleotidů na 3'-konci obou řetězců a nefosforylovanou hydroxylovou skupinou. Tato charakteristika maximalizuje specifitu pro zacílení siRNAs do místa určení. U hmyzu či savců siRNA vytváří ribonukleoproteinový komplex zvaný RISC (RNAi silencing complex), který způsobuje rozdělení krátké dvoušroubovice siRNA na jednotlivá vlákna a s jedním z nich se specificky naváže na základě homologie na cílovou mRNA. Aktivitu komplexu zajišťuje protein zvaný Agronaut, jehož úlohou je štěpení mRNA v místě, které je vybráno pomocí siRNA v jednovláknové formě. Vyštěpená část je pak rozpoznána buněčnými mechanismy a buňkou odbourána (Schepers, 2005). Odbouráním sekvence tedy dojde k inaktivaci námi vybraných genů, jejichž účinky sledujeme.

Výhodou této metody je, že vzniklý segment siRNA rozpoznávající homologní sekvenci mRNA, je schopen se od vyštěpení vybraného úseku oddělit a hledat další homologní sekvenci.



Obr. 2 RNA interference (Rutz and Scheffold, 2004).

1.2.1.2 ZFNs (zinc finger nucleases)

Zinkové prsty (ZF) jsou proteinové domény, které se vyskytují v mnoha transkripčních faktorech jako jeden z možných strukturních motivů bílkovinného charakteru zajišťujícího specifickou vazbu na určitou sekvenci DNA. Transkripční faktor mění konformaci DNA a ovlivňuje tak transkripci. V peptidickém řetězci tohoto transkripčního faktoru jsou umístěny v určitých vzdálenostech cysteinové a histidinové molekuly, které reagují s atomem zinku a tím dochází ke stabilizaci celého řetězce ve tvaru zinkových prstů, na jejichž konci se nacházejí aminokyselinové zbytky reagující s DNA. ZF je možno navzájem kombinovat a docílit tak širokého měřítká sekvencí, na které se mohou vázat (Miller et al., 2007).

DNA vázající doména tvořená ZF spolu s doménou restričního enzymu tvoří hybridního proteinu ZFNs. Doména restričního enzymu - Fok I, má schopnost vytvářet libovolné zlomy v řetězci, pro jejíž funkčnost je však nutné, aby byla přítomna ve formě dimeru (Doyon et al., 2008). DNA vázající doména slouží k výběru místa, kde později dojde k sestřihu. Odstřižený kus je pak buňkou rozpoznán a následně je zajištěna jeho degradace prostřednictvím buněčných mechanismů a příslušný gen je tímto vyřazen z činnosti. Buňka je schopná chybějící část v DNA sama zacelit prostřednictvím svých opravných mechanismů. V jiných pokusech vědci zacílili ZFNs na vybraný gen a zároveň vpravili do buněk jinou variantu vystřiženého genu. Buňky si pak vystřižené místo DNA opravily nabídnutým kusem DNA. Tím byl v buňkách vyměněn příslušný gen (Carroll et al., 2006).

Dnes je zájem soustředěn hlavně na cíleně vytvářené mutace působením ZFNs či výměnu konkrétních genů, a to jak u modelových organismů, tak dokonce i u člověka.

1.2.1.3 PiggyBac

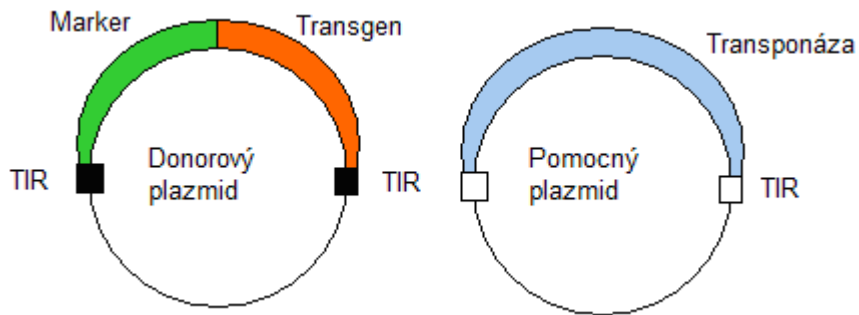
Transponovatelný element PiggyBac byl poprvé byl testován jako vektor pro přenos genů u druhu *Ceratitis capitata* (Handler et al., 1998).

