

Některá data byla odebrána s vědomím vedoucího katedry Molekulární biologie
(Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích) prof. RNDr. Julia
Lukeše.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



Diplomová práce

CIRKADIÁNNÍ RYTMY MOUCHY DOMÁČÍ (*Musca domestica*)

OLGA BAZALOVÁ

Školitelé: David Doležel

Ivo Šauman

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

2010

Bazalová O (2010): Cirkadiánní rytmy mouchy domácí (*Musca domestica*) [Circadian rhythm in the housefly (*Musca domestica*). Mgr. Thesis, in Czech.] – 57 p., The University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

In this thesis the expression pattern of five circadian clock genes (*cwo*, *pdp 1ε*, *ck 1ε*, *ck 2β* and *pdh*) was studied in the housefly (*Musca domestica*). The influence of temperature on the expression pattern of these five clock genes and two other genes, *per* and *tim* was examined. The locomotor activity of flies exposed to three different temperature conditions was studied.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou. Souhlasím se zveřejněním elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

30.4.2010, České budějovice

.....

Poděkování:

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala svým školitelům, Davidovi a Ivošovi, za jejich pomoc, cenné rady a trpělivost. Také bych chtěla poděkovat Romanu Nežilovi za péči o mouchy a ostatním členům laboratoří 104 a 224 za vytváření skvělé atmosféry, jejich cenné rady a ochotu mi ve všem pomoci. Také bych ráda poděkovala Jaromíru Cihlářovi za výraznou psychickou podporu a v neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé své rodině, obzvláště rodičům a babičce za jejich neocenitelnou podporu. Děkuji moc, bez vás bych to nezvládla.

OBSAH

1. ÚVOD	6
1.1. Cirkadiánní cykly	6
1.2. Cirkadiánní biologické hodiny	7
1.3. Molekulární mechanismus cirkadiánních biologických hodin	8
1.3.1. Octomilka (<i>Drosophila melanogaster</i>)	8
1.3.2. Ostatní zástupci hmyzu	12
2. CÍLE PRÁCE	16
3. MATERIÁL A METODY	17
3.1. Analýza genové exprese u mouchy domácí (<i>Musca domestica</i>)	17
3.1.1. Chov mouchy domácí	17
3.1.2. Získání kódujících sekvencí hodinových genů	17
3.1.2.1. Syntéza cDNA	17
3.1.2.2. Získání prvotních sekvencí studovaných genů	18
3.1.2.3. Prodloužení známých sekvencí	20
3.1.3. Získání intronů	21
3.1.4. Kvantifikace relativní hladiny mRNA hodinových genů	21
3.1.4.1. Získání materiálu	21

3.1.4.2. Odstranění genomové DNA, navržení primerů	23
3.1.4.3. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCT)	24
3.2. Měření pohybové aktivity mouchy domácí	26
4. VÝSLEDKY	27
4.1. Získání sekvencí cDNA hodinových genů	27
4.2. Měření pohybové aktivity mouchy domácí	31
4.3. Kvantifikace relativní hladiny mRNA hodinových genů v muších hlavičkách	34
4.4. Získání sekvence genu <i>cry2</i>	38
5. DISKUZE	40
5.1. Získání cDNA sekvencí hodinových genů	40
5.2. Vliv teploty na chování mouchy domácí	44
5.3. Kvantifikace genové exprese	44
6. ZÁVĚR	46
7. CITOVANÁ LITERATURA	47
8. PŘÍLOHY	55

1. ÚVOD

Všechny organismy žijící na planetě Zemi jsou vystaveny různým denním a sezónním změnám. Tyto periodické změny vznikají rotací Země kolem své vlastní osy (střídání dne a noci) a kolem Slunce (střídání ročních období) a obíháním Měsíce kolem Země (příliv a odliv). V průběhu evoluce byly všechny organismy těmto změnám vystaveny a vyvinuly si vlastní systém, jak měřit ubíhající čas a přizpůsobovat svůj vývoj, fyziologické procesy a chování aktuálním podmínkám prostředí. Systém přizpůsobení se není však jen pasivním kopírováním měnících se životních podmínek, ale je to systém vnitřních hodin, které každému živočichovi umožňuje předvídat následující změny a podle toho přizpůsobit svou životní strategii tak, aby mohl organismus úspěšně přežít.

Sezónní a denní změny provázené střídáním světla a tmy, různou délkou dne a noci (respektive světla a tmy), teplotními změnami, kdy se střídá teplejší a chladnější období ať už během dne či během celého roku, vedly k vytvoření rytmického průběhu většiny procesů v organismu. Obecně rozlišujeme rytmy ultradiánní (perioda kratší než 24h), cirkadiánní (perioda přibližně 24h, circa = přibližně, dies = den), cirkalunární (měsíční), cirkatidální (přílivové), a cirkanuánní (roční) a dále události, jež se stanou pouze jedenkrát za život, ale jsou přesně načasovány do vhodného životního období organismu (Dunlap et al., 2004).

1.1. Cirkadiánní cykly

Cirkadiánní cyklus je pozorovatelná biologická aktivita, která osciluje za konstantních vnějších podmínek s přibližnou periodou 24h a vykazuje následující vlastnosti :

- jsou endogenní, geneticky determinované s periodou okolo 24 hodin. Na rozdíl od oscilací, které jsou dány periodickými změnami prostředí, běží se stejnou periodou („free run“) v konstantních podmínkách (např. konstantní tmě)
- mohou být seřízeny nebo zrušeny stimuly vnějšího prostředí (nejvýrazněji světlem nebo teplotou). Seřízení („entrainment“) se děje každý den a zajišťuje synchronizaci vnitřních biologických hodin se změnami vnějšího prostředí
- jsou teplotně kompenzované (tzn. nezávislé na teplotě v určitém fyziologicky přijatelném teplotním rozmezí)

Milníkem ve studiu cirkadiálních rytmů je nejspíše rok 1971, kdy autoři Konopka a Benzer publikovali své výsledky v pokusech získat mutantní linii octomilek (*Drosophila melanogaster*) s abnormální charakteristikou jejich cirkadiálních rytmů. Získali tři mutantní linie. První dvě linie vykazovaly delší (přibližně 29 h) či kratší (přibližně 19 h) periodu jak pohybové aktivity tak eklozních rytmů. Třetí linie vykazovala úplnou ztrátu rytmicity v chování much. Tyto všechny 3 mutace ležely ve stejném genu pojmenovaném *period* (Konopka & Benzer 1971). Od tohoto roku bylo vypracováno mnoho studií na téma cirkadiálních rytmů. Velká část experimentů byla provedena nejdříve na octomilkách (jakožto modelovém organismu), ale později na jiných zástupcích hmyzu (Levine et al. 1995; Sauman et al. 1996; Sauman a Reppert 1996), savcích (King et al. 1997) a některé principy objevené u octomilky pomohly k identifikaci poruch cirkadiálních rytmů člověka (Toh et al. 2001; Xu et al., 2005). Dalšími úspěšnými modelovými organismy jsou *Neurospora*, *Arabidopsis* a prokaryotní řasa *Synechocystis* (Dunlap et al., 2004).

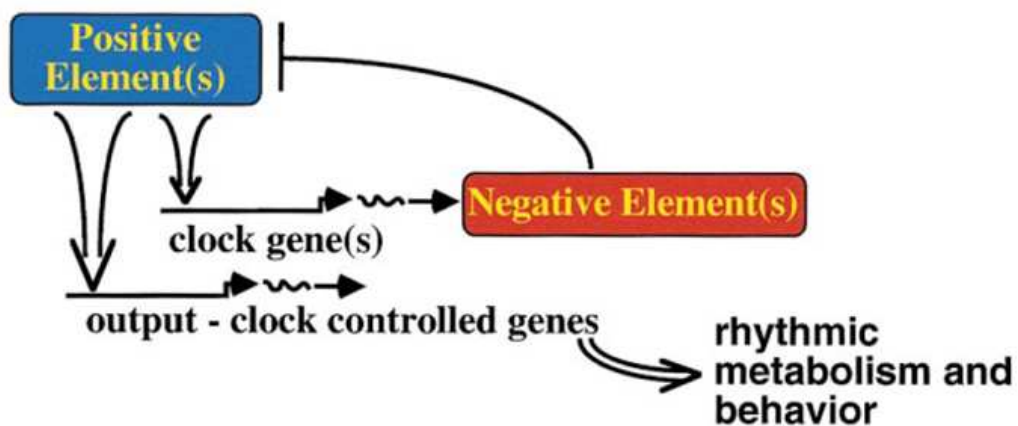
1.2. Cirkadiální biologické hodiny

Cirkadiální biologické hodiny jsou endogenním, geneticky podmíněným mechanismem. Tento mechanismus se skládá ze tří částí:

- vstupní část („input“), která zajišťuje propojení vnitřních hodin s vnějším prostředím
- hlavní oscilátor („core oscillator“ nebo „pacemaker“), který je stěžejní částí určující tempo („tikání“) biologických hodin
- výstup („output“), který zajišťuje přenos informace o vnitřním čase do zbytku těla organismu

Biologické cykly řízené těmito hodinami můžeme pozorovat na molekulární, fyziologické či behaviorální úrovni. Molekulární mechanismus hlavního oscilátoru je studován u mnoha modelových organismů, kde k nejvýznamnějším patří sinice *Synechococcus* (Kondo a Ishiura, 2000), houba *Neurospora* (McWatters et al., 1999), octomilka *Drosophila melanogaster* (Hall, 2003, Stanewsky, 2002) a myš *Mus musculus* (Hastings a Maywood, 2000). U těchto organismů byly objeveny geny, které hrají ústřední roli ve fungování cirkadiálních hodin a byl popsán mechanismus fungování cirkadiálních hodin na molekulární úrovni. Tempo cirkadiálních hodin je dáno postupnými transkripcemi, translacemi a interakcemi pozitivních a negativních elementů. Transkripce některých

cirkadiálních genů vede k translaci proteinů (negativní elementy), které nějakým způsobem blokují aktivitu pozitivních elementů, jejichž úkolem je aktivace cirkadiálních genů. Tak vzniká zpětnovazebná smyčka a realizace jedné této smyčky trvá zhruba 24 hodin. Popsané oscilace se dějí vždy na úrovni jednotlivých buněk a na molekulární úrovni nevyžadují mezibuněčné interakce. Pozitivní elementy však kromě cirkadiálních genů aktivují i geny, které nejsou pro chod cirkadiálních hodin podstatné, ale jejich produkty jsou součástí řady jiných fyziologických procesů a výsledkem je vznik cirkadiálně regulovaného metabolismu či chování (Dunlap, 1999) (obr. 1.1.).



Positive elements in circadian loops:

kai A in *Synechococcus*
 WHITE COLLAR-1 & WC-2 in *Neurospora*
 CLK & CYC in *Drosophila*
 CLOCK & BMAL1 (MOP3) in mammals

Negative elements in circadian loops:

kaiC in *Synechococcus*
 FREQUENCY in *Neurospora*
 PERIOD and TIMELESS in *Drosophila*
 PER1, PER2, PER3 (& TIMELESS?) in mammals

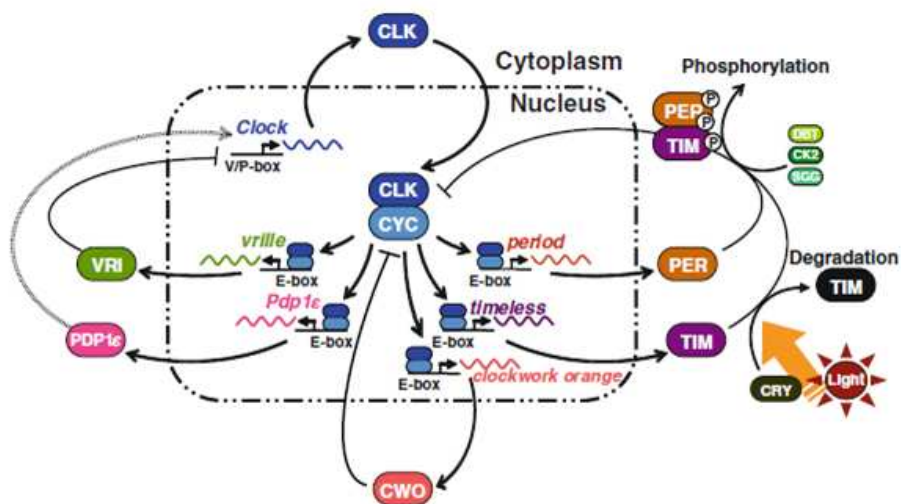
obr.1.1. Mechanismus cirkadiálních hodin (převzato - Dunlap, 1999) (podrobnosti v textu).

1.3. Molekulární mechanismus cirkadiálních biologických hodin

1.3.1. Octomilka (*Drosophila melanogaster*)

Hlavní oscilátor

Rytmicitu vytvářejí tak zvané hodinové („clock“) geny (Hardin, 2006; Sandrelli F, 2008; Tomioka a Matsumoto, 2010), přičemž v mechanismu vytvářejícím rytmicitu jsou zahrnuty minimálně tři zpětnovazebné smyčky (obr.1.2.).



obr. 1.2. Schéma ilustrující současné poznatky o molekulárních mechanismech cirkadiánních biologických hodin u octomilky. Hodiny sestávají ze tří zpětnovazebných smyček, které jsou vzájemně propojené. Oscilace má periodu přibližně 24 h (převzato - Tomioka et al., 2010)(podrobnosti uvedené v textu).

První a hlavní smyčka je tvořena geny *period* (*per*), *timeless* (*tim*), *Clock* (*Clk*) a *cycle* (*cyc*) (Hardin, 2006; Stanewsky, 2002). Transkripce genu *per* a *tim* je aktivována produkty proteinů CLK a CYC. CLK a CYC utvářejí heterodimer a váží se k promotoru (tzv. E-box) genů *per* a *tim* a zahajují jejich transkripci během odpoledne až časně noci. Koncentrace proteinů PER a TIM stoupá během noci (s maximem pozdě v noci), vytvářejí heterodimer a vstupují do jádra, kde potlačují svou transkripci inhibicí CLK-CYC heterodimeru. Výsledkem potlačení transkripce genů *per* a *tim* je snížená hladina PER a TIM, takže CLK-CYC heterodimer už není inhibován a je reaktivována transkripce genů *per* a *tim*.

Druhá zpětnovazebná smyčka se týká oscilace genu *Clk*. CLK-CYC heterodimer aktivuje transkripci genu *vrille* (*vri*) (Glossop et al., 1999). Protein VRI vstupuje do jádra a inhibuje transkripci genu *Clk* navázáním se k promotoru tohoto genu (tzv. V/P-box). V roce 2003 byl objeven aktivátor transkripce genu *Clk* (Cyran et al., 2003). Po prostudování genomu octomilky byl nalezen jeden kandidát, který byl v určitých ohledech homologní s genem *vri*, a sice gen *PAR domain protein 1* (*pdp 1*). Alternativním sestřihem a použitím různých promotorů in vivo vzniká 6 izoform tohoto genu (Reddy et al., 2000). Pouze jedna izoforma (*pdp 1ε*) vykazuje cirkadiánní oscilaci hladiny RNA. K transkripci genu *pdp 1ε* dochází s menším zpožděním oproti transkripci genu *vri*, což je pravděpodobně způsobeno menší silou vazby CLK-CYC heterodimeru k promotoru genu *pdp 1ε* nebo kratší životností jeho

mRNA. Protein PDP 1ε se pravděpodobně váže k V/P-boxu kompetitivně s VRI a aktivuje transkripci genu *Clk*. Nedávná studie však ukázala, že PDP 1ε není nezbytný pro proběhnutí smyčky v centrální nervové soustavě (Benito J et al., 2007). Role tohoto transkripčního faktoru tak musí být ještě objasněna.

Třetí smyčka je tvořena genem *clock work orange (cwo)*. Je to transkripční represor patřící do „basic helix-loop-helix ORANGE“ rodiny (Matsumoto et al., 2007; Kadener et al., 2007). Jeho transkripci aktivuje CLK-CYC heterodimer (*cwo* obasuje E-box elementy ve svém promotoru), CWO pak vstupuje do jádra, kde potlačuje svou vlastní transkripci inhibováním CLK-CYC heterodimeru. Dále také potlačuje expresi dalších hodinových genů (např. *per* a *tim*) pomocí E-box elementů. Tato negativní smyčka přispívá k udržení cirkadiánní oscilace s vysokou amplitudou.

Přesné tempo molekulárních oscilací je také udržováno díky posttranslačním modifikacím hodinových genů (fosforylací)(Hardin, 2006; Bae et al., 2006; Weber, 2009). Například cyklování v aktivaci a inhibici CLK/CYC je paralelní k cyklování míry fosforylace (Weber et al., 2006). U octomilky bylo objeveno několik genů, které ovlivňují fosforylaci a tím i biologické hodiny. Patří mezi ně například gen *doubletime (dbt)* (Kloss et al., 1998; Price et al., 1998; Kivimäe et al., 2008; Grima et al., 2002; Ko et al., 2002; Cyran et al., 2005), ortholog lidské *casein kinase 1ε (ck 1ε)*. A dále *casein kinase 2 (ck2)*(Preece et al., 1998; Lin et al., 2002; Akten et al., 2003). Fosforylace nejspíše reguluje načasování vstupu PER a TIM do jádra buňky (Cyran et al., 2005; Meyer, 2006) a stabilitu PER molekuly (Kiwimae et al., 2008; Grima et al., 2002; Ko et al., 2002). DBT interaguje s PER a do jádra vstupuje spolu s heterodimerem PER-TIM (Kloss et al., 2001). V jádře dochází k další fosforylaci PER (pravděpodobně opět působením DBT). Maximální fosforylace PER v jádře trvá několik hodin pravděpodobně proto, že zde působí proteinová fosfatáza 2A (PP2A), která PER defosforyluje (Sathyanarayanan et al., 2004). Dalším substrátem pro DBT a PP2A je transkripční faktor CLK, jehož aktivita se po fosforylaci snižuje (Kim a Edery, 2006; Yu et al., 2006). Další funkcí PER proteinu tedy je přinést DBT do jádra buňky, kde potom může fosforylovat protein CLK a inaktivovat tak jeho funkci. Hyperfosforylace PER již v cytozolu vede k jeho rychlé degradaci v proteazomu (Grima et al., 2002; Ko et al., 2002). Na hyperfosforylovaný PER se naváže molekula Slimb a ubiquitin-proteázomovou drahou dojde k jeho degradaci.

Vstupní dráha cirkadiálních biologických hodin („INPUT PATHWAY“)

Synchronizace cirkadiálních hodin s okolním prostředím se nejvíce děje pomocí světla. U několika zástupců hmyzu byly identifikovány fotoreceptory důležité pro seřízení („entrainment“) biologických hodin. U octomilky je nejdůležitějším fotoreceptorem složené oko (stejně tak i u hemimetabolitních druhů hmyzu - šváb, cvrček) (Tomioka et al., 1984; Loher, 1972), dále ocelli, Hofbauer-Buchner (H-B) očko (pozůstatek po larválním oku) a tzv. „blue light“ fotoreceptory molekuly CRY1 (Helfrich-Förster et al., 2002).

Hodinovým genem, který má důležitou roli ve světelném seřízení („entrainment“) cirkadiálních rytmů je *cryptochrome1 (cry1)* (Stanewsky et al., 1998; Ishikawa et al., 1999; Dolezelova et al., 2007; Yoshii et al., 2008). Tento gen patří do rodiny fotolyáz. Protein CRY1 se pravděpodobně po změně své konformace (indukované světlem) váže k TIM, degraduje tuto molekulu a tím znehodnocuje funkci TIM-PER komplexu ve zpětnovazebné smyčce biologických hodin (Ceiani et al., 1999). Bylo dokázáno, že degradace TIM molekuly se odehrává pomocí ubiquitin-proteázomové dráhy (Naidoo et al., 1999).

Dalším důležitým genem zapojeným do světlem indukované synchronizace cirkadiálních hodin je *jet (jetlag)* (Koh et al., 2006). Protein JET je součástí E3 ubiquitin ligázového komplexu a způsobuje degradaci TIM a CRY molekul. Po světlem indukované interakci proteinů TIM a CRY1 se JET naváže na vzniklý komplex a dojde k rychlejší degradaci TIM a CRY molekul. Degradace TIM je touto cestou rychlejší (Peschel et al., 2006; Peschel et al., 2009).

Světlo je nejsilnějším stimulem, který seřizuje cirkadiální hodiny. Za konstantní tmy ale hrají úlohu i další faktory, zejména změny teploty. Periodické změny teploty v rozsahu větším než 3°C dokáží synchronizovat cyklickou expresi cirkadiálních genů i rytmické chování octomilek (Glaser a Stanewsky, 2005; Sehadova et al., 2009).

Teplota také ovlivňuje expresi některých cirkadiálních genů. Molekulární mechanismy tohoto procesu byly zkoumány zejména na úrovni transkripce, pozorován byl alternativní sestřih genu *per* za různých teplot (Citri et al., 1987; Majercak, 2004; Collins et al., 2004; Low et al., 2008). Také hladina mRNA tohoto genu se mění v závislosti na teplotě prostředí. Například hladina mRNA genu *per* u octomilky se zvyšuje dříve za nižších teplot (Low et al., 2008).

Výstupní dráha cirkadiánních hodin („OUTPUT PATHWAY“)

Nejlépe prostudovanou molekulou zahrnutou ve výstupní dráze cirkadiánních hodin je PDF (pigment-dispersing factor, či pigment dispersing hormone). Jeho působení v této dráze bylo odhaleno, když se ukázalo, že PDF se vyskytuje v některých neuronech spolu s PER molekulou (Forster et al., 1995). Exprese *pdf* genu u octomilky nevykazuje žádný cirkadiánní rytmus (Park et al., 2000), zatímco dorsomediální konce neuronů, exprimujících PDF vykazují denní morfologické změny pravděpodobně kontrované cirkadiánními hodinami (Fernandez et al., 2008). Po získání mutantních linií octomilek, které postrádaly PDF, byly provedeny pokusy, které u much umístěných do LD podmínek ukázaly na posun nejvyšší aktivity much o 1 hodinu a u much umístěných do DD podmínek byla pozorována ztráta rytmicity po několika dnech (Renn et al., 1999).

1.3.2. Ostatní zástupci hmyzu

Pokroky ve studiu molekulárních mechanismů cirkadiánních rytmů u octomilky podnítily studování molekulární podstaty biologických hodin u ostatních zástupců hmyzu (přehledně zpracováno například v Sandrelli et al., 2008; Tomioka a Matsumoto, 2010; Hall, 2003). Velká část prací byla zpočátku zejména popisného rázu, to znamená zaměřená na zjištění sekvencí (Reppert et al., 1994) a lokalizaci genových produktů (Fleissner et al., 1993; Frisch et al., 1996; Zavodska et al., 2003). Velikost některých druhů hmyzu též umožnila chirurgické zákroky cílené na určení anatomických struktur potřebných pro funkci cirkadiánních hodin (Sokolove, 1974; Truman, 1972). Následovaly pokusy ukazující, že geny objevené u různých druhů hmyzu mohou zachránit mutaci v octomilce a jsou tedy i funkčními homology (Levine et al., 1995; Piccin et al., 2000). V poslední době jsou k pochopení funkce cirkadiánních hodin používány metody reverzní genetiky (Lee et al., 2009; Sakamoto et al., 2009; Moriyama et al., 2009; Kamae et al., 2010).

Lepidoptera (motýli)

Nejlépe prostudovaným molekulárním mechanismem cirkadiánních hodin u hmyzu řádu Lepidoptera je mechanismus u martináče dubového (*Antheraea pernyi*), dále motýl monarcha (*Danaus plexippus*) a bourec morušový (*Bombyx mori*).

V roce 1994 začal výzkum martináče klonováním genu *period* (Reppert et al., 1994). Srovnáním sekvencí genu *period* u *A. pernyi* a *D. melanogaster* bylo nalezeno několik konzervovaných oblastí genu. Byla také potvrzena oscilace hladiny *per* mRNA během dne v hlavě martináče. Byl-li gen *period* z martináče transformován do arytmičky se chovající *per*⁰ *D. melanogaster*, dokázal obnovit její rytmické chování s tím, že plně přejal roli chybějícího *DmPER*, vstupoval do jádra a tam fungoval jako negativní regulátor své vlastní transkripce (Levine et al., 1995). Tyto výsledky ukázaly, že PER je nejen strukturní, ale i funkční homolog genu *period* u *D. melanogaster*. V souladu s modelem *Drosophila* je i regulace proteinu PER ve fotoreceptorových buňkách *A. pernyi* – množství proteinu PER osciluje během dne, PER je přítomen v jádrech fotoreceptorových buněk a mezi maximální hladinou *per* mRNA a PER je 4-6ti hodinová prodleva (Reppert et al., 1994).

V mozku martináče však byla nalezena naprosto odlišná regulace proteinu PER a jeho partnera proteinu TIM. Na rozdíl od octomilky, kde probíhá exprese PER a TIM ve velkém množství neuronů a stovkách gliálních buněk (Ever et al., 1992; Frisch et al., 1994), byla exprese proteinu PER a TIM u martináče prokázána jen v 8 neurosekrečních buňkách (Šauman a Reppert, 1996). Ty se nachází v oblasti dorso-laterálního protocerebra, které bylo již dříve identifikováno jako centrum cirkadiálních hodin (Truman, 1974). Imunocytohistochemie s protilátkami anti-PER a anti-TIM odhalila, že tyto proteiny nevstupují do jádra buňky a zůstávají v cytoplazmě (Šauman et al., 1996). Výhradně cytoplazmatická exprese genu PER však byla potvrzena i u bource (*Bombyx mori*) (Sehadová et al., 2004) a i u několika dalších zástupců čeledi *Sarurniidae* (Šauman a Reppert, 1996) a dále u švába (*Blattella germanica*) (Wen et al., 2008). Ovšem použití metody imunocytohistochemie vnáší do výsledků těchto pokusů určitou nejistotu. Protilátky jsou vyrobeny proti antigenu z jiného živočišného druhu a kontrola jejich specifity je limitována například tím, že neexistuje žádná negativní kontrola (nulový mutant). Navíc je tato metoda do jisté míry limitována svou citlivostí.

U martináče by mohla být za původce rytmicity považována rytmicky exprimovaná antisense RNA genu *per* místo negativní zpětné vazby (Šauman et al., 1996). Tento antisense transkript byl nalezen pouze v 8 neurosekrečních buňkách v mozku *A. pernyi*, což naznačuje, že je součástí mechanismu cirkadiálních hodin. Byl navržen model, jak by se antisense mRNA mohla podílet na vzniku oscilace hladiny PER v cytoplazmě (Šauman et al., 1996; Sassone-

Corsi, 1998). Antisense *per* mRNA by mohla hybridizovat se sense *per* mRNA a blokovat její funkci, a vzhledem k tomu, že vůči sense *per* mRNA osciluje s opačnou fází, vytvářela by se tak oscilující hladina proteinu PER. Proti tomuto modelu stojí pozdější studie (Gotter et al., 1999), která ukázala, že gen *period* je lokalizován na pohlavním chromozomu Z a antisense *per* mRNA má původ v odděleném lokusu na druhém pohlavním chromosomu W a nachází se tedy výhradně u samic. Vyloučila se tak jeho role v řízení cirkadiálních hodin, neboť u samců (ZZ) se antisense RNA nenachází. Stále je ovšem možné, že se účastní regulace pohlavně specifického samičího cirkadiálního chování. Gotter se domnívá, že pozorované oscilace sense *per* mRNA mohou být výsledkem jiných posttranskripčních mechanismů podobným těm, které známe u *D. melanogaster* (So et al., 1997; Suri et al., 1998) s tím, že autoinhibiční funkce PER-TIM dimeru bude nahrazena nějakými jinými komponenty, které budou vstupovat do jádra.

Možným represorem transkripční aktivity CLK-CYC by mohl být protein CRY, speciálně CRY2, u kterého byla prokázána tato schopnost in vitro u buněčných kultur motýla *Danaus plexipus* (Zhu et al., 2008). Molekulárně-evoluční studie ukázaly, že duplikace a ztráty tohoto genu vyústily ve tři možnosti exprese genu *cry* (Yuan et al., 2007). U některých druhů hmyzu je přítomný buď gen *cry1* (*cry* typu *Drosophila*) nebo gen *cry2* (savší typ genu), u některých druhů jsou přítomny oba typy genu (Tomioka et al., 2010). Například u včely (*Apis mellifera*) vůbec neexistuje *tim* v genomu a je přítomný CRY2, který je považován za transkripční represor CLK-CYC (Rubin et al., 2006).

Diptera - Moucha domácí (*Musca domestica*)

Jelikož byly studiem martináče odhaleny nesrovnalosti v řízení cirkadiálních rytmů u hmyzu, bylo nutné shromáždit větší množství dat o fungování cirkadiálních hodin u různých druhů hmyzu a následně provést srovnávací studie, které objasní otázky vzniklé při studiu dvou evidentně odlišných mechanismů řízení cirkadiálních hodin u *Drosophila melanogaster* a *Antheraea pernyi*. Jako další byla vybrána moucha domácí, jelikož patří spolu s octomilkou do řádu dvoukřídlých (Diptera, Cyclorrhapha). I přes tuto relativně blízkou příbuznost byly opět nalezeny odchylky od modelu *Drosophila* (Codd et al., 2007). K oscilaci mRNA hladin genů *per* a *tim*, *vri*, *Clk* a *cyc* v buňkách mozku mouchy domácí dochází s podobnou fází jako u octomilky za LD i DD podmínek, v LL podmínkách se stávají arytmičnými, k oscilaci hladin

mRNA genu *cry* u mouchy domácí nedochází (Codd et al., 2007). MdPER obnoví rytmy u *per*⁰ mutantní linie octomilek (Piccin et al., 2000) jako u PER martináče. Analýza exprese tohoto genu v mouše domácí ale ukázala, že množství proteinu PER v celých hlavách mouchy během dne necykluje a PER je stabilní i v konstantním světle. Detailní analýza exprese v mozku ukázala, že ve většině buněk mozku PER není lokalizová v jádře a že PER a TIM kolokalizují spíše vzácně (Codd et al., 2007). U mouchy domácí nebyla na rozdíl od martináče potvrzena přítomnost antisense *per* mRNA. Tyto výsledky potvrzují, že i u mouchy domácí, druhu blízce příbuzného octomilce, existuje evoluční flexibilita ve způsobu jak zkonstruovat smyčku s negativní zpětnou vazbou. Nabízí se tak otázky: **do jaké míry jsou konzervované další zpětnovazebné smyčky? Má PER a TIM u mouchy stejnou roli jako u octomilky? Představoval by jiný mechanismus v regulaci cirkadiálních hodin nějakou výhodu pro mouchu domácí?** Proto jsem se rozhodla detailně popsat další geny účastnící se řízení cirkadiálních rytmů mouchy domácí.

2. CÍLE PRÁCE

- 1) Nejprve získat z mouchy domácí kódující úseky následujících genů: *cwo* (*clock work orange*), *pdh* (*pigment dispersing hormone*), *pdp 1ε* (*par domain protein 1ε*), *ck 1ε* (*casein kinase 1ε*), *ck 2β* (*casein kinase 2β*) a změřit množství těchto transkriptů
- 2) Zjistit, jak teplota ovlivňuje chování mouchy domácí
- 3) Určit vliv teploty na expresi studovaných genů

3. Materiál a metody

3.1. Analýza genové exprese u mouchy domácí (*Musca domestica*)

3.1.1. Chov mouchy domácí

Pro experimenty jsme používali dospělé mouchy domácí (*Musca domestica*) typů *apterus* a *white*. Mouchy byly chovány za standardních podmínek (Hediger et al., 2001) ve světelném režimu 12 hodin světla 12 hodin tmy při konstantní teplotě 25°C. Jako potrava dospělců sloužila směs sušeného mléka a cukru. Larvy se vyvíjely ve směsi pšeničných otrub s mlékem doplněné nipaginem (proti plísním).

3.1.2. Získání kódujících sekvencí hodinových genů

Studované geny byly získány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) na základě předpokládané podobnosti se známými homology jiných organismů. Jednalo se o následující geny: *cwo* (*clock work orange*), *pdh* (*pigment dispersing hormone*), *pdp 1ε* (*par domain protein 1ε*), *ck 1ε* (*casein kinase 1ε*), *ck 2β* (*casein kinase 2β*) a *cry2* (*cryptochrome2*).

3.1.2.1. Syntéza cDNA

Nejprve byla izolována RNA pomocí TRI-reagent® (Ambion) podle příslušného protokolu a její kvalita byla ověřena na denaturačním agarózovém gelu (1% SeaKem LE agaróza v 1x MOPS). Z celkové RNA (2-5 µg) byla poté přepsána cDNA pomocí Superscript™ III reverzní transkriptázy (Invitrogen) a TRIK primeru (cílová koncentrace 1 µM) dle protokolu od výrobce transkriptázy.