Jedná se o krátký element s terminálními invertovanými repeticemi (TIRs) na svých koncích, ty hrají rozhodující úlohu pro průběh transpozice. Transpozice probíhá výhradně do cílových míst se sekvencí -TTAA- konzervativním mechanismem, který je znám u transpozónů II. třídy (Handler, 2001). Enzym transponáza se připojuje k oběma koncům transpozónu tvořených TIRs a k sekvenci DNA cílového místa, kde dochází ke štěpení. V místě naštěpení je transpozón integrován do genomu (obr.4).

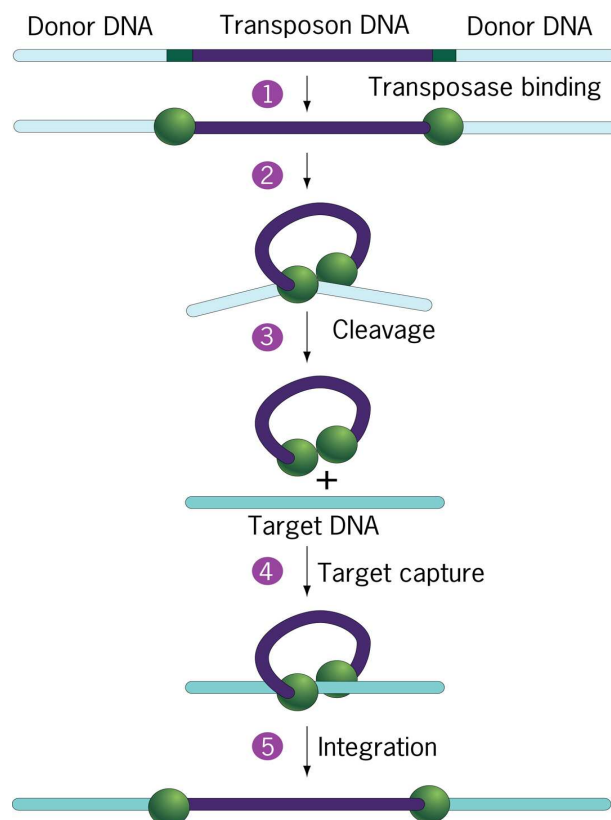
Pro transpozici jsou užívány dva plazmidy. Donorový, který nese mezi TIRs příslušný transgen spolu s markerem a pomocný plazmid sloužící pro přenos segmentu kódujícího enzym transponázu (obr.3). Pomocný plasmid se však netransponuje, neboť TIRs jsou u něj záměrně poškozeny nebo zcela chybí.

Oba plazmidy jsou injikovány do ranných embryí a spolu s jejich vývojem se začne exprimovat transponáza, která zprostředkuje transpozici transgenu do chromozómu (Wimmer, 2003). Pomocný plasmid se po několika buněčných děleních vytratí a byl-li donorový plasmid začleněn do chromozómu buněk zárodečné linie, tak někteří z potomků takto injikovaného jedince budou nést tento transgen. Na základě vhodného

markeru (fluorescenční protein) (Sarkar et al., 2006), jsou tito jedinci nalezeni a použití pro ustanovení transgenních linií. Je-li možné následně vybrat homozygotní jedince, může být linie udržována jako stabilní, jinak musí být přítomnost transgenu kontrolována pravidelně.



Obr. 3: Donorový a pomocný plazmid



Obr. 4: Integrace transpozonu do genomu

(<http://74.125.77.132/search?q=cache:nq5Id0VH41EJ:kfrserver.natur.cuni.cz/studium/pr>)

1.2.1.4 Sindbis virus

Využití viru Sindbis z rodu *Alphavirus*, *Togaviridae* je další možností, jak vytvářet transgenní organismy. Jedná se o jednovláknový RNA (ssRNA) virus, který se ukázal jako účinný modifikátor komářích buněk přirozeně se přenášející mezi komárovitými, jejichž hostitelem jsou obratlovci.

Sindbis virus se je replikovatelný v mnoha různých hmyzích tkáních a tato charakteristika ho činí využitelným nástrojem v biologii hmyzu jako „transducing agent“, který je však omezen velikostí inkorporovaného transgenu.

DNA klony těchto *alphavirů* mohou být vytvářeny z virové RNA metodou RT-PCR (Reverse-transcriptase polymerase chain reaction), která slouží k vytvoření mnoha kopií DNA sekvence z RNA. Vlákno RNA je nejprve přepisováno reverzní transkriptázou do sekvence cDNA (complementary DNA), případně může být namnoženo pomocí PCR (polymerase chain reaction). DNA klony slouží k snazší manipulaci, lze v nich indukovat změny v podobě přeuspořádávání genových sekvencí, vkládání nových segmentů nebo vyřazování vybraných genů z funkce (Foy, 2004).