TRIK primer (5' GAGCAAGTTCAGCCTGGTTATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3') zajistí, že všechny cDNA obsahují na začátku (odpovídajícímu 3' konci mRNA) specifickou kotvu primeru (podtržená část). Směs RNA, dNTP's (každý nukleotid 200mM) a primeru (1 µM) jsem doplnila do 20 µl DEPC ošetřenou vodou (inkubace 65°C, 5min). Ke směsi jsem poté přidala 4 µl 5x First Strand pufru pro Superscript™ III reverzní transkriptázu [250 mM Tris-HCl (pH 8.3v pokojové teplotě), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂] a 1 µl 0,1 M DTT a reakci inkubovala 2 min v 50 °C. Poté jsem do směsi přidala 1 µl Superscript™ III reverzní

transkriptázy (200U/μl). Reverzní transkripce probíhala 50 min při 50 °C a následně byla reverzní transkriptáza inaktivována (inkubace 10 min, 70 °C).

3.1.2.2. Získání prvotních sekvencí studovaných genů

Srovnání známých homologních sekvencí genů (aminokyselinové sekvence) z ostatních organismů (myš, octomilka, komár) umožnilo navrhnout genově specifické degenerované primery. Zejména bylo důležité, aby byl daný úsek genu konzervovaný (podobný u více organismů, hlavně u zástupců hmyzu) a aby tyto úseky obsahovaly převážně aminokyseliny, kterým odpovídá málo kodónů (ideálně methionin a tryptofan). V navrženém primeru pak byly použity všechny kodony odpovídající dané aminokyselině - jednalo se tedy většinou o směs primerů. V některých případech jsme namísto všech čtyř bazí zvolili použití inosinu. Při pokusu získat gen *cryptochrome2* byly primery navrhovány tak, aby sice odpovídaly konzervovaným úsekům v hledaném genu (*cry2*), ale zároveň aby se jednalo o místa, ve kterých se neshodují se sekvencí *cryptochrome1* (obr. 3.1.). Obvykle jsem se snažila navrhnout dvojici primerů tak, aby byl produkt v rozmezí od 200 do 400 nukleotidů. Velikost produktu jsme omezili z důvodu, že při použití degenerovaných primerů někdy dochází ke vzniku více produktů a je tedy výhodou, když dokážeme eliminovat ty nespecifické na základě špatné velikosti.

							*	*																		
cry2 rev1																										
Apis cry	L	L	H	G	L	L	F	F	F	C	A	A	N	S	F	M	G	S	I	C	V	I	I	L	L	
Culex cry2	L	L	H	G	L	L	F	F	F	C	A	A	N	S	F	M	G	S	I	C	V	I	I	L	L	
Rattus cry	L	L	H	G	L	L	F	F	F	C	A	A	N	S	F	M	G	S	I	C	V	I	I	L	L	
Tribolium cry	L	L	H	G	L	L	F	F	F	C	A	A	N	S	F	M	G	S	I	C	V	I	I	L	L	
Drosophila cry	G	A	I	G	L	I	F	F	F	M	V	N	V	A	L	S	N	L	G	I	C	L	I	I	L	L
Anopheles cry1	G	A	I	G	L	I	F	F	F	M	V	N	V	A	L	S	N	L	G	I	C	L	I	I	L	L
Danaus cry1	G	A	I	G	L	I	F	F	F	M	V	N	V	A	L	S	N	L	G	I	C	L	I	I	L	L
Antheraea cry1	A	F	I	G	L	I	F	F	F	M	V	N	V	A	L	S	N	L	G	I	C	L	I	I	L	L

obr. 3.1. Příklad navrhování degenerovaných primerů pro gen *cry2*. První řádek - vybraný úsek, kterému odpovídala sekvence navrženého primeru. Pod ním srovnány následující proteinové sekvence: CRY2 („savčí typ“): *Apis cry* (EF117814), *Culex cry2* (XM_001869421), *Rattus cry* (AY040223), *Tribolium cry* (EF117815); CRY1 („typ *Drosophila*“): *Drosophila cry* (NM169852), *Anopheles cry1* (DQ219482), *Danaus cry1* (AY860425), *Antheraea cry1* (AF333998).

S takto navrženými primery byla provedena polymerázová řetězová reakce (PCR) na přístroji XP cyclor (Bioer). K amplifikaci jsme používali polymerázy Taq HS nebo Ex Taq HS

(Takara) podle návodu výrobce (cílová koncentrace 4 jednotky na 100 μ l reakce, dNTPs 200 μ M každý nukleotid, 1x pufr - 100 mM Tris-HCl (pH 8,8 při 25 $^{\circ}$ C), 500 mM KCl, 1% Triton X-100, 15 mM MgCl₂, primery 0,4 μ M). Vzhledem k tomu, že primery byly často hodně degenerované, využila jsem metody *touch down* PCR (R.H. Don et al., 1991; K.H. Hecker et al., 1996). Po počáteční denaturaci (96 $^{\circ}$ C, 2 min) následovalo 25 cyklů s denaturací (96 $^{\circ}$ C, 30 s), nasedáním primerů (58 $^{\circ}$ C po dobu 30 s v prvním cyklu, s každým cyklem teplota klesla o 0,5 $^{\circ}$ C) a elongací (72 $^{\circ}$ C, doba určena předpokládanou velikostí produktů). Po těchto 25 cyklech se snižující se teplotou nasedání primerů (proto *touch down*) následovalo dalších 25 cyklů: denaturace (96 $^{\circ}$ C, 30 s), nasedání primerů (50 $^{\circ}$ C, 30 s) a elongace (stejná teplota i čas elongace jako v prvních 25 cyklech). Reakce byla dokončena v 72 $^{\circ}$ C po dobu 10 minut.

Následně byla část vzniklého produktu analyzována pomocí gelové elektroforézy. Pro rozdělení krátkých produktů (do 400 bází) množených degenerovanými primery se mi nejvíce osvědčilo použití hustého agarozového gelu (2 % SeaKem agaróza nebo 3-4 % Nusieve agaróza v 1x TAE) obarveného pomocí GelRedTM 10 000x roztoku (Biotium). Pro zjištění velikosti byl použit standart 1 kb plus ladder (InvitrogenTM).

Pokud gelová elektroforéza potvrdila předpokládanou velikost a kvalitu (pouze jeden proužek) PCR produktu, DNA byla přečištěna přímo ze zbývající PCR reakce (MinElute PCR Purification kit, Qiagen). Pokud elektroforéza potvrdila předpokládanou velikost produktu, ale kvalita produktu nebyla dostatečná (více proužků), byl všechen produkt elektroforeticky rozdělen a jen požadovaný proužek byl z gelu vyříznut a následně vyčištěn pomocí QIAEX[®]II Gel Extraction Kit (Qiagen) nebo MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen).

Takto vyčištěné produkty byly zaligovány pomocí T4 DNA ligázy (Roche) do vektoru pGem[®]-T Easy (Promega) nebo vektoru Bluescript KS⁻ (Stratagene) štěpeném enzymem EcoRV a dosyntetizovanými jednobázovými T-přesahy (Bajgar and Doležel technologies). Plazmidy pak byly transformovány do *Escherichia coli* (DH5 α nebo XL-1) a ty následně vysety na misky obsahující X-gal (20 μ l/ml). Na základě modrobílé selekce byly vybrány kolonie s plazmidy obsahujícími inzerty. Velikost inzertu byla potvrzena pomocí PCR (univerzální primery M13 forward a M13 reverse). Pozitivní kolonie byly napěstovány v 3 ml LB média a následně byla vyzolována plazmidová DNA pomocí High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche). Sekvence inzertů pak byla určena sekvenováním s použitím univerzálních primerů (firma

Macrogen). Kvalita chromatogramů byla posouzena pohledem, ze sekvencí byly odstraněny úseky odpovídající plazmidu a pouze úsek odpovídající inzertu byl srovnán programem BLAST (blastx) s databází v genové bance.

3.1.2.3. Prodloužení známých sekvencí

Pokud se podařilo získat pomocí degenerovaných primerů krátký úsek žádaného genu, bylo potřeba jej prodloužit. Používali jsme k tomu buď „Rapid Amplification of cDNA Ends“ (RACE) nebo „primer walking“. V případě metody „primer walking“ byl navržen genově specifický primer (programem OligoAnalyzer zkontrolováno, jestli primer netvoří homoduplexy či smyčky) a k němu do dvojice degenerovaný primer (umístěný takřka v jakékoli vzdálenosti, navržený proti předpokládaným konzervovaným úsekům genu; primer walking byl použit k rozšiřování sekvencí směrem jak k 5' tak ke 3' koncům cDNA).

Následovala PCR (podmínky jako při použití dvojice degenerovaných primerů). V některých případech byly podmínky PCR upraveny v závislosti na výsledcích pokusů (nejčastěji zvýšení teplot nasedání primerů – tzn. teplota nasedání primerů prvního cyklu *touch down* PCR byla vyšší).

Při použití metody 3'- Rapid Amplification of cDNA Ends (3'- RACE) byla nejprve z celkové RNA (2-5 µg) vyrobena cDNA s použitím primeru TRIK a SuperscriptTM III reverzní transkriptázy (Invitrogen, viz. kapitola 3.1.2.1.). Následovala PCR s použitím genově specifického primeru (forward) v kombinaci s reverzním primerem F3 (5'GAGCAAGTTCAGCCTGGTT 3' -odpovídá začátku primeru TRIK použitého při syntéze cDNA), který nasedá na konce všech cDNA. Pokud bylo produktu po této první PCR málo, byl tento produkt 100x naředěn v MilliQ vodě a 1 µl takto naředěného templátu byl použit v „nested PCR“ s primerem F3 v kombinaci s druhým (vnitřním) genově specifickým forward primerem.

Metodu 5'- Rapid Amplification of cDNA Ends (5'- RACE) jsem provedla pomocí FirstChoice[®] RLM-RACE Kitu (Ambion). Postupovala jsem přesně dle návodu.

Produkty RACE PCR a primer walking PCR byly rozděleny na gelu – obvykle 0,8-1,5 % (Seakem LE agaróza v 1x TAE). DNA byla izolována z gelu nebo byly produkty přímo přečištěny v závislosti na jejich kvalitě. Pokud bylo produktu velké množství (řádově stovky

ng) a jednalo se pouze o jeden produkt, byla DNA sekvenována přímo (Macrogen) s použitím genově specifického primeru. U menšího množství produktu a zejména u produktů velkých několik kilobází bylo nutné je nejprve zaklonovat (viz kapitola 3.1.2.) a poté sekvenovat univerzálními a následně vnitřními (genově specifickými) primery.

Všechny sekvence genů byly pomocí programu EditSeq (Lasergene) translatovány a výsledné proteiny pak srovnány se známými homology z jiných živočichů (pomocí programu MEGA 4, Clustal W).

3.1.3. Získání intronů

Pro analýzu v reálném čase je užitečné znát sekvenci genu i s příslušnými introny (viz kapitola 3.1.4.2.). Proto byla vyizolována genomová DNA (DNeasy Blood&Tissue Kit, Qiagen) a následně použita jako templát pro PCR s dvěma genově specifickými primery. Paralelně též proběhla reakce se stejnými primery, ale s teplátem cDNA. Následně byly délky produktů porovnány při elektroforéze a pokud byl produkt z genomové DNA delší, byl osekvenován. Srovnáním této sekvence se sekvencí cDNA byl pak určen intron.

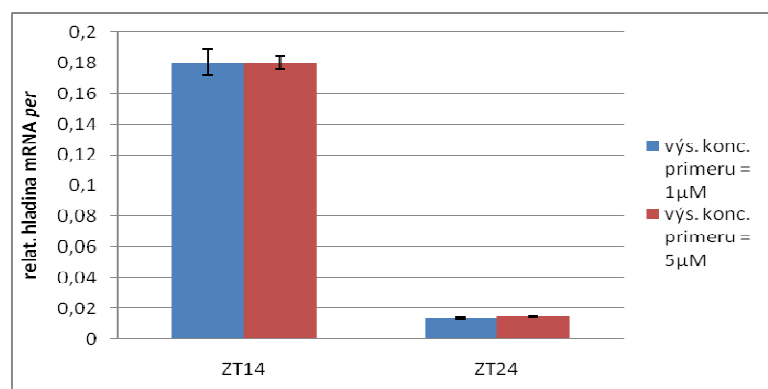
3.1.4. Kvantifikace relativní hladiny mRNA hodinových genů

3.1.4.1. Získání materiálu

Experimentální zvířata byla nejprve synchronizována v příslušném režimu po dobu 4 dní (pro 35 °C) až jednoho týdne (25 °C, 17 °C), přičemž fotoperioda 12 hodin světla a 12 hodin tmy byla zachována (včetně začátku dne) v souladu s režimem v chovném boxu. Pro snazší manipulaci jsem používala linii s mutacemi *white* a *apterous* – tyto bezkřídle bělooké mouchy není nutné uspávat a tyto mutace zároveň neovlivňují cirkadiální chování (Codd et al., 2007). Zvířata byla rozdělena po 25 – 30-ti kusech do 0,5 l kelímků s krmením a vodou, samci a samice zvlášť. Jedinci byli odebíráni z inkubátoru s režimem 12 hodin světlo – 12 hodin tma nebo z inkubátoru, kde byla stále tma. Při režimu 12 hodin světlo – 12 hodin tma (LD pokus) odpovídá ZT 0 (zeitgeber time 0) době, kdy se světlo v inkubátoru rozsvítí a ZT 12 době, kdy se zhasíná. Jedinci z režimu stálé tmy byli odebráni první den konstantní tmy (DD), CT 0 (circadian time 0) odpovídalo času, kdy se v podmínkách 12 hodin světlo – 12 hodin tma

obvykle rozsvěcelo. V obou světelných režimech (a ve všech třech teplotách) byli jedinci odebíráni každé dvě hodiny. Nejprve byly mouchy usmrceny vysypáním na suchý led a následně byly sebrány hlavičky vždy po 20ti kusech do mikrozkuvek, které byly následně uskladněny v -80°C.

Poté byla ze zmražených muších hlaviček odebraných v jednotlivých časech vyizolována RNA (kapitola 3.1.2.1.). Její kvalita byla elektroforeticky ověřena a z 1 µg RNA byla reverzní transkripcí syntetizována cDNA (kapitola 3.1.2.1.), a to buď přímo nebo jsem RNA ještě před syntézou cDNA ošetřila DNázou (kapitola 3.1.4.2.). Syntetizovaná cDNA byla poté 100x zředěna a použita pro stanovení relativní hladiny mRNA v každém vzorku. V pilotním pokusu jsem nejprve otestovala, jestli má na následnou kvantifikaci genu (kapitola 3.1.4.3.) vliv koncentrace primeru použitého při reverzní transkripci. K pokusu jsem si vybrala kvantifikaci genu *period*, jelikož je u něj známé cyklování jeho hladiny během dne u mouchy domácí (Codd et al., 2007). Použila jsem vzorky RNA vyizolované z hlaviček much odebraných v časech ZT 14 (relativní hladina mRNA je nejvyšší) a ZT 24 (relativní hladina mRNA je nejnižší). K syntéze cDNA jsem použila dvě různé konečné koncentrace primeru TRIK (1 µM a 5 µM) (obr. 3.2.). Výsledek tohoto pokusu ukázal, že koncentrace TRIK primeru používaného při reverzní transkripci není kritická pro přesnost následné kvantifikace, a proto jsem v dalších pokusech používala primer o výsledné koncentraci 1 µM.

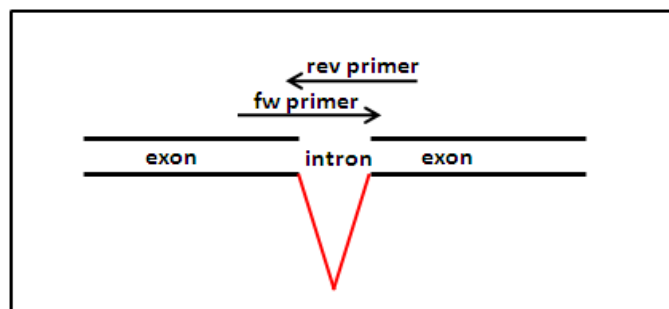


obr. 3.2. Vliv koncentrace primeru použitého při reverzní transkripci na kvantifikaci relativní hladiny mRNA hodinových genů. Výsledné sloupce jsou průměrem čtyř opakování v rámci jednoho pokusu. Vyznačené odchylky udávají, jak moc se od sebe jednotlivé naměřené hodnoty lišily.

3.1.4.2. Odstranění genomové DNA, navržení primerů

Abych mohla kvantifikaci hodinových genů správně vyhodnotit (tzn. abych stanovila pouze relativní hladinu mRNA), musela jsem nejprve vyloučit případnou kontaminaci genomové DNA ve studovaných vzorcích.

Nejčastěji byly použity primery, které nasedají specificky pouze na cDNA a nikoli na genomovou DNA. Takový primer přemostňuje intron (obr. 3.3., tab.3.1.). Specifita primerů byla otestována na cDNA a paralelně potvrzeno, že z genomové DNA žádné produkty nevznikají.



obr. 3.3. Jeden ze způsobů navrhování primerů použitých při RT-PCR – primery přemostující intron.

Alternativně jsem se případné genomové DNA zbavila pomocí DNázy (měření *casein kinase 1 epsilon*) (tab.3.1.). Používala jsem TURBO DNázu a k její inaktivaci TURBO DNase inactivation reagent (TURBO DNA-freeTM Kit, Ambion), postupovala jsem dle návodu výrobce. Následně bylo použito malé množství takto ošetřené RNA jako templát v PCR a potvrzeno, že DNA byla skutečně odstraněna (tzn. nevznikaly žádné produkty). Až poté byla RNA použita pro reverzní transkripci.

V jednom případě jsem používala primery umístěné kolem přibližně 3 kb velkého intronu (Codd *et al.* 2007) (tab.3.1.), v tom případě pak z genomové DNA takto velké produkty při použitých podmínkách vůbec nevznikají. Protože jsem používala rychlejší cycler (Biorad C1000TM Thermal Cycler), než jaký byl použit v předešlé studii (Codd *et al.*, cycler Corbett), otestovala jsem specifitu primerů na cDNA a paralelně potvrdila, že z genomové DNA produkty při mnou používaných podmínkách nevznikají.

Pro gen *per (period)*, u kterého jsem se také zabývala sestřihem intronu č. 11 (3' terminální intron v translatované oblasti genu), jsem navrhla dva páry primerů, přičemž

jeden reverse byl navržený tak, aby přemostoval tento intron a druhý reverse byl navržen tak, aby nasedal na templát, který intron obsahuje (obr. 4.6.A).

tab. 3.1. Informace o primerech použitých při RT-PCR.

Genově specifické primery použité při Real-Time PCR				
transkript	primer	sekvence primeru ¹	velikost produktu (bp)	teplota nasedání (°C)
<i>rp49</i>	rp49 fw	████████████████████	123	58-62
	rp49 rev	████████████████████		
<i>clock work orange</i>	cwo fw	████████████████████	166	60
	cwo rev	████████████████████		
<i>pigment dispersing hormone</i>	pdh fw	████████████████████	254	62
	pdh rev	████████████████████		
<i>casein kinase 2 beta</i>	ck2beta fw	████████████████████	291	60
	ck2beta rev	████████████████████		
<i>par domain protein 1 epsilon</i>	pdp fw	████████████████████	128	60
	pdp rev	████████████████████		
<i>period</i> ²	per fw1	████████████████████	118	60
	per rev1	████████████████████		
<i>period varA</i>	per fw2	████████████████████	319	60
	per rev2	████████████████████		
<i>period varB</i>	per fw1	████████████████████	235	60
	per rev3	████████████████████		
<i>timeless</i> ²	tim fw1	████████████████████	118	60
	tim r1	████████████████████		
<i>casein kinase 1 epsilon</i> ³	dbt fw	████████████████████	164	58
	dbt rev	████████████████████		

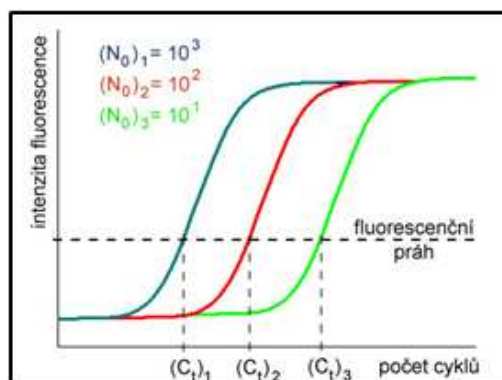
¹ pozice intronu je označena ^

² primery dle V.Codd et al., 2007

³ nenalezen intron – vyizolovaná RNA byla ošetřena Dnázou

3.1.4.3. Polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RT-PCR)

Při metodě RT-PCR matematické modely pracují s hodnotou zvanou C_t („threshold cycle“), která se rovná cyklu, kdy amplifikační křivka překročí fluorescenční práh umístěný do exponenciální fáze reakce. Zároveň platí, že čím vyšší je počáteční obsah templátu, tím dříve dojde k překročení fluorescenčního prahu v PCR reakci (obr. 3.4.).



obr. 3.4. RT-PCR. Hodnota C_t se rovná cyklu, kdy amplifikační křivka překročí fluorescenční práh, který je umístěn v exponenciální fázi reakce – vyznačeno na obrázku. K překročení fluorescenčního prahu dojde tím dříve, čím větší je na počátku reakce obsah templátu. N_0 – obsah templátu na počátku reakce.

RT-PCR byla provedena pomocí přístroje C1000TM Thermal Cycler (Bio-Rad) v 96-ti jamkové mikroděstičce (Bio-Rad Hard-Shell®). 3 μ l 100x zředěné cDNA byly použity jako templát v 12 μ l RT-PCR reakci (IQTM SYBR®Green Supermix, 1x konc. – Bio-Rad, 0,4 μ M primery, milliQ H₂O). Namnožení produktů probíhalo dle následujícího protokolu: predenaturace 95 °C, 3 min; následovalo 40 cyklů: denaturace 95 °C, 10 s; nasedání primerů závislé na teplotě tání (tab. 3.1.), 20 s; elongace 72 °C, 20 s. Fluorescence byla měřena po doběhnutí každého cyklu při 72 °C. Amplifikace byla zakončena melting analýzou. Nejprve proběhlo zchlazení vzorků na 50 °C po dobu 60 s, poté byly vzorky vystaveny teplotě 65 °C, po uběhnutí 5 vteřin se teplota zvyšovala o 0,5 °C (až do dosažení 95 °C). Fluorescence byla měřena během zvyšování teploty.

Při RT-PCR kvantifikaci byla použita metoda tzv. relativní kvantifikace, v níž se porovnává relativní změna genové exprese (relativní expresní poměr) v testovaném vzorku oproti kontrolnímu vzorku a C_t amplifikační křivky daného genu se normalizuje oproti C_t referenčního genu. Kromě hodinových genů (tzv. target geny) jsem proto hodnotila i referenční gen (housekeeping gen), jehož množství se během dne nemění. Hodinové geny a referenční gen *rp49* (ribozomální protein 49) byly amplifikovány v oddělených jamkách ve třech opakování. Destička vždy obsahovala i negativní kontrolu bez přidaného templátu.

Data získaná při RT-PCR byla analyzována v programu CFX ManagerTM Software Data Analysis Quick Guide, který určil hodnotu C_t každého vzorku. Získané hodnoty C_t byly pak exportovány do Excelu (Microsoft) a v něm následně vypočítány poměry exprese studovaného genu k referenčnímu *rp49*. Porovnáním exprese referenčního genu (mezi

jednotlivými vzorky) pak byly normalizovány hodnoty exprese studovaného genu a následně sestrojeny grafy ukazující relativní expresi studovaných genů.

3.2. Měření pohybové aktivity mouchy domácí

Pohybová aktivita much domácích byla měřena u dospělých samců i samic stejného stáří pomocí dvou typů zařízení. Prvním z nich byly měřicí desky Large Activity Monitors (LAM, TriKinetics, Waltham, U.S.A.). Do tohoto zařízení byly vloženy zkumavky (15 cm dlouhé, průměr 2,4 cm) obsahující jednu mouchu, na jedné straně vodu a na druhé straně kostku cukru (obr. P1.1.). Přeběhnutím přes střed zkumavky moucha přeruší infračervené paprsky několika čidel, což je automaticky nahráno do počítače (DAMsystem303, TriKinetics, Waltham, Massachusetts). Pohybová aktivita byla též měřena obdobným zařízením vyrobeným na zakázku pány Václavem Brunhofferem a Stanislavem Vrbou. Tento systém používá pohybové čidlo (Omron) vysílající jeden paprsek světlicí vodorovně skrz Petriho misku (průměr 6 nebo 9 cm), ve které je cukr, navlhčená buničina a jedna moucha (obr. P1.2.). Pohybová aktivita je pak nahrávána automaticky do počítače (program Infra64, Václav Brunhoffer). Oba typy měřidel jsou umístěny v inkubátoru s kontrolovaným světelným režimem a teplotou.

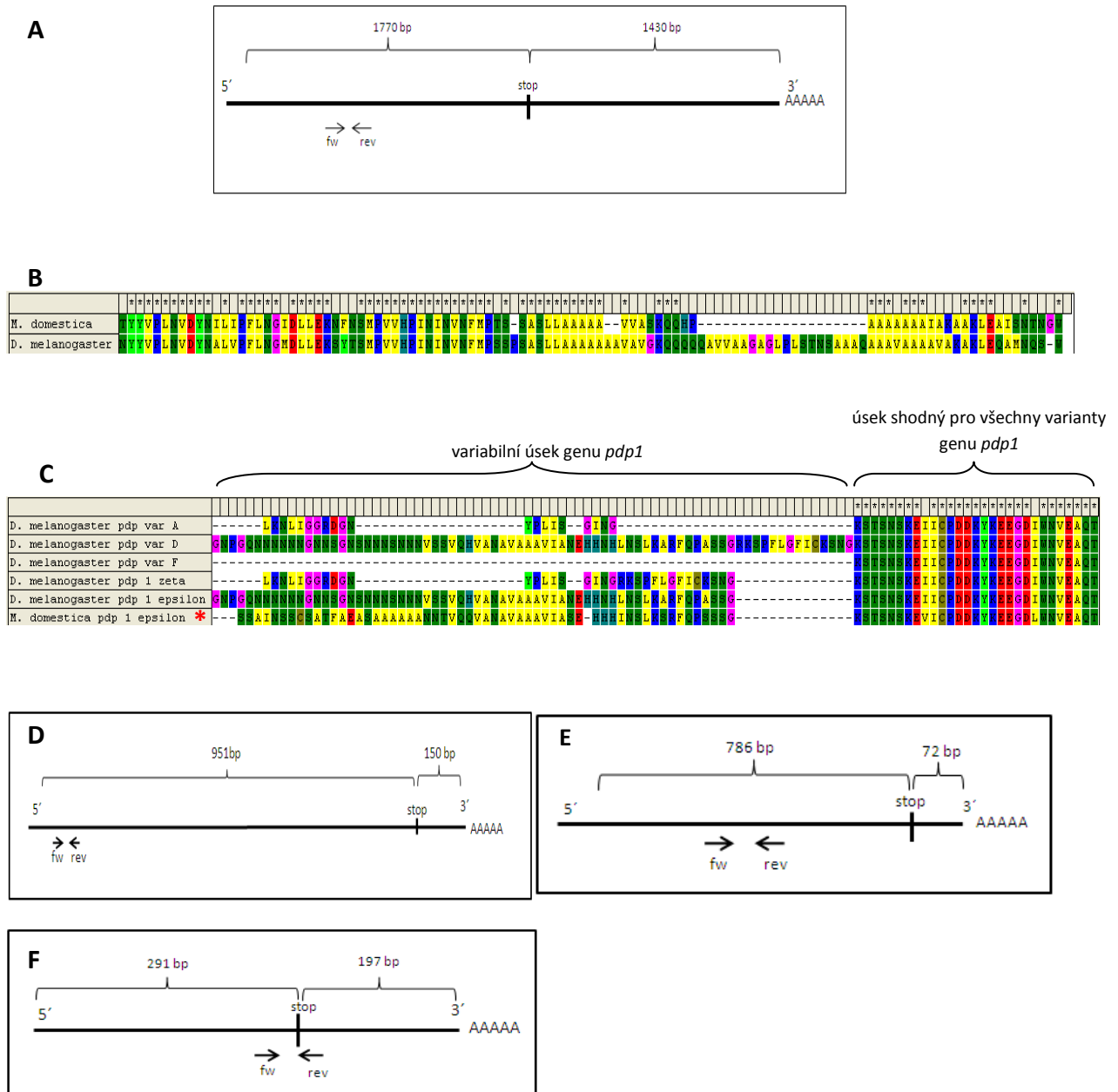
Data byla následně zpracována buď v Excelu (Microsoft) nebo pomocí programu Matlab (Mathworks, Natick, Massachusetts) s použitím aplikace Flytoolbox (Levine et al., 2002).

4. VÝSLEDKY

4.1. Získání sekvencí cDNA hodinových genů

Jelikož nebyla známa žádná sekvence genu *cwo* u mouchy domácí, byly nejprve navrženy genově specifické degenerované primery na základě známých homologních sekvencí genu u octomilky *Drosophila melanogaster* (AAF24476). Poté byla pomocí *touch down* PCR namnožena sekvence, která byla následně sekvenována. Sekvence byla posouzena pohledem a srovnána programem BLAST (blastx) s databází v genové bance. Poté byly navrženy specifické primery a sekvence byla postupně prodloužena k 3'konci genu. Takto byla získána skoro celá sekvence genu *cwo* o velikosti 1770 bp (chybí 5'konec, dle podobnosti aminokyselinových sekvencí odhaduji, že přibližně 80AA = 260bp). Objevila jsem velkou netranslatovanou oblast na 3'konci cDNA tohoto genu o velikosti 1430 bp (obr. 4.1.A). Vzniklý přepsaný protein byl porovnán se známou sekvencí aminokyselin z octomilky, aby byla ověřena podobnost mezi oběma aminokyselinovými (AA) sekvencemi, obzvláště podobnost C - konců (obr.4.1.B), právě kvůli výskytu velké netranslatované oblasti na 3'konci cDNA. Dále jsem získala sekvenci jednoho intronu, přes jehož hranice byl navrhnout primer, který nasedá specificky pouze na cDNA (obr.4.1. A).

U genu *pdp 1ε* také nebyla známa sekvence u mouchy domácí, proto byly nejprve navrženy genově specifické degenerované primery na základě známých homologních sekvencí genu u octomilky (*Drosophila melanogaster*). Poté byl pomocí *touch down* PCR získán produkt, osekvenován a tato sekvence porovnána s databází v genové bance programem BLAST (blastx). Poté byly navrženy specifické primery a sekvence byla jejich pomocí postupně prodloužena oběma směry (k 5'konci genu i k 3'konci genu). Získala jsem sekvenci genu *pdp 1ε* o velikosti 951 bp (chybí úplný 5'konec genu – přibližně 150 bp). K potvrzení, že se jedná skutečně o gen *pdp 1ε* a ne o jinou variantu tohoto genu, byla AA sekvence genu srovnána se známými PDP 1 variantami z octomilky. Varianty PDP 1 se od sebe liší pouze na svém počátku (N - konec). Potvrdila jsem, že studuji skutečně variantu genu *pdp 1ε* (obr. 4.1.C). Dále jsem získala sekvenci dvou intronů (jeden v místě shodném pro všechny varianty *pdp 1*, další umístěn pouze v části varianty *pdp 1ε*). Přes hranice intronu (umístěného v části shodné pouze pro *pdp 1ε*) byl navrhnout primer, který nasedá specificky pouze na cDNA (obr. 4.1.D).



obr. 4.1. Čtyři hodinové geny **A** – Získaná kódující sekvence genu *cwo*. Počet známých párů bází a vyznačení velké netranslatované oblasti na 3' konci genu. Vyznačené primery byly použity pro RT-PCR, přičemž rev primer přemostoval intron. **B** – Oblast C - konce proteinu CWO - srovnána *Musca domestica* a *Drosophila melanogaster*. **C** – Srovnání jednotlivých variant PDP 1. Jednotlivé izoformy se liší svým začátkem (z alternativních promotorů) a také odlišným sestřihem některých intronů. Pro izoformu epsilon je typický N - konec proteinu, proto bylo srovnáno 5 variant tohoto genu z *Drosophila melanogaster* lišících se na N - konci s mojí sekvencí PDP1 z *Musca domestica* (označeno *). Na obrázku je vyznačen shodný úsek potvrzující, že se jedná skutečně o protein PDP1 a variabilní úsek potvrzující, že pracuji s izoformou epsilon. **D** – Získaná kódující sekvence genu *pdp 1ε*, vyznačené primery byly použity pro RT-PCR, přičemž rev primer byl navrhnut přes hranice intronu. **E** – Získaná kódující sekvence genu *ck 2β*. Vyznačen počet známých párů bází a primery, které byly použity pro RT-PCR, přičemž rev primer byl navržen přes hranice intronu. **F** – Ověření sekvence genu *pdh*. Vyznačena velikost namnoženého úseku cDNA a primery použité pro RT-PCR, přičemž fw primer byl navržen přes intron.