Další možností jak využít virovou ssRNA je fakt, že je schopná hybridizovat, stočit se na základě komplementarity bází a vytvořit tak dvojvlákno (funkční dsRNA), které je schopné indukovat RNA interferenci (Štruncová et al., 2005).

Výhodou tohoto virového vektoru je možnost využití u širokého spektra hostitelů a snadný způsob zavedení do organismu, a to injekčně nebo prostřednictvím potravy (Handler, A.A.James, 2000). Naopak nevýhoda viru Sindbis spočívá v tom, že může způsobit abnormální změny i v savčím genomu, tedy i u člověka. Vzhledem k tomuto riziku, mu nebude věnována pozornost v následující kapitole.

2. Cíl projektu:

Cílem projektu je otestovat použitelnost metod, které zde byly navrženy a pokusit se tak získat více informací o fotoperiodických jevech ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*).

Základem je nejprve zjistit a propracovat jaké konkrétní výhody by určité metodické postupy přinášely pro studovanou tematiku a určit časovou náročnost a proveditelnost vybraných metod. A až poté bude mít smysl přistoupit k vlastnímu experimentu.

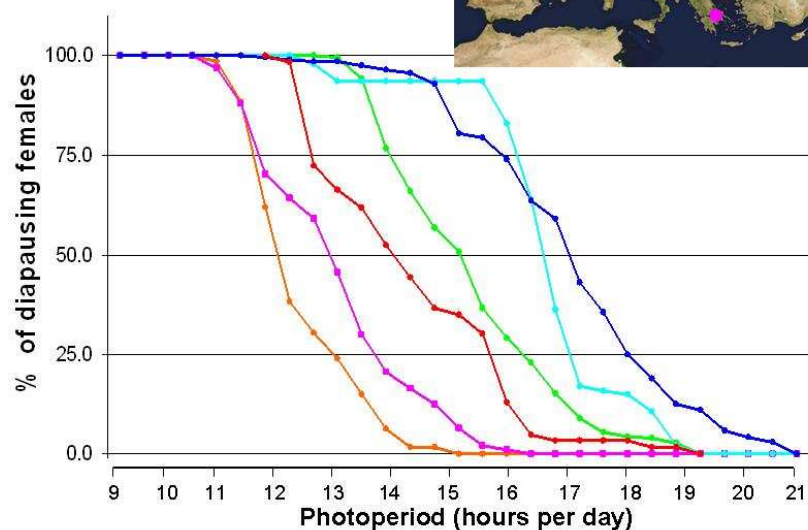
3. Návrh experimentu

Metody uvedené v této práci fungují u některých organismů s poměrně velkou účinností, zatímco u jiných modelových organismů je úspěšnost mnohem nižší. Proto se nejprve zaměříme na otestování toho, jak dobře fungují u ruměnice pospolné.

V našem konkrétní případě se snažíme nahradit, vypnout či indukovat mutace v hodinových genech ovlivňujících cirkadiánní rytmy modelových organismů jako je *D. melanogaster*. Následně pak sledujeme, jestli indukovaná změna v genomu námi studovaného jedince se projeví na jeho chování, tedy, jestli má nějaký vliv na fotoperiodické jevy. Pokud ano, můžeme se domnívat, že mezi fotoperiodickými a cirkadiánními cykly existuje určitá analogie.

Základem takového pokusu je efektivní způsob sledování fotoperiodických hodin. Moje předběžné výsledky (obr.3) ukazují fotoperiodickou křivku ruměnic vystavených postupně se prodlužujícím dni. Tento postup jednak umožňuje stanovit u jednotlivých jedinců daného druhu reakci na délku dne a navíc lze takto efektivně sledovat velké množství jedinců.

Effect of Photoperiod on the Diapause Termination in Geographic strains of *P. apterus*