Jelikož nebyla známa žádná sekvence genu *ck 2β* u mouchy domácí, byly také nejprve navrženy genově specifické degenerované primery na základě známých homologních sekvencí genu u octomilky, mšice, vojnice, motýla a potměníka (*Drosophila melanogaster* (XP_002082313), *Acyrtosiphon pisum* (NP_001119697), *Spodoptera frugiperda* (AAC24042), *Danaus plexipus* (ABU49713), *Tribolium castaneum* (XP_966313)). Pomocí *touch down* PCR získaný produkt byl zaklonován, osekvenován a podle něj byly navrženy specifické primery a sekvence byla postupně prodloužena k 3'konci genu. Takto byla získána skoro celá sekvence genu o velikosti 786 bp (chybí 5'konec, dle podobnosti aminokyselinových sekvencí odhaduji, že přibližně 60AA = 180bp). Dále jsem získala sekvenci jednoho intronu, přes jehož hranice byl navrhnout primer, který nasedá specificky pouze na cDNA (obr. 4.1.E).

Jelikož již byla známa celá sekvence genu *pdh* u mouchy domácí (Matsushima et al., 2004), navrhla jsem specifické primery, kterými jsem ověřila, že mnou získaný produkt odpovídá již známé sekvenci. Dále jsem získala sekvenci jednoho intronu, přes jehož hranice byl navrhnout primer, který nasedá specificky pouze na cDNA (obr. 4.1.F).

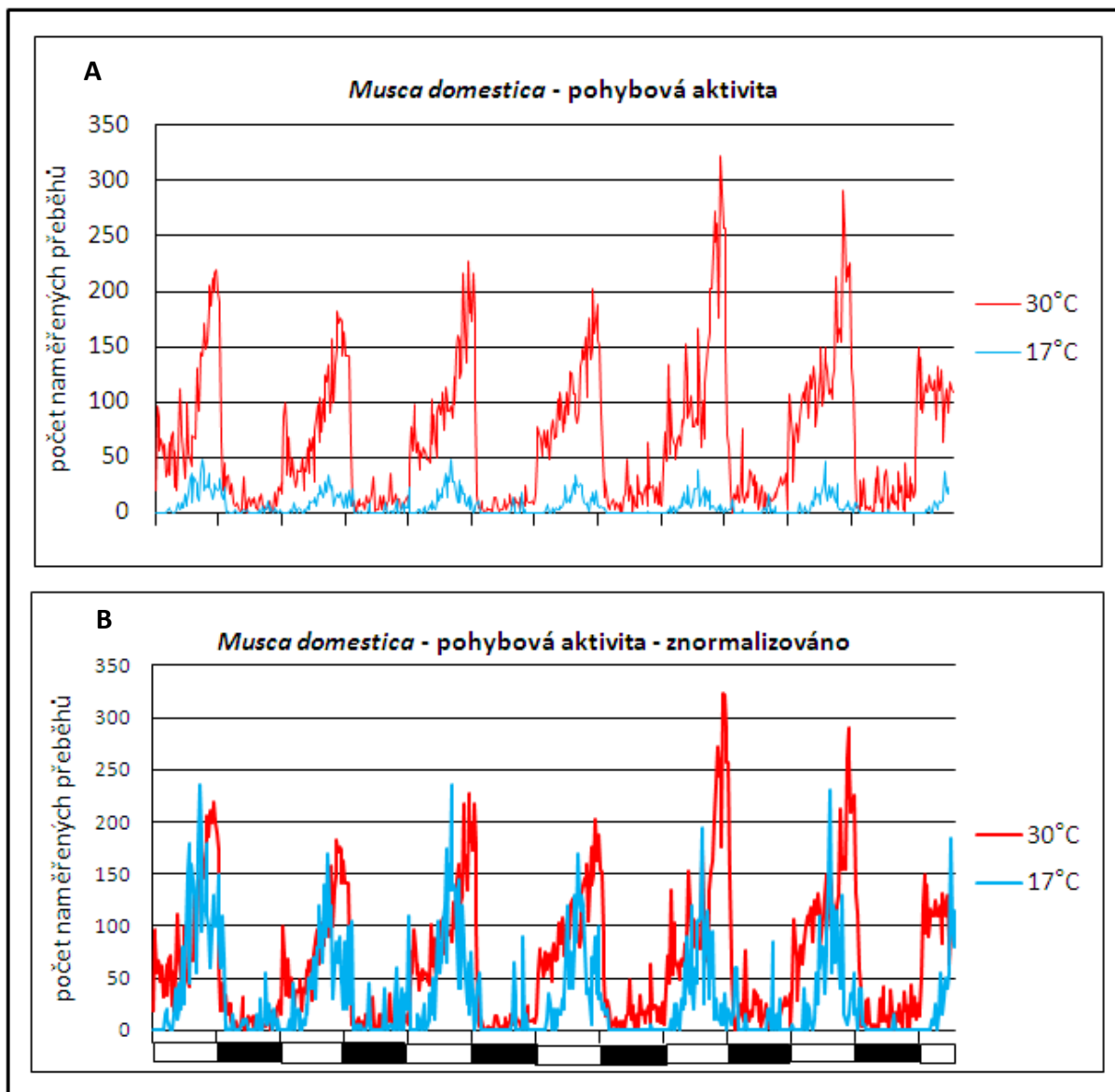
Sekvence genu *ck 1ε* u mouchy domácí nebyla známa, tudíž byly navrženy degenerované primery na základě známých homologních sekvencí genu u různých živočichů (octomilka, komár, mšice, drápatka, kuře, vačice, člověk). Pomocí *touch down* PCR získaný produkt byl zaklonován, osekvenován a podle něj byly navrženy specifické primery a sekvence byla postupně prodloužena k 3'konci genu. Také byl navrhnout další degenerovaný primer (aminokyselinová sekvence shodná s úplným N koncem u ostatních živočichů) a byla provedena primer walking PCR. Získala jsem tak celou kódující sekvenci genu *ck 1ε* (1320bp). Tento gen má určitou homologii s genem *ck 1α*. Pro potvrzení, že se jedná o gen *ck 1ε* byla AA sekvence srovnána s AA sekvencí CK 1α: *Drosophila melanogaster* (NP511140) a *Homo sapiens sapiens* (NP_001020276) (obr. 4.2.A) a se sekvencemi CK 1ε: *Drosophila melanogaster* (AAC39134), *Culex quinquefasciatus* (XP_001845143), *Danaus plexippus* (ABU49715), *Apis malifera* (XP_395574), *Pyrhocoris apterus* (Doležel, nepublikováno), *Acyrtosiphon pisum* (XP_001951697), *Danio rerio* (NP998415), *Xenopus laevis* (AAF01032), *Gallus gallus* (AAP47012), *Monodelphis domestica* (XP_001379385), *Homo sapiens sapiens* (NP_689407). Pouze 3' konec cDNA *ck 1ε* nese značnou mezidruhovou variabilitu.

C „ocásek“ proteinu (obr. 4.2.B) ukazuje na tuto variabilitu, byly porovnány následující živočichové: *D. melanogaster*, *C. quinquefasciatus*, *D. plexippus*, *A. malifera*, *P. apterus*, *A. pisum*, *D. rerio*, *X. laevis*, *H. sapiens sapiens*.

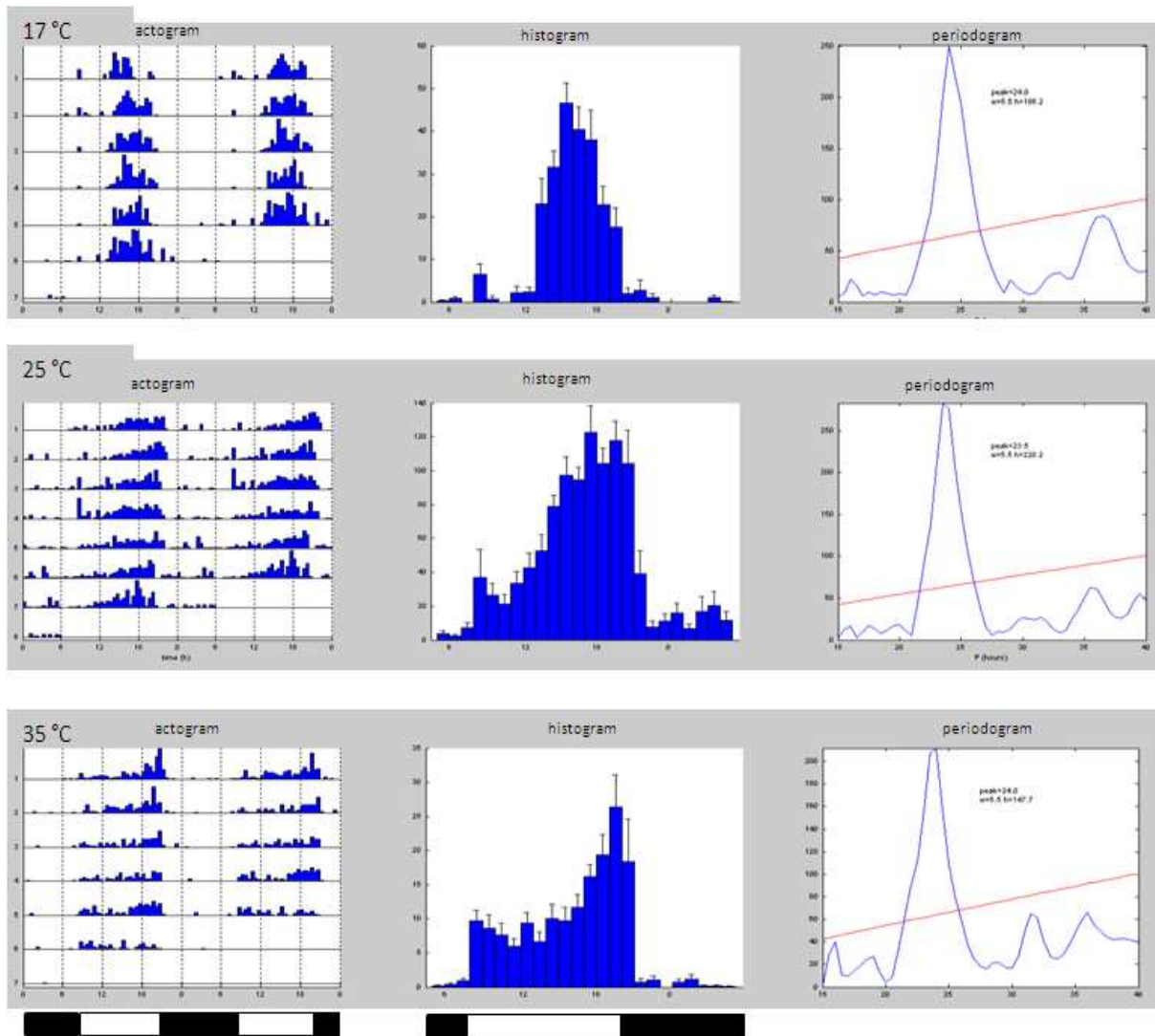
4.2. Měření pohybové aktivity mouchy domácí

V pilotním pokusu jsem nejprve ověřila, zda mouchy dokáží přežít v teplotních podmínkách, které se liší od těch udržovaných v chovných boxech (25°C), a zda u much dojde k nějakému posunu periody (obr. 4.3.). Teploty v inkubátorech byly nastaveny na konstantních 17 °C a konstantních 30 °C, přičemž fotoperioda zůstala zachována jako v chovném boxu (12 hod světlo : 12 hod tma). Mouchy byly umístěny do Petriho misek s vodou a cukrem. Na konci pokusu (trval 7 dní) přežilo v 17 °C 56 % much a ve 30 °C přežilo 69 % much.

V dalších pokusech byla teplota 17 °C zachována a teplota 30 °C byla zvýšena na 35 °C. V těchto pokusech byly mouchy umístěny do zkumavek s vodou a cukrem, které byly dány do LAM desek ve třech inkubátorech, přičemž v každém byla udržována konstantní teplota 17 °C, nebo 25 °C, nebo 35 °C. Mouchy umístěné v 17 °C byly aktivní během dne (hlavně během poledne), přičemž nejvyšší aktivitu vykazovaly v brzkých odpoledních hodinách (odpovídá ZT 7), ovšem jejich aktivita byla v porovnání s aktivitou much umístěných do 25°C velmi malá. Celkem 79 % much z této skupiny vykazovalo přibližně stejnou aktivitu jako moucha na obr. 4.4. (do výsledků byly započítány pouze mouchy, které žili po celou dobu experimentu a ještě další tři dny po ukončení experimentu). Mouchy umístěné v 25 °C byly aktivní během celého dne, s nejvyšší aktivitou přibližně v odpoledních hodinách (odpovídá ZT 9 – ZT 10). Celkem 93 % much z této skupiny vykazovalo přibližně stejnou aktivitu jako moucha na obr. 4.4. (do výsledků byly započítány pouze mouchy, které žili po celou dobu experimentu a ještě další tři dny po ukončení experimentu). Mouchy umístěné v 35 °C byly lehce aktivní během celého dne, přičemž nejvyšší aktivitu vykazovaly ve večerním čase (ZT 11 – ZT 12), ovšem jejich aktivita byla v porovnání s aktivitou much umístěných do 25 °C zhruba 3-5 krát nižší a srovnatelná s aktivitou much umístěných do 17°C. Celkem 59 % much z této skupiny vykazovalo přibližně stejnou aktivitu jako moucha na obr. 4.4. (do výsledků byly započítány pouze mouchy, které žili po celou dobu experimentu a ještě další tři dny po ukončení experimentu).



obr. 4.3. Pohybová aktivita *M. domestica* během pilotního pokusu. Mouchy byly umístěné v Petriho miskách s vodou a cukrem. **A** – Naměřená skutečná pohybová aktivita u *M. domestica* za LD podmínek v 17 °C a ve 30°C. Na ose X je vyneseno čas, bíle obdelníky odpovídají 12 hodinám světla a černé obdelníky odpovídají 12 hodinám tmy. **B** – Normalizace hodnot. Počty přeběhů much umístěných v 17 °C byly normalizovány vzhledem k počtu přeběhů much umístěných ve 30 °C (pro snazší porovnání pohybové aktivity much umístěných v různých teplotních podmínkách). Pokus trval 8 dní (první den nebyl analyzován z hlediska počáteční nervozity much, která se objevuje, když je s nimi manipulováno), v 17 °C přežilo 56 % much, v 30 °C přežilo 69 % much.



obr. 4. 4. Měření pohybové aktivity much domácích. Mouchy byly umístěny do zkumavek v LAM deskách do tří inkubátorů. V každém inkubátoru byla udržována konstantní teplota (17 °C, nebo 25 °C, nebo 35 °C). Levý panel: Pohybová aktivita vynesena jako aktogram. Prostřední panel: Průměrná aktivita během dne vypočítaná z 6 po sobě jdoucích dnů, odchylka ukazuje variabilitu mezi jednotlivými dny. Pravý panel ukazuje nejpravděpodobnější periodu, vypočtenou z LD dat (nejedná se tedy o endogenní periodu, ale pouze o potvrzení, že v LD režimu je chování rytmické). Pokusy trvaly 8 dní (první den nebyl analyzován z hlediska počáteční nervozity much, která se objevuje, když je s nimi manipulováno). Zobrazeny jsou příklady jednotlivců. V 17 °C přežilo celkem 88 % much, ve 25 °C přežilo 88 % much a ve 35 °C přežilo 72 % much.