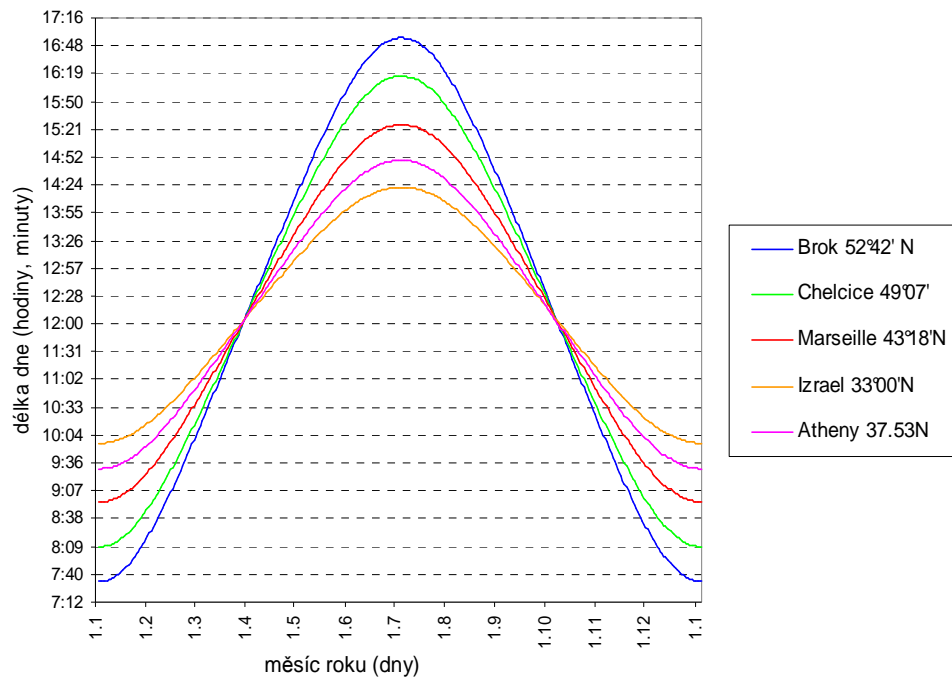


Obr. 5: Fotoperiodická odpověď různých geografických linií *P. apterus*, předběžné výsledky (Bajgar, Pecková, Doležel, nepublikováno).

Samice *P. apterus* byly chovány jednotlivě ve stejných podmínkách s postupně se prodlužující fotoperiodou. Na ose y je uveden počet diapausujících samic (%). Na ose x je zobrazena postupně se prodlužující fotoperioda (h). Na přiložené mapce jsou vyobrazena místa původu *P. apterus* (oranžově - Izrael, růžově - Řecko, červeně - Francie, zelená - Chelčice a světle modrá- Žacléř, tmavě modrá - Polsko).

Z grafu je patrná závislost fotoperiodické odpovědi na geografické poloze místa původu jedince. Pro *P. apterus* z nejnižnějšího místa (Izrael) je dostačující kratší fotoperioda pro ukončení diapauzy, naopak nejseverněji žijící jedinci reagují ukončením diapauzy s nejdelší fotoperiodou, jak bylo předpokládáno.

Rozdílná odpověď na změnu fotoperiody *P. apterus*, jejichž místem původu je ČR nezpůsobila změna v zeměpisné šířce, neboť ta není velká, ale rozdílná nadmořská výška obou lokalit. Světle modrá lokalita – Žacléř se nachází v oblasti Krkonoš, z čehož můžeme usuzovat, že fotoperiodické jevy jsou vázány jak na zeměpisnou šířku, tak i na nadmořskou výšku.



Obr. 6: Porovnání délky dne v průběhu roku na daných lokalitách (Doležel, nepublikováno), na ose y je uvedena délka dne (h,min), osa x zobrazuje jednotlivé měsíce v roce. Barva křivek odpovídá barvě vyznačených lokalit na mapce v předchozím obrázku (obr.3).

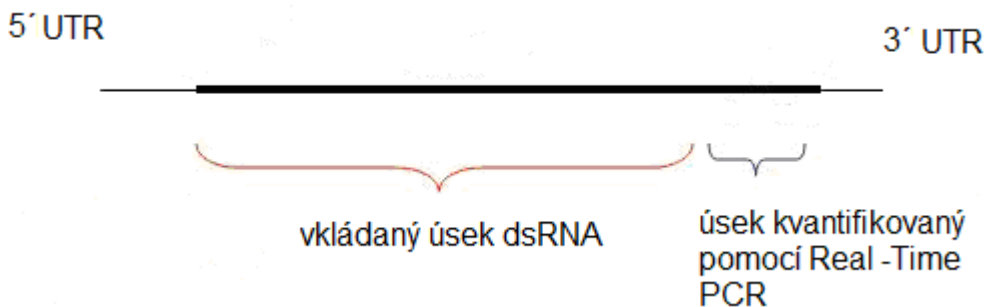
Ve všech lokalitách se délka dne od zimních měsíců k letním prodlužuje, na počátku léta vrcholí a den se pak začne postupně zkracovat. V lokalitě, která je charakterizována největší zeměpisnou šířkou (Polsko) se délka dne mění nejrychleji, neboť rozdíl krajních hodnot je největší (minimální hodnota délky dne cca 7,5 hodiny na počátku zimy, maximum odpovídá cca 17 hodinám na počátku léta). Pro lokalitu s nejmenší zeměpisnou šířkou, tedy nejjižnější, platí, že délka dne se mění v průběhu roku pomaleji (od minimální hodnoty cca 10 hodin v zimě k maximu cca 14,5 hodiny v létě).