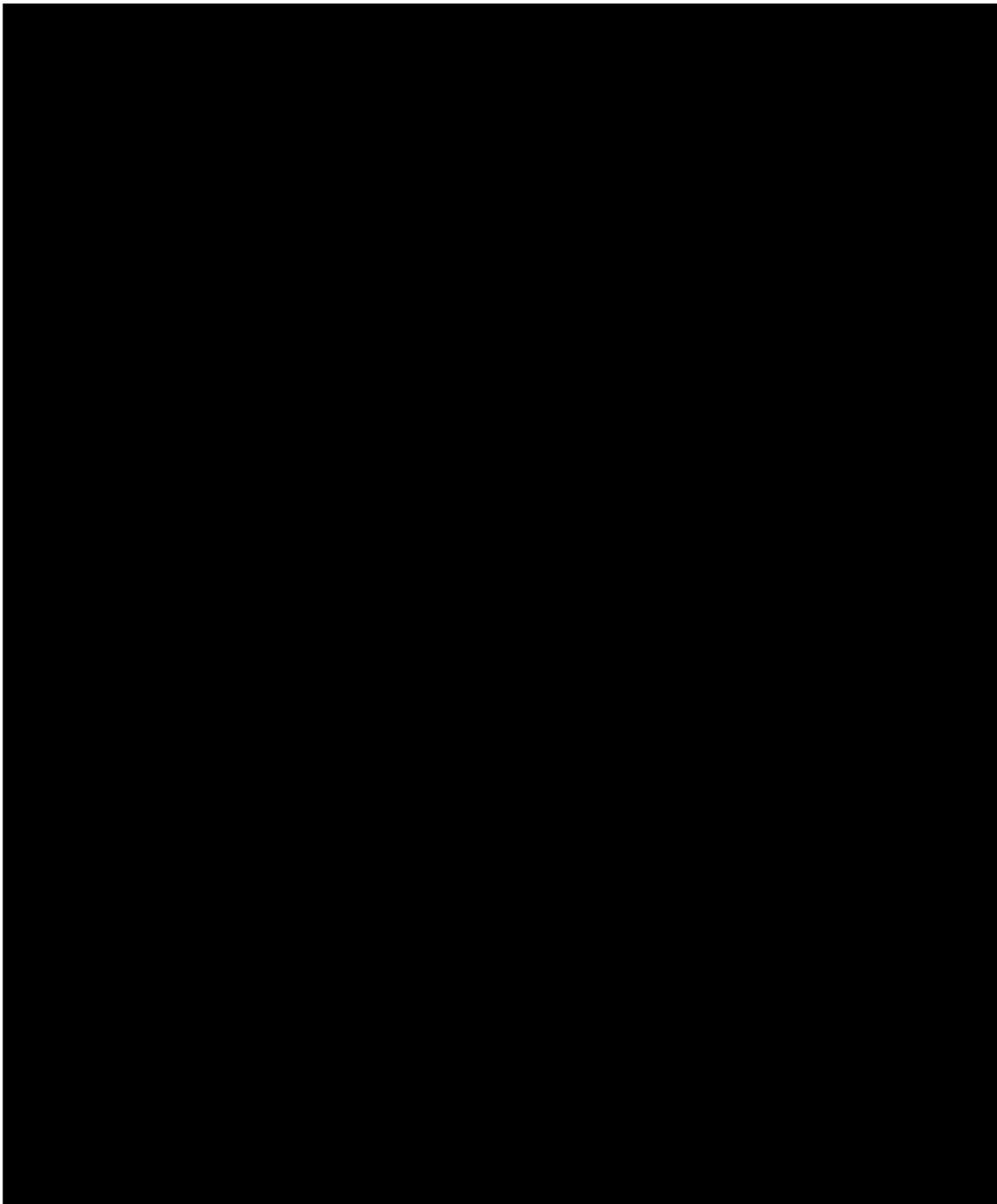
4.3. Kvantifikace relativní hladiny mRNA hodinových genů v muších hlavičkách

Na základě pokusů se stanovením pohybové aktivity u much jsem stanovila relativní hladinu mRNA u much umístěných do stejných LD světelných podmínek (12 hodin světla, 12 hodin tmy), ale různých teplotních podmínek (17 °C, či 25 °C, či 35 °C) pomocí RT-PCR, a to u všech mnou získaných genů a dále ještě pro geny *tim* a *per*, které již byly dříve studovány (Codd V. et al., 2007).

U genů *cwo*, *pdp 1ε*, *tim* a *per* došlo k určitým změnám v relativních hladinách mRNA (geny *cwo*, *pdp 1ε* a *tim* obr. 4.5, gen *per* obr. 4.6.D), u genů *ck 1ε*, *pdh* a *ck 2β* jsem žádné změny nezaznamenala. Všechny pokusy byly třikrát zopakovány (kromě výsledku pro gen *cwo* u much umístěných do 17 °C, tento pokus byl proveden pouze jednou) a do výsledného grafu dány průměry z těchto tří nezávislých měření spolu se směrodatnými odchylkami.

U genu *per* jsem se dále zabývala sestřihem 3' terminálního intronu v translatované části genu (intron č.11) (obr. 4.6.A) u much umístěných v různých teplotních podmínkách se stejnými fotoperiodickými podmínkami. Pokud je tento intron součástí transkriptu, dochází k předčasnému vytvoření stop kodonu a výsledná sekvence aminokyselin se od sebe liší (obr. 4.6.B). Stanovila jsem cyklování jednotlivých variant genu *per* (tedy měření nesestřiženého transkriptu, sestřiženého transkriptu a také měření nerozlišující mezi sestřihem tohoto intronu) (obr. 4.6.D) a z výsledku pak vypočítala i procento sestřižení, či nesestřižení intronu v různých teplotních podmínkách (obr. 4.6.C).

Relativní hladinu mRNA hodinových genů jsem stanovovala také u much umístěných v LD a také v DD světelném režimu při konstantní teplotě 25°C (obr. 4.7.). Kvantifikace byla provedena třemi na sobě nezávislými pokusy (pro mouchy umístěné v LD světelných podmínkách), nebo dvěma na sobě nezávislými pokusy (mouchy umístěny v DD světelných podmínkách).



obr. 4.5. Relativní hladina mRNA hodinových genů v muších hlavičkách za LD podmínek v různých teplotách. Vzorky byly odebírány po 2 hodinách, obdelníky pod osou x odpovídají světelnému režimu (bílý obdelník – světlo; černý obdelník – tma). Osa y – relativní poměr mezi měřeným genem a referenčním transkriptem RP49. Každá jednotlivá křivka je výsledným průměrem třech nezávislých měření (tedy tři různé skupiny much), přičemž každé jednotlivé měření sestávalo z třikrát naměřené hodnoty (opakování vzorku pro korekci chyb při pipetování). Směrodatné odchylky udávají rozdíly ve všech naměřených hodnotách. Pouze u měření relativní hladiny mRNA genu *cwo* za LD podmínek při 17°C křivka znázorňuje pouze jedno nezávislé měření (měřeno v tripletu), kdy směrodatné odchylky udávají rozdíly mezi jednotlivými naměřenými hodnotami.

teplot. Uvedené křivky jsou výsledkem poměru relativních hladin mRNA jednotlivých sestřihových variant genu *per* a varianty nerozlišující sestřih.

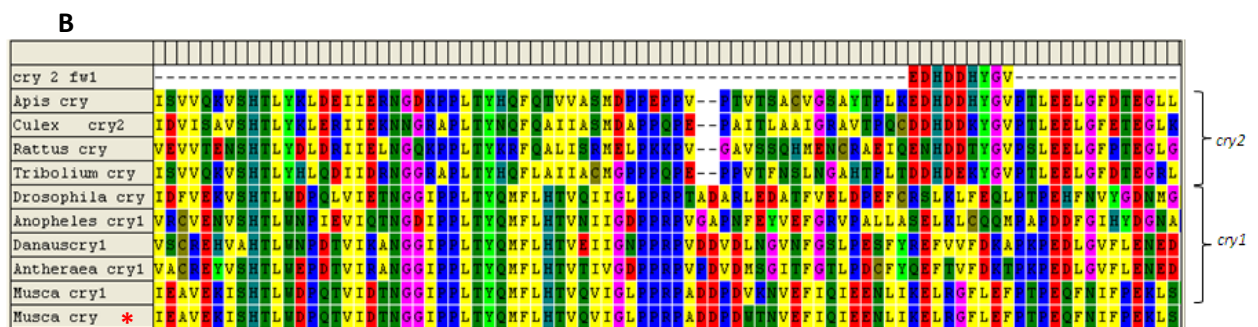
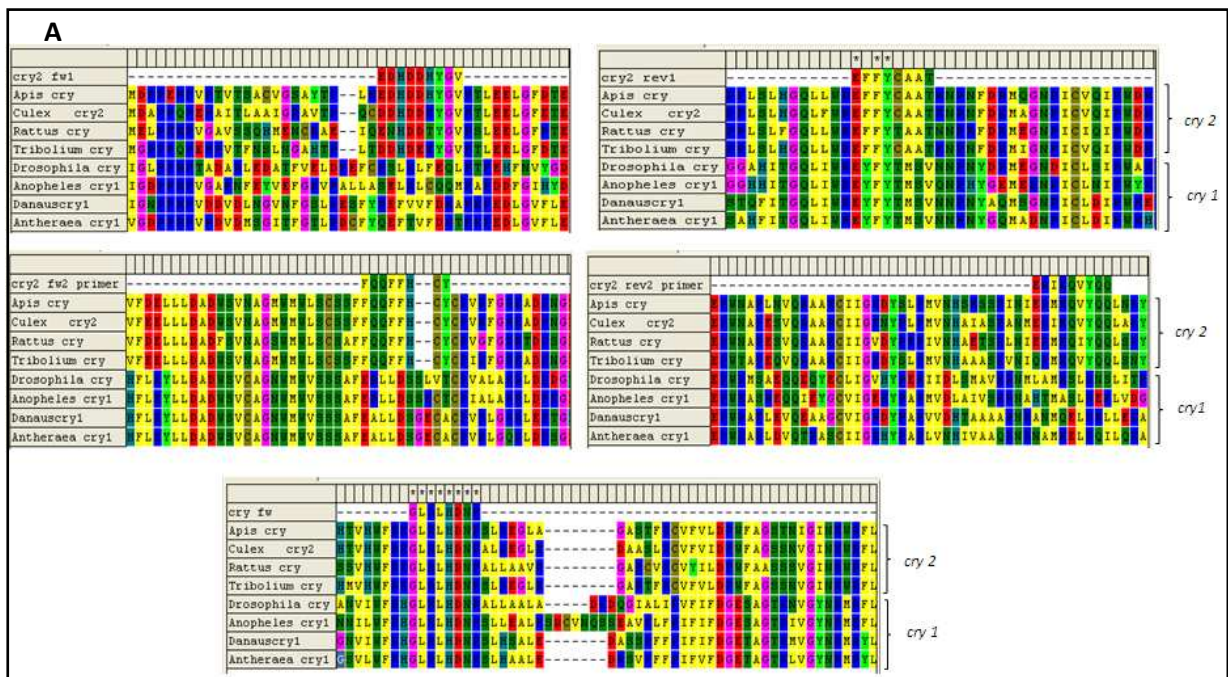


obr. 4.7. Expresce hodinových genů v hlavičkách much domácích za LD a DD podmínek při 25 °C. Vzorky byly odebrány po 2 hodinách, obdelníky pod osou x odpovídají světelnému režimu (bílý – světlo; černý – tma, prvních 12 hodin DD odpovídajících světlu v předešlém režimu je vyznačeno šedě pro snazší orientaci v časové ose). Pomocí RT-PCR bylo analyzováno sedm genů za LD a následně DD podmínek, na grafech jsou znázorněny průměry třech nezávislých měření (LD) a dvou nezávislých měření (DD), přičemž každé jednotlivé měření

sestávalo z třikrát naměřené hodnoty. Směrodatné odchylky udávají rozdíly ve všech naměřených hodnotách. Osa y – reativní poměr mezi měřeným genem a referenčním transkriptem RP49.

4.4. Získání sekvence genu *cry2*

Jelikož nebyla známa žádná sekvence genu *cry2* u mouchy domácí, byly nejprve navrženy genově specifické degenerované primery na základě známých homologních sekvencí genu u včely, komára, potkana a potemníka (*Apis malifera*, *Culex pipiens*, *Rattus norvegicus*, *Tribolium castaneum*). Tyto degenerované primery byly navrženy tak, aby se jejich aminokyselinová sekvence shodovala s aminokyselinovou sekvencí genu *cry2* u ostatních živočichů, ale neshodovala se s aminokyselinovou sekvencí genu *cry1* (obr. 4.7.A). Poté byla použita *touch down* PCR k namnožení očekávaného produktu. Jelikož se mi opakovaně nedařilo namnožit očekávaný produkt, byla navržena další dvojice degenerovaných primerů, která by amplifikovala pouze gen *cry2* a také jeden degenerovaný primer, který mohl být použit k amplifikaci jak genu *cry2*, tak genu *cry1* (obr. 4.8.A). Použitím degenerovaného primeru genově specifického pro oba geny s degenerovaným primerem genově specifickým pouze pro gen *cry2*, byl získán produkt o velikosti 812 bp. Osekvenování produktu a následné srovnání aminokyselinových sekvencí (obr. 4.8.B) ukázalo, že se jedná o gen *cry1* a srovnání aminokyselinových i nukleotidových sekvencí ukázalo, že je jedná o sekvenci již izolovaného genu *cry* mouchy domácí (Codd et al., 2007).



obr. 4.8. Hodinový gen *cry2* (*cryptochrome 2*) **A** – Ukázka používaných degenerovaných primerů při *touch down* PCR. Většina primerů byla navržena tak, aby se jejich sekvence neshodovala se sekvencí genu *cry1*. Jeden primer byl navrhnut tak, aby se jeho sekvence shodovala jak se sekvencí genu *cry1*, tak se sekvencí genu *cry2*. Amplifikace se podařila pouze s dvojicí primerů *cry fw* (shodný se sekvencí genu *cry1* i *cry2*) a *cry2 rev1* (shodný pouze se sekvencí genu *cry2*). První řádek - vybraný úsek, kterému odpovídala sekvence navrženého primeru. Pod ním srovnány následující proteinové sekvence: CRY2 („savčí typ“): *Apis cry* (EF117814), *Culex cry2* (XM001869421), *Rattus cry* (AY040223), *Tribolium cry* (EF117815); CRY1 („typ *Drosophila*“): *Drosophila cry* (NM169852), *Anopheles cry1* (DQ219482), *Danaus cry1* (AY860425), *Antheraea cry1* (AF333998). **B** – Výsledek sekvenace amplifikovaného produktu ukázal, že se jedná o gen *cry1*, který byl již z mouchy izolován (amplifikovaný produkt označen *).

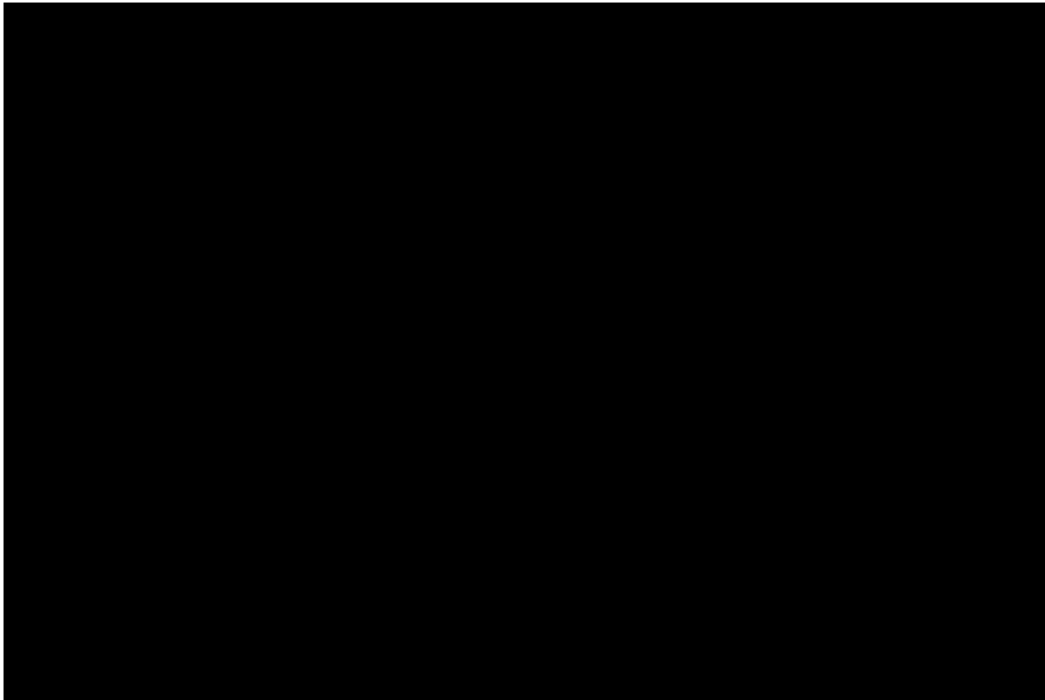
5. DISKUZE

Cílem této srovnávací studie bylo určit, které části cirkadiálních hodin jsou konzervované mezi mouchou domácí a octomilkou a které se naopak liší. Především molekulární studie (Codd et al., 2007) ukazuje na některé nápadné rozdíly v cirkadiálních hodinách mouchy domácí. Nápadná byla zejména konstantní (tedy necyklující) hladina proteinu PERIOD zjištěná pomocí western blotů v celých hlavách much. Protein MdPER je zde stabilní i po osvětlení světlem (na rozdíl od PER v *Drosophila melanogaster*). V této souvislosti je zajímavé, že mRNA genu *cryptochrome*, což je faktor zodpovědný za světlem indukovanou degradaci TIM a potažmo PER, je u *M. domestica* exprimována též v konstantním množství. Cyklická exprese tohoto homologu mušičího *cryptochromu* je přitom známa u octomilky (Emery et al., 1998), komárů (Gentile et al., 2009) i motýla monarcha (Zhu et al., 2008). Proto bylo důležité určit, ve kterých dalších aspektech se cirkadiální geny a jejich exprese liší mezi mouchou domácí a ostatními organismy.