Vzhledem k tomu, že jedinci ze severněji položených lokalit potřebují delší světelnou periodu k ukončení diapauzy, je jejich vegetační období kratší, naopak jedincům vyskytujícím se jižněji stačí fotoperioda kratší, jejich vegetační období je tedy delší. To poukazuje na fakt, že délka vegetačního období je určena teplotou. Jedinci ze severních lokalit nemohou ukončit diapauzu dříve, protože teplotní podmínky nejsou příznivé pro vývoj další generace.

3.1. RNA interference

Výhodou RNA interference je rychlost a relativně malá pracnost metody - k provedení pokusu potřebujeme pouze vyrobit dsRNA příslušného genu a tu vpravit do studovaných organismů. V případě ruměnic lze snadno injikovat do jedince přibližně 5-10 μ l roztoku o koncentraci RNA až 10 μ g/ μ l (Bajgar, osobní sdělení), což by mělo být dostatečné množství. Snížení genové exprese bylo u *P. apterus* pomocí RNAi prokázáno v tukovém tělese (Kostal, Tollarova-Borovanska, 2009) a je tudíž nadějně, že RNAi může fungovat v centrální nervové soustavě.

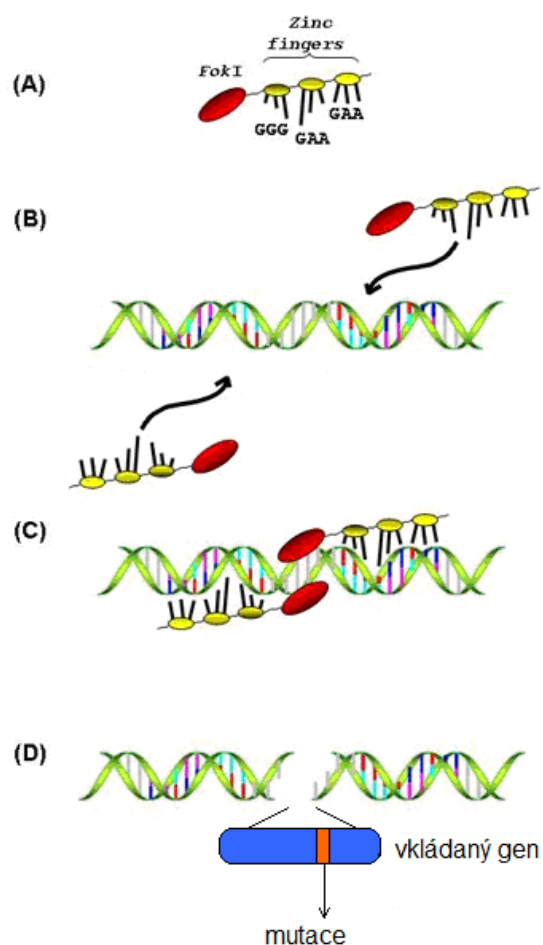
Zaměříme se na „vypnutí“ genů, u kterých předpokládáme jejich zapojení do regulace fotoperiodismu. Jedná se zejména o geny cirkadiálních hodin jako jsou *period* a *cryptochrome*.



Obr. 7 RNAi

Do tkáně jedince „dodáme“ dsRNA, která odpovídá sekvenci mRNA některého z hodinových genů, dsRNA s ní interaguje a umlčí ho. Pro zjištění, jaká je četnost mRNA v organismu, tedy kolik už jí bylo vyřazeno s činností, použijeme metodu real time PCR, která je schopná detekovat přírůstky DNA nebo RNA v každém cyklu PCR pomocí navázaného fluorescenčního barviva. Porovnáním četností výskytu námi vybraného úseku mRNA s referenčním genem, u nějž jsou přírůstky známy, zjistíme její koncentraci ve studovaném jedinci. Výslednou koncentraci mRNA pak porovnáme s koncentrací mRNA u kontrolního jedince, u kterého k interferenci nedochází, čímž zjistíme kolik umlčované mRNA je funkční pro následný přepis. Pokud probíhá interference správně, koncentrace mRNA by se měla v průběhu PCR snižovat a námi sledované proteiny by se neměly přepisovat. (Hoy, 1994).

3.2 ZFNs



Obr. 8 ZFNs (<http://www.mcdb.lsa.umich.edu/labs/ttzfira/research.php>).

ZFNs slouží jako nástroj k tvorbě dvojřetězcových zlomů. (A) Skládají se z domény restrikčního enzymu - Fok I a DNA vázající domény (tři ZFs). (B) Pomocí unikátní kombinace bazí na ZF vyhledají cílové místo. (C) FokI funguje jako dimer. Návázáním dvou ZFNs může dojít k tvorbě dvojřetězcových zlomů. (D) Vyštěpená část je degradována a zároveň do ní může být zavedena jiná varianta vystřiženého genu, a to tím způsobem, že vkládaný gen obsahuje sekvence komplementární k sekvencím před a za místem štěpu. Jen díky nim, ho původní vlákno přijme a chybějící část DNA jím zacelí.

Vlivem mutace v nahrazeném genu, můžeme následně sledovat nově indukované vlastnosti příslušných organismů a porovnat je se známou odpovědí na tutéž mutaci provedenou u modelových organismů.

PERIOD protein

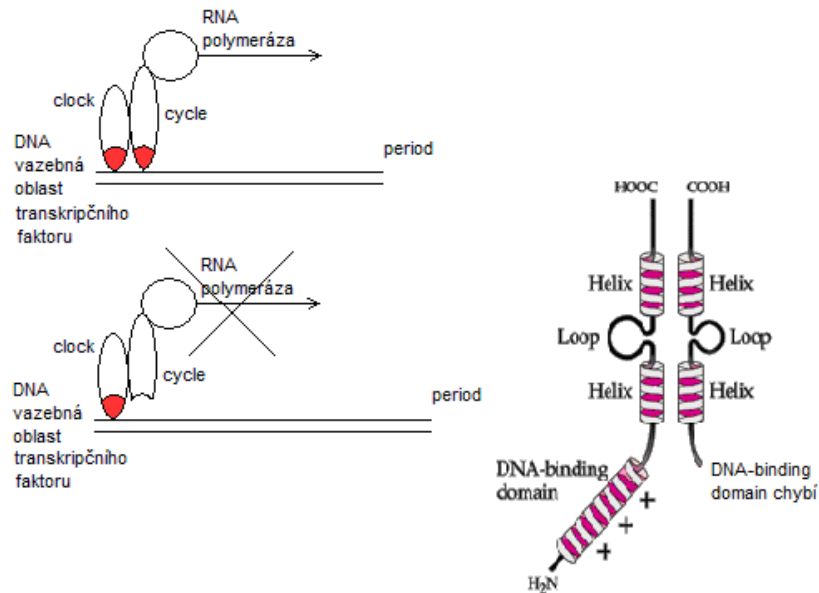
P. apterus ..MENLMDELTKPPNLKVDIVTE-EQSFSEKRSVMLGEISPHHDYNSKSSSE...
D. melanogaster ..METLMDEVSRADLKLELPHENELTVSEKRSVMLGEISPHHDYDSSKSSSE...
per^S per^T

Obr. 9 (Doležel nepublikováno).

U *D. melanogaster* známe sekvence kódující protein *period*, podobné sekvence lze najít i u *P. apterus*. Této analogie můžeme využít pro možnou manipulaci s touto sekvencí a následně porovnat reakci obou jedinců.

Tučně jsou označeny aminokyseliny, v nichž se oba druhy shodují. Červeně pak aminokyseliny, jejichž mutace je u *D. melanogaster* spojena s ovlivněním rychlosti periody cirkadiálních rytmů (Hall, 2003). Tyto mutace jsou u octomilky dominantní a proto lze předpokládat, že exprese mutovaného proteinu *per^S* a *per^T* v ruměnici povede také ke zrychlení cirkadiálních hodin *P. apterus*. Exprese tohoto konstruktů může být zajištěna transgenem, který bude integrován pomocí vektoru PiggyBac. Ještě elegantnější by bylo včlenit mutaci přímo do genu *period* pomocí zinkových prstů.

3.3 PiggyBac



Obr. 10 Ovlivnění transkripce (Gilbert, 2006).