5.1. Získání cDNA sekvencí hodinových genů

Podařilo se mi získat kódující sekvence několika genů. Jedná se jak o transkripční faktory zapojené ve zpětnovazebných smyčkách (*cwo*, *pdf 1ε*), tak o kinázy (*ck 1ε* a *ck 2*), které fosforylují protein PERIOD a pravděpodobně další cirkadiální proteiny. Pokusila jsem se zaklonovat také *cryptochrome 2*, což je gen, který byl původně identifikován u savců a později se ukázalo, že je přítomný v genomu některých druhů hmyzu. *Cry* u savců neslouží k synchronizaci cirkadiálních hodin, ale je přímo jedním z esenciálních transkripčních faktorů cirkadiálních hodin (Kume et al., 1999; Reppert, 2000). *Cry2* sice chybí v genomu octomilky, ale nalezneme jej už i u komárů (Zhu et al., 2005), tedy také zástupců řádu Diptera, a dále u motýlů, brouků, u včely, mšice, švába (viz. obr. 5.1). Vzhledem k rozdílům v regulaci a expresi cirkadiálních faktorů mouchy domácí (Codd et al., 2007) se tak nabízela možnost, že by tato moucha mohla „používat“ savčí *cryptochrome2*, který by tak u ní doplnil obvyklé faktory používané u octomilky. Srovnání *cry1* (typ *Drosophila*) a *cry2* (typ savčí) umožňuje nalézt úseky proteinu specifické pro jeden či druhý typ *cry*. Zároveň je nyní k dispozici sekvence těchto genů z velkého množství zástupců různých skupin organismů. Tato data tak umožňují navrhnout primery, které by měly být specifické pro hledaný typ *cry* a zároveň dostatečně univerzální, aby postihly mezidruhovou variabilitu (viz. obr. 4.8.A, kapitola výsledky).

Kombinací několika takto navržených primerů se ale nepodařilo získat produkt z PCR ani při postupném snižování teplot nasedání primerů. Až při použití jednoho primeru navrženého v úseku shodném pro CRY1 i CRY2 kombinovaného s CRY2 specifickým reverse primerem došlo, a to až po snížení teplot nasedání primeru, k získání produktu. Ten byl osekvenován a ukázalo se, že je to již známý *cry1* (Codd et al., 2007). Na základě těchto intenzivních pokusů získat *cry2* z mouchy domácí (a naší celkem vysoké úspěšnosti v klonování *cry2* z jiných druhů hmyzu; Bazalová, Doležel a Šauman, nepublikováno, viz též obr. 5.1) nemůžeme sice vyloučit, že se gen *cry2* nevyskytuje u *M. domestica*, ale domnívám se, že je to velmi nepravděpodobné. Pokud by tedy *cry2* v genomu mouchy domácí přesto byl, pak předpokládáme, že patrně hodně pozměněný oproti známým sekvencím této verze genu *cryptochrome*. Jednoznačnou odpovědí na tuto otázku je kompletní osekvenování genomu mouchy domácí, čímž se ale pravděpodobně zabývat nebudu.



obr. 5.1. Fylogenetický strom ukazující na výskyt *cry1*, *cry2* a *tim* v genomu různých živočichů. Velkým písmenem G jsou označeni živočichové, u nichž je k dispozici osekvenovaný celý genom. Znaménko + značí, že gen je v genomu živočicha přítomen, znaménko - značí, že chybí. Otazník znamená, že příslušný gen zatím u živočicha nalezen nebyl, ale z důvodu neznalosti jeho genomu nemůžeme říct, že zde není přítomen. Závorka v případě *Acyrtosiphon pisum* poukazuje na fakt, že sekvence genu *cry1* u této mšice není kompletní a je tedy nutné potvrdit, zdali vzniká odpovídající mRNA a může-li tato kódovat funkční protein. Zajímavá situace nastává u nejprimitivnějších zástupců hmyzu v tomto stromu, švábů (*Periplaneta*, *Blatella*), kde se nám podařilo získat jak *cryptochrome2* tak i *timeless* (Bazalová et al., publikace v přípravě).

V těchto evolučních souvislostech je na místě zmínit variabilitu, s jakou jsou cirkadiální hodiny vytvořeny u různých zástupců hmyzu (obr. 5.1). Nápadné zde zejména je, že *cry2* chybí pouze u rodu *Drosophila* (a pravděpodobně *Musca*), zatímco ostatní druhy tento gen mají. Druhým aspektem je absence genu *timeless* u blanokřídlých (*Apis* v tomto obrázku a také rod *Nosema* – data neukázána). O to zajímavější je, že *timeless* nacházíme u primitivnějších zástupců hmyzu, švábů, a to velmi dobře zachovaný se značnou podobností se sekvencí *timeless* octomilky (Bazalová et al., publikace v přípravě).

Předešlá studie (Codd et al., 2007) též poukázala na možný výskyt dvou velikostních variant proteinu PER u mouchy domácí zjištěný pomocí Western analýzy. Moje analýza sekvence genu *period* odhalila možný alternativní sestřih posledního intronu č.11 (viz. obr. 4.6.A, kapitola výsledky). Ponecháním tohoto intronu by vznikal kratší protein (viz. obr. 4.6.B, kapitola výsledky). Přítomnost takovýchto variant by byla zajímavá za prvé proto, že C konec proteinu PER je do značné míry konzervovaný mezi *Drosophila* a *Musca* a to i v části, která by alternativním sestřihem byla pozměněna a za druhé proto, že alternativní sestřih právě u mRNA genu *period* hraje roli při seřizení fáze pohybové aktivity octomilek v závislosti na teplotě (Majercak et al., 1999; Majercak et al., 2004; Low et al., 2008). Zjištěná data (obr. 4.6.D, kapitola výsledky) ukazují, že určitá část transkriptů skutečně obsahuje poslední intron, ale procentuálně se jedná o malou frakci. Tento sestřih se nezdá být ovlivněný teplotou, ve které byla experimentální zvířata umístěna. Zde je třeba ale zmínit, že k měření byly použity celé hlavy a nelze vyloučit, že v mozku může být poměr sestřihu těchto variant odlišný. Vzhledem k možnému výskytu dvou velikostních variant proteinu PER (Codd et al., 2007) by byla detailní analýza všech možných sestřihových variant tohoto genu určitě zajímavá. Protože je ale většina intronů poměrně krátká (a gen poměrně dlouhý), nemá smysl použít Northern analýzy. Museli bychom zvolit nějaký jiný způsob detekce a kvantifikace alternativních forem *period* mRNA.

Dalším podstatným rozdílem mezi octomilkou a mouchou domácí byly rozdíly v lokalizaci proteinů PER a TIM v mozcích dospělců. Použití protilátek vnáší do pokusů určitou nejistotu, zejména pokud jsou vyrobeny proti antigenu z jiného živočišného druhu a kontrola jejich specifity je omezena například tím, že neexistuje nulový mutant (negativní kontrola) u mouchy domácí. Použití více odlišných protilátek ale vedlo k obdobným a tudíž do značné

míry důvěryhodným výsledkům (Codd et al., 2007). Jedním z aspektů byla ne zcela shodná kolokalizace PER a TIM a to jak v částech mozku (některé neurony pozitivní pro PER nebyly pozitivní pro TIM a naopak), ale také co se týče vnitrobuněčné lokalizace těchto antigenů (jaderná lokalizace PER nebyla nutně provázána jadernou lokalizací TIM). V této souvislosti by bylo velmi zajímavé zjistit, jak s těmito lokalizacemi souvisí výskyt DBT či dalších kináz zodpovědných za fosforylaci PER, jako je například CK2 (Lin et al., 2002) nebo kináz fosforylujících TIM (SGG, Martinek et al., 2001). Získání kódujících úseků těchto kináz (tato magisterská práce) je prvním krokem k experimentům tohoto typu.

Srovnání sekvence DBT/CK 1ε ukázalo, že předpokládaný protein je velmi konzervovaný v prvních zhruba 300 aminokyselinách a poté následuje variabilní úsek proteinu (obr. 4.2., kapitola výsledky). Tento ocásek na C konci se liší mezi námi studovanými druhy hmyzu a to i mezi zástupci dvoukřídlých (Bajgar, Bazalová a Doležel, nepublikováno), zatímco substrátová specifita pro rozpoznání proteinu DISHEVELD je zajištěna identifikovanými aminokyselinami v konzervované části proteinu (Dahlberg et al., 2009). Úseky zodpovědné za interakci s PER nejsou tak jasně definované a C ocásek v tomto případě pravděpodobně ovlivňuje stabilitu interakce PER-DBT. Vzhledem k dostupnému množství sekvencí PER a DBT z různých druhů hmyzu je reálné připravit *in vitro* (případně tkáňové) experimenty testující možnou koevoluci proteinů PER a DBT. Obzvláště zajímavé by bylo zjistit, zda tyto variabilní úseky ovlivňují interakci proteinů v závislosti na teplotě.

Při srovnání cDNA genu *cwo* je nápadný dlouhý netranslatovaný úsek na 3' konci u mouchy domácí (specifickými primery bylo potvrzeno, že se nejedná o artefakt vzniklý při 3' RACE PCR). Hypotetický protein kódovaný touto mRNA je přitom celkem konzervovaný s *cwo* *D. melanogaster* a to i na C konci těchto proteinů (obr. 4.1.B, kapitola výsledky). V tomto 1430 bp dlouhém úseku nebyla nalezena žádná kódující sekvence ani nápadná palindromická smyčka. Velikost tohoto nepřepisovaného úseku může být náhodná, ale za zmínku rozhodně stojí současná práce Kadenera et al. (2009) popisující úlohu malých RNA v řízení cirkadiálních hodin *D. melanogaster*. Jedním z transkriptů, ke kterým jsou produkovány komplementární RNA, byl právě *cwo*.

5.2. Vliv teploty na chování mouchy domácí

V této práci prezentuji též předběžné výsledky vlivu teploty na pohybovou aktivitu mouchy domácí. Zařízení pro měření much jsme získali v březnu tohoto roku a proto mám zatím změřeno circa 50 jedinců v dané teplotě. Získaná data ukazují, že mouchy přežijí dlouhodobě ve 30 °C a po dobu jednoho týdne i v 35 °C. Zatímco při nižších teplotách jako je 17 °C mouchy soustředí aktivitu do poledních hodin, zvýšením teplot se aktivita posouvá do pozdějších hodin, ale je relativně vysoká již po rozsvícení světel v ZT 0. Tento trend, tedy posun aktivity k ranním a večerním hodinám při vyšších teplotách, je známý u více živočichů a na molekulární úrovni je studovaný u octomilky *D. melanogaster* a příbuzných druhů rodu *Drosophila* (Majercak et al., 1999; Majerack et al., 2004, Low et al., 2008). K řízení výše popsaného teplotně specifického chování používá *D. melanogaster* alternativního sestřihu v netranslatované části transkriptu *period* (Majercak et al., 1999). Tento sestřih ovlivňuje rychlost, s jakou je mRNA přeložena do proteinu (Low et al., 2008). Vzhledem k tomu, že u mouchy domácí jsem nenalezla ve 3' nepřepisované části žádný intron a sestřih 3' terminálního intronu se nezdá být teplotou ovlivněný (alepoň ne ve vzorcích RNA z celých hlav), musí u mouchy domácí existovat jiný způsob regulace.

5.3. Kvantifikace genové exprese

Pomocí RT-PCR jsem určila expresi mnou zaklonovaných genů a již dříve studovaných genů *per* a *tim*. Oproti předešlé studii (Codd et al., 2007) jsem použila jemnější časové rozlišení vzorků a sledovala také vliv teploty na expresi studovaných genů.

Množství mRNA kináz *dbt* (*ck 1ε*) a *ck 2* (podjednotky β) se během dne neměnilo a jejich celkové množství také nebylo ovlivněno teplotou. Konstantní exprese *dbt* je zde v souladu s necyklující expesí tohoto genu během dne u *D. melanogaster* (Kloss et al., 1998). Pro *ck2 β* se nám nepodařilo najít v literatuře odpovídající studii, obdobně jsme nenalezli, že by někdo publikoval vliv teploty na expresi těchto dvou kináz. Expese mRNA *pdh* byla též konstantní, což je v souladu s literárními daty u octomilky (Ueda et al., 2002) a množství mRNA není ani ovlivněno teplotou, ovšem nepodařilo se mi nalézt publikace, které by se vlivem teploty na expresi tohoto genu zabývaly.

Kvantifikace transkriptů *per*, *tim*, *cwo* a *pdp 1ε* ukázala, že všechny z nich jsou cyklicky přepisovány. Fáze a amplituda oscilace všech těchto genů se velmi podobá již naměřeným hodnotám u mouchy domácí (geny *per* a *tim*; Codd et al., 2007) či u *D. melanogaster* (geny *cwo* a *pdp 1ε*; Matsumoto et al., 2007; Kadener et al., 2007; Lim et al., 2007; Ueda et al., 2002; Bagheri et al., 2008). Všechny tyto geny jsou, zdá se, také ovlivněny teplotou, což bylo prokázáno u *per* *D.melanogaster* (Citri et al., 1987; Majercak et al., 1999; Majercak et al., 2004; Low et al., 2008). U ostatních genů se mi nepodařilo nalézt publikace, které by se tímto tématem zabývaly. Z mých výsledků vyplývá, že hladina mRNA u much umístěných do 17°C začíná stoupat o něco dříve, než hladina mRNA u much umístěných do 25°C, což zcela zrcadlí posun pohybové aktivity much umístěných do 17 °C. K tomuto „trendu“ nedochází pouze u hladiny mRNA genu *tim*, kdy naopak dochází ke zpoždění v nárůstu hladiny mRNA v muších hlavičkách, což si bohužel neumím nijak vysvětlit. Zcela u všech genů dochází k pozdějšímu nárůstu hladiny mRNA u much umístěných do 35°C. Mám za to, že transkripce je ovlivněna jak nízkými, ale hlavně vysokými teplotami, kdy se maxima všech hladin mRNA studovaných genů posouvají do večerních až nočních hodin. Dle mého názoru to má zřejmou souvislost se změnou aktivity živočichů za vyšších teplot, kdy se jejich aktivita přesouvá do večerních až nočních hodin, což již bylo prokázáno (Majercak et al., 1999; Majercak et al., 2004; Low et al., 2008). Dále se mi zdá zajímavé, že u genu *pdp 1ε* se za rozdílných teplot mění značně nejen fáze, ale i amplituda oscilující hladiny mRNA, a to tak, že jak v teplejším, tak v chladnějším prostředí dochází k poklesu hladiny mRNA. Mohlo by to znamenat, že za teploty, která není pro organismus ideální, dochází k nižší úrovni transkripce tohoto genu, nebo že jeho mRNA není tak stabilní. Zajímavé by bylo zjistit, zda je ovlivněna i hladina tohoto proteinu v závislosti na teplotě. Myslím si, že k pochopení obecnějšího mechanismu vlivu teploty na množství mRNA hodinových genů by bylo třeba kvantifikovat ještě další hodinové geny (hlavně *Clk*, *cyc*, *vri* a *cry*) a přesvědčit se, zda jsou tyto geny ovlivněny podobně. Také by bylo zajímavé zjistit, jestli jsou hodinové geny ovlivněny teplotou i u jiných živočichů, zajímalo by mne hlavně, zda jsou takto ovlivněny primitivnější živočichové, než je moucha či octomilka (např. švábi), mohlo by to znamenat, že tento mechanismus se vyvinul velmi dávno.

6. ZÁVĚR

Výsledky prezentované v této studii bych shrnula následovně:

V této práci jsem určila takřka kompletní kódující sekvence pěti cirkadiálních genů mouchy domácí (*cwo*, *pdh*, *pdp 1ε*, *ck 2β*, *ck 1ε*). Pomocí kvantitativní real-time PCR jsem změřila množství těchto transkriptů během dne v podmínkách LD a DD. Tyto geny byly dosud popsány pouze u *D. melanogaster*.

Zjistila jsem vliv teploty na pohybovou aktivitu dospělců much domácích. Jedinci umístění v nízké teplotě (17 °C) soustředí aktivitu do poledních hodin, zatímco zvýšení teploty na 30 °C nebo 35 °C způsobuje posun aktivity k ranním a večerním hodinám. Také jsem se zabývala vlivem teploty na expresi těchto genů. Zjistila jsem, že teplota ovlivňuje cyklickou expresi genů *cwo*, *pdp 1ε*, *per* a *tim* a to jak jejich fázi, tak u některých i amplitudu. Naproti tomu exprese genů *ck 2β*, *ck 1ε* a *pdh* není teplotou ovlivněna. Tato studie tak obsahuje nové poznatky vlivu teploty na expresi cirkadiálních genů hmyzu. V případě genů *cwo*, *pdp 1ε* a *ck 2β* se jedná o první studii těchto genů i u jiného zástupce hmyzu, než je *Drosophila melanogaster*.