Transkripce je proces, v němž se podle genetické informace zapsané v sekvenci DNA vyrábí nový řetězec RNA na základě komplementarity bází. Tento proces zahajují specializované proteiny, tzv. transkripční faktory přisedající na regulační oblast promotoru spolu s RNA polymerázou, která zajišťuje vlastní průběh reakce (rozplétá řetězec DNA a syntetizuje k němu komplementární v podobě RNA). Transkripční faktory vážící se na DNA mají zvláštní strukturální motivy umožňující tuto vazbu. Příkladem takového motivu je helix-loop-helix, který se skládá v tomto případě ze dvou proteinů *clock* a *cycle*, které podmiňují následný přepis proteinu regulujícího fotoperiodické jevy - *periodu*. Proteiny tvořící basic-helix-loop-helix (bHLH) motiv často obsahují též DNA vazebnou bazickou doménu rozeznávající promotorickou sekvenci a fungují pouze v heterodimerní formě (Brown, Brown, 2002).

Odstraněním bazické domény vznikne protein, který se nadále váže ke druhému bHLH proteinu, ale vznikající dimer již není schopný vazby na DNA a je tedy nefunkční. Pokud bychom tedy dokázali vyrobit takovýto zkrácený transkripční faktor v nadbytku, dojde k vychytání všech partnerů (a tudíž všechny dimery budou nefunkční) a navození situace obdobné nulové mutaci v odpovídajících transkripčních faktorech (byť originální gen je nepoškozený).

Použitím trasponovatelného elementu PiggyBac začleníme do genomu *P. apterus* konstrukt zajišťující expresi takto pozměněného proteinu.

4. Závěr

Cílem našeho projektu je otestovat použitelnost uvedených metod pro náš modelový organismus, tedy ruměnici pospolnou (*Pyrrhocoris apterus*). Studium tohoto jedince se pokusíme získat více informací o fotoperiodických jevech, jejichž podstata je na molekulární úrovni zatím nejasná. Pro pochopení skutečného fungování fotoperiodických jevů je nutné zrealizovat námi navržené experimenty, které nám snad napoví víc.

Z již prezentovaných výsledků týkajících se fotoperiodické odpovědi, je jednoznačné, že jsme schopni relativně dobře pozorovat fotoperiodické jevy, tedy jejich projev – diapauzu. Proto se potvrdila naše hypotéza, že *P. apterus* je vhodným jedincem pro studium fenoménu, kterým jsou fotoperiodické jevy.

Díky pozorování odlišných reakcí jednotlivých linií na změnu délky působení slunečního záření se navíc potvrdily naše předpoklady ohledně rozdílů mezi jednotlivými liniemi, které tedy potvrzují adaptaci ruměnic na různou zeměpisnou šířku, případně i nadmořskou výšku.

6. Literatura

- P.L.Adkinsson, S.H.Roach (1971) A mechanism for seasonal discrimination in photoperiodic induction of pupal diapause in the bollworm *Heliothis zea* (Boddie), *Biochronometry*, Proceeding of a symposium
- R.G.Barry, R.J.Chorley (2004) *Atmosphere, weather and climate*
- W.M.Brown, P.M.Brown (2002) *Transcription, Cell & biomolecular sciences*
- D.Carroll, J.J.Morton, K.J.Beumer, D.J.Segal (2006) Design, construction and in vitro testing of zinc finger nucleases, *Nature Publishing Group Vol.1 No.3*
- D.L.Denlinger, J.M.Giebultowicz, D.S.Sanders (2001) *Insect Timing, Circadian rhythmicity to seasonality*
- Y.Doyon, J.M.McCammon, J.C.Miller, F.Faraji, C.Ngo, G.E.Katibah, R.Amora, T.D.Hocking, L.Zhang, E.J.Rebar, P.D.Gregory, F.D.Urnov, S.L.Amacher (2008) Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases, *Nature Publishing Group, Vol. 26, No. 6*
- B.D.Foy, K.M.Myles, D.J.Pierro, I.Sanchez-Vargas, M.Uhlířová, M.Jindra, B.J.Beauty, K.E.Olson (2004) Development of a new Sindbis virus transducing system and its characterization in three Culicine mosquitoes and two Lepidopteran species, *Insect molecular biology*, 13, 89-100
- W.W.Garner and H.A.Allard (1920) Effect of the relative length of the day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants, *Journal of Agricultural Research* 18, 553-606
- S.F.Gilbert (2006) *Developmental biology, Transcription factors, The trans-regulators of promoters and enhancers*
- J.C.Hall (2003) *Genetics and molecular biology of rhythms in Drosophila and other insect*
- A.M.Handler (2001) A current perspective on insect gene transformation, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 111–128
- A.M.Handler, A.A. James (2000) *Insect transgenesis, Methods and applications*
- A.M.Handler, D.S.McCombs, M.J.Fraser, S.H.Saul (1998) The lepidopteran transposon vector, *piggyBac*, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly, *The National Academy of Sciences*, 95(13): 7520–7525
- I.Hodek & V.Kostal (1997) Photoperiodism and control of summer diapause in the Mediterranean tiger moth *Cymbalophora pudica*, *J.Insect Physiol* 43, 767-77

- M.Hodkova (1976) Nervous inhibition of corpora allata by photoperoid in *Pyrrhocoris apterus*. *Nature* 263, 521-3
- M.A.Hoy (1994) *Insect molecular genetics, An introduction to Principles and Application, Second Edition*
- M.A.Jervis (2005) *Insect as natural enemies : A practical perspective*
- V.Kostal, M.Tollarova-Borovanska (2009) The 70kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus*, *Public Library of Science* 4: e4546
- V.Kostal, M.Tollarova, D.Dolezel (2008) Dynamism in physiology and gene transcription during reproductive diapause in a heteropteran bug, *Pyrrhocoris apterus*. *J.Insect Physiol* 54, 77-88
- P.Lankinen (1986) Genetic correlation between circadian eclosion rhythm and photoperiodic diapause in *Drosophila littoralis*, *J.Biol.Rhythms* 1, 101-18
- P.Lankinen, P.Forsman (2006) Independence of genetic geographical variation between photoperiodic diapause, circadian eclosion rhythm, and Thr-Gly repeat region of the period gene in *Drosophila littoralis*, *J.Biol.Rhythms* 21, 3-12
- J.Lumme,S.Lakovaara,A.Oikarinen, J.Lokki (1975) Genetics of the photoperiodic diapause in *Drosophila littoralis*, *Hereditas* 79, 143-8
- J.C.Miller, M.C.Holmes, J.Wang, D.Y.Guschin, Ya-Li Lee, I. Rupniewski, C.M. Beausejour, A.J.Waite, N.S. Wang, K.A. Kim, P.D. Gregory, C.O. Pabo, E.J. Rebar (2007) An improved zinc-finger nuclease for highly specific genome editing, *Nature Biotechnology*, doi : 10.1038/ntb1319
- H.J.Müller (1970) *Formen der Dormanz bei Insekten*
- F.G.Ratcliff, S.A. MacFarlane, D.C. Baulcombe (1999) Gene silencing without DNA: RNA- mediated cross-protection between viruses 11: 1207–1216
- E.Rosato (2007) *Circadian rhythms, Methods and protocols*
- D.S.Saunders, C.G.H.Steel, X.Vafoupoulou, R.D.Lewis (2002) *Insect clocks, Third edition*
- A.Sehgal (2004) *Molecular biology of circadian rhythms*
- Rutz and Scheffold (2004) Towards *in vivo* application of RNA interference – new toys, old problems, *Arthritis Research and Therapy*, doi:10.1186/ar1168
- A.Sarkar, A.Atapattu, E.J. Belikoff, J.C. Heinrich, X. Li, C.Horn, E.A. Wimmer, M.J. Scott (2006) Insulated *piggyBac* vectors for insect transgenesis *BMC Biotechnology* doi:10.1186/1472-6750-6-27

- I.Sauman, A.D.Briscoe, H.Zhu, D.Shi, O.Froy, J.Stalleicken, Q.Yuan, A.Casselmann, S.M.Reppert (2005) Connecting the navigational clock to sun compass input in monarch butterfly brain, *Neuron* 46, 457-67
- U.Schepers (2005) RNA Interference in Practice: Principles, Basics, and Methods for Gene Silencing in *C. elegans*, *Drosophila*, and Mammals
- F.R.Stephenson (1997) Historical eclipses and Earth rotation
- S.Štruncová, R. Borská, B. Kusenda, P. Mejstřík, D. Dvořáková, J. Mayer, Š. Pospíšilová (2005) RNA interference - účinný nástroj regulace genové exprese, *Biologické listy* 70 (3): 231-247
- M.Wilz, G. Heldmaier (2000) Comparison of hibernation, estivation and daily torpor in the edible dormouse, *Glis glis*, *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 511-521
- E.A.Wimmer (2003) Applications of insect transgenesis
- C.A.Michels (2002) Genetic techniques for biological research, A case study approach
- <http://74.125.77.132/search?q=cache:nq5Id0VH4IEJ:kfrserver.natur.cuni.cz/studium/prednasky/molgen/transpozony.ppt+transpozice+mobilnich+elementu+II.tridy&cd=2&hl=cs&ct=clnk&gl=cz>, 20.4.2010
- http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hours_of_daylight_vs_latitude_vs_day_of_year.png, 21.4.2010
- <http://www.mcdb.lsa.umich.edu/labs/ttzfira/research.php>, 6.4.2010