7. CITOVANÁ LITERATURA

- Akten B, Jauch E, Genova GK, Kim EY, Edery I, Raabe T, Jackson FR (2003) A role for CK2 in the *Drosophila* circadian oscillator. *Nat Neurosci* 6(3):251-257
- Ashmore LJ, Sehgal A (2003) A fly's eye view of circadian entrainment. *J Biol Rhythms* 18:206–216
- Bae K, Edery I (2006) Regulating a circadian clock's period, phase and amplitude by phosphorylation: insights from *Drosophila*. *J Biochem* 140:609–617
- Bagheri N, Lawson MJ, Stelling J, Doyle III FJ (2008) Modeling the *Drosophila melanogaster* Circadian Oscillator via Phase Optimization. *J Biol Rhythms*. 23(6): 525–537
- Benito J, Zheng H, Hardin PE (2007) PDP1e functions downstream of the circadian oscillator to mediate behavioral rhythms. *J Neurosci* 27:2539–2547
- Blau J (2003) A new role for an old kinase: CK2 and the circadian clock. *Nat Neurosci* 6(3):208-210
- Ceriani MF, Darlington TK, Staknis D, Mas P, Petti AA, Weitz CJ, Kay SA (1999) Light-dependent sequestration of TIMELESS by CRYPTOCHROME. *Science* 285:553–556
- Codd V, Doležel D, Stehlík J, Piccin A, Garner KJ, et al. (2007) Circadian rhythm gene regulation in the housefly *Musca domestica*. *Genetics* 177: 1539-1551
- Collins BH, Rosato E, Kyriacou CP (2004) Seasonal behavior in *Drosophila melanogaster* requires the photoreceptors, the circadian clock, and phospholipase C. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 1945-50
- Cyran SA, Buchsbaum AM, Reddy KL, Lin MC, Glossop NRJ, Hardin PE, Young MW, Storti RV, Blau J (2003) *vriille*, *Pdp1* and *dClock* form a second feedback loop in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 112:329–341
- Cyran SA, Yiannoulos G, Buchsbaum AM, Saez L, Young MW, Blau J (2005) The DOUBLE-TIME protein kinase regulates the subcellular localization of the *Drosophila* clock protein PERIOD. *J Neurosci*. 25(22): 5430–5437
- Dahlberg CL, Nguyen EZ, Goodlett D, Kimelman D (2009) Interactions between Casein kinase Iepsilon (CKIepsilon) and two substrates from disparate signaling pathways reveal mechanisms for substrate-kinase specificity. *PLoS One*. 4(3):e4766
- Dolezelova E, Dolezel D, Hall JC (2007) Rhythm defects caused by newly engineered null mutations in *Drosophila*'s *cryptochrome* gene. *Genetics* 177, 329-45
- Dunlap JC, Loros J, DeCoursey PJ (2004) *Chronobiology: biological timekeeping*. Sinauer, Sunderland

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

Emery P, So WV, Kaneko M, Hall JC, Rosbash M (1998) CRY, a *Drosophila* clock and light-regulated *cryptochrome*, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity. *Cell* 95, 669-79

Ever J, Frisch B, Hamblen-Coyle MJ, Rosbach M and Hall JC (1992) Expression of the *period* clock gene within different cell types in the brain of *Drosophila* adults and mosaic analysis of these cells influence on circadian behavioral rhythms. *Journal of Neuroscience* 12: 3321-3349

Fernandez MP, Berni J, Ceriani MF (2008) Circadian remodeling of neuronal circuits involved in rhythmic behavior. *PloS Biol* 6:e69

Fleissner G, Frisch B (1993) A new type of putative non-visual photoreceptors in the optic lobe of beetles. *Cell Tissue Res.* 273, 435-45

Frisch B, Fleissner G, Brandes C, Hall JC (1996) Staining in the brain of *Pachymorpha sexguttata* mediated by an antibody against a *Drosophila* clock-gene product: labeling of cells with possible importance for the beetle's circadian rhythms. *Cell Tissue Res.* 286, 411-29

Frisch B, Hardin PE, Hamblen-Coyle MJ, Rosbach M and Hall JC (1994) A promoterless *period* gene mediates behavior rhythmicity and cyclical *per* expression in a restricted subset of the *Drosophila* nervous system. *Neuron* 12: 555-570

Gentile C, Rivas GB, Meireles-Filho AC, Lima JB, Peixoto AA (2009) Circadian expression of clock genes in two mosquito disease vectors: *cry2* is different. *J.Biol.Rhythms* 24, 444-51

Glaser FT, Stanewsky R (2005) Temperature synchronization of the *Drosophila* circadian clock. *Curr.Biol.* 15, 1352-63

Glossop NR, Lyons LC, Hardin PE (1999) Interlocked feedback loops within the *Drosophila* circadian oscillator. *Science* 286:766

Glossop NR, Houl JH, Zheng H, Ng FS, Dudek SM, Hardin PE (2003) VRILLE feeds back to control circadian transcription of clock in the *Drosophila* circadian oscillator. *Neuron* 37:249–261

Goto SG, Denlinger DL (2002) Short-day and long-day expression patterns of genes involved in the flesh fly clock mechanism: *period*, *timeless*, *cycle* and *cryptochrome*. *J Insect Physiol* 48:803–816

Gotter AL, Levine JD, Reppert SM (1999) Sex-linked *period* genes in the silkworm, *Antheraea pernyi*: Implication for circadian clock regulation and the evolution of sex chromosomes. *Neuron* 24: 953-965

Grima B, Lamouroux A, Chelot E, Papin C, Limbourg-Bouchon B, Rouyer F (2002) The F-box protein *slimb* controls the levels of clock proteins *period* and *timeless*. *Nature*;420:178–182

Guilding, C, Piggins, HD (2007). Challenging the omnipotence of the suprachiasmatic timekeeper: are circadian oscillators present throughout the mammalian brain? *European Journal of Neuroscience* 25: 3195-3216

Hall JC (2003) Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila* and other insects. *Adv.Genet.* 48, 1-280

Hardin PE (2006) Essential and expendable features of the circadian timekeeping mechanism. *Curr Opin Neurobiol* 16:686–692

Hastings M and Maywood ES (2000) Circadian clocks in the mammalian brain. *Bioessays* 22: 23-31

Hediger, M, Niessen M, Wimmer EA, Dubendorfer A, Bopp D (2001) Genetic transformation of the housefly *Musca domestica* with the lepidopteran derived transposon piggyBac. *Insect Mol.Biol.* 10: 113-119

Helfrich-Förster C (1995) The *period* clock gene is expressed in central nervous system neurons which also produce a neuropeptide that reveals the projections of circadian pacemaker cells within the brain of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:612–616

Helfrich-Förster C, Edwards T, Yasuyama K, Wisotzki B, Schneuwly S, Stanewsky R, Meinertzhagen IA, Hofbauer A (2002) The extraretinal eyelet of *Drosophila*: development, ultrastructure, and putative circadian function. *J Neurosci* 22:9255–9266

Chang DC, McWatters HG, Williams JA, Gotter AL, Levine JD, Reppert SM (2003) Constructing a feedback loop with circadian clock molecules from the silkworm, *Antheraea pernyi*. *J Biol Chem* 278:38149–38158

Ishikawa T, Matsumoto A, Kato T Jr, Togashi S, Ryo H, Ikenaga M, Todo T, Ueda R, Tanimura T (1999) DCRY is a *Drosophila* photoreceptor protein implicated in light entrainment of circadian rhythm. *Genes Cells* 4:57–65

Kadener S, Menet JS, Sugino K, Horwich MD, Weissbein U, Nawathean P, Vagin VV, Zamore PD, Nelson SB, Rosbash M (2009) A role for microRNAs in the *Drosophila* circadian clock. *Genes Dev.* Sep 15;23(18):2179-91

Kadener S, Stoleru D, McDonald M, Nawathean P, Rosbash M (2007) *Clockwork Orange* is a transcriptional repressor and a new *Drosophila* circadian pacemaker component. *Genes Dev.* 21(13):1675-86.

- Kamae Y, Tanaka F, Tomioka K (2010) Molecular cloning and functional analysis of the clock genes, *Clock* and *cycle*, in the firebrat *Thermobia domestica*. *J. Insect Physiol*
- Kim EY, Edery I (2006) Balance between DBT/CKIepsilon kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of *Drosophila* CLOCK protein. *Proc. Natl. Acad. Sci* 103:6178
- King DP, Zhao Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS (1997) Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89, 641-53
- Kivimäe S, Saez L, Young MW. (2008) Activating PER Repressor through a DBT-Directed Phosphorylation Switch. *PLoS Biol.* 29;6(7):e183
- Kloss B, Price JL, Saez L, Blau J, Rothenfluh A, Wesley CS, Young MW (1998) The *Drosophila* Clock Gene *double-time* Encodes a Protein Closely Related to Human *Casein Kinase 1ε*. *Cell* 94:97–107
- Kloss B, Rothenfluh A, Young MW, Saez L (2001) Phosphorylation of *period* is influenced by cycling physical associations of *double-time*, *period*, and *timeless* in the *Drosophila* clock. *Neuron* 30, 699-706
- Ko HW, Jiang J, Edery I. (2002) Role for Slimb in the degradation of *Drosophila* Period protein phosphorylated by Doubletime. *Nature* 420:673–678
- Koh K, Zheng X, Sehgal A (2006) JETLAG resets the *Drosophila* circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science* 312, 1809-12
- Kondo T and Ishiura M (2000) The circadian clock of *cyanobacteria*. *Bioessays* 22: 10-15
- Konopka RJ, Benzer S (1971) *Clock* mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 68, 2112-6
- Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Sherman LP, Weaver DR, Xiaowei J, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM (1999) mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell* 98: 193-205
- Lee CM, Su MT, Lee HJ (2009) *Pigment dispersing factor*: an output regulator of the circadian clock in the German cockroach. *J. Biol. Rhythms* 24, 35-43
- Levine JD, Funes P, Dowse HB, Hall JC (2002) Signal analysis of behavioral and molecular cycles. *BMC. Neurosci.* 3: 1
- Levine JD, Sauman I, Imbalzano M, Reppert SM, Jackson FR (1995) Period protein from the giant silkworm *Antheraea pernyi* functions as a circadian clock element in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 15, 147-57

- Lim C, Chung BY, Pitman JL, McGill JJ, Pradhan S, Lee J, Keegan KP, Choe J, Allada R. (2007) *Clockwork orange* encodes a transcriptional repressor important for circadian-clock amplitude in *Drosophila* Curr Biol. Jun 19;17(12):1082-9
- Lin JM, Kilman VL, Keegan K, Paddock B, Emery-Le M, Rosbash M, Allada R (2002) A role for *casein kinase 2alpha* in the *Drosophila* circadian clock. Nature 420, 816-20
- Loher W (1972) Circadian control of stridulation in the cricket *Teleogryllus commodus* Walker. J Comp Physiol 79:173–190
- Low KH, Lim C, Ko HW, Edery I (2008). Natural variation in the splice site strength of a clock gene and species-specific thermal adaptation. Neuron 60, 1054-67
- Majercak J, Sidote D, Hardin PE, Edery I (1999) How a circadian clock adapts to seasonal decreases in temperature and day length. Neuron 24:219–230
- Majercak J, Chen W-F, Edery I (2004) Splicing of the *period* gene 3'-terminal intron is regulated by light, circadian clock factors, and phospholipase C. Mol Cell Biol 24:3359–3372
- Matsumoto A, Ukai-Tadenuma M, Yamada RG, Houl J, Uno KD, Kasukawa T, Dauwalder B, Itoh TQ, Takahashi K, Ueda R, Hardin PE, Tanimura T, Ueda HR (2007) A functional genomics strategy reveals *clockwork orange* as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock. Genes Dev. 21(13):1687-700
- Matsushima A, Sato S, Chuman Y, Takeda Y, Yokotani S (2004) cDNA Cloning of the Housefly Pigment-Dispersing Factor (PDF) Precursor Protein and Its Peptide Comparison among the Insect Circadian Neuropeptides J. Peptide Sci. 10: 82–91
- Martinek S, Inonog S, Manoukian AS, Young MW (2001) A role for the segment polarity gene *shaggy/GSK-3* in the *Drosophila* circadian clock. Cell. Jun 15;105(6):769-79
- McWatters H, Dunlap JC and MillarAJ (1999) Circadian biology: clocks for the real world. Curr. Biol. 9: 633-635
- Meyer P, Saez L, Young MW (2006) PER-TIM interactions in living *Drosophila* cells: an interval timer for the circadian clock. Science 311:226–229
- Miyatake T, Matsumoto A, Matsuyama T, Ueda HR, Toyosato T, Tanimura T (2002) The *period* gene and allochronic reproductive isolation in *Bactrocera cucurbitae*. Proc R Soc Lond B 269:2467–2472
- Moriyama Y, Sakamoto T, Akira M, Sumihare N, Tomioka K (2009) Functional analysis of the circadian clock gene *period* by RNA interference in nymphal crickets *Gryllus bimaculatus*. J.Insect Physiol 55, 396-400

- Naidoo N, Song W, Hunter-Ensor M, Sehgal A (1999) A role for the Proteasome in the light response of the *Timeless* clock protein. *Science* 285, 1737-1741
- Park JH, Helfrich-Förster C, Lee G, Liu L, Rosbash M, Hall JC (2000) Differential regulation of circadian pacemaker output by separate clock genes in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3608–3613
- Peschel N, Chen KF, Szabo G, Stanewsky R (2009) Light-dependent interactions between the *Drosophila* circadian clock factors *cryptochrome*, *jetlag*, and *timeless*. *Curr.Biol.* 19, 241-7
- Peschel N, Veleri S, Stanewsky R (2006) Veela defines a molecular link between *Cryptochrome* and *Timeless* in the light-input pathway to *Drosophila*'s circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103, 17313-8
- Piccin A, Couchman M, Clayton JD, Chalmers D, Costa R, Kyriacou CP (2000) The clock gene *period* of the housefly, *Musca domestica*, rescues behavioral rhythmicity in *Drosophila melanogaster*. Evidence for intermolecular coevolution? *Genetics* 154, 747-58
- Price JL, Blau J, Rothenfluh A, Abodeely M, Kloss B, Young MW (1998) *double-time* is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94:83
- Reddy KL, Wohlwill A, Dzitoeva S, Lin MH, Holbrook S, Storti RV (2000) The *Drosophila* *PAR Domain protein 1 (Pdp1)* gene encodes multiple differentially expressed mRNAs and proteins through the use of multiple enhancers and promoters. *Developmental Biology* 224, 401-414
- Rence BG, Lisy MT, Garves BR, Quilan BJ (1988) The role of ocelli in circadian singing rhythms of crickets. *Physiol Entomol* 13:201–211
- Reppert SM, Tsai T, Roca AL, Šauman I (1994) Cloning of structural and functional homolog of the circadian clock gene *period* from the giant silkworm *Antheraea pernyi*. *Neuron* 13:1167-1176
- Sakamoto T, Uryu O, Tomioka K (2009) The clock gene *period* plays an essential role in photoperiodic control of nymphal development in the cricket *Modicogryllus siamensis*. *J.Biol.Rhythms* 24, 379-90
- Sandrelli F, Costa R, Kyriacou CP, Rosato E (2008) Comparative analysis of circadian clock genes in insects *Insect Mol Biol. Sep*;17(5):447-63
- Sassone-Corsi P (1998) Molecular clocks: mastering time by gene regulation. *Nature* 392:871-874
- Sathyanarayanan S, Zheng X, Xiao R, Sehgal A (2004) Posttranslational regulation of *Drosophila* PERIOD protein by protein phosphatase 2A. *Cell* 116:603

- Sehadova H, Glaser FT, Gentile C, Simoni A, Giesecke A, Albert JT, Stanewsky R (2009) Temperature entrainment of *Drosophila*'s circadian clock involves the gene *nocte* and signaling from peripheral sensory tissues to the brain. *Neuron* 64, 251-66
- Sehadova H, Markova EP, Sehna F, Takeda M (2004) Distribution of circadian clock-related proteins in the cephalic nervous system of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Rhythms* 19, 466-482
- So WV, Rosbach M (1997) Post-transcriptional regulation contributes to *Drosophila* clock gene mRNA cycling. *EMBO J* 16: 7146-7155
- Sokolove PG (1974) Localization of the cockroach optic lobe circadian pacemaker with microlesions. *Brain Res.* 1975 Apr 4;87(1):13-21
- Stanewsky R (2002) Clock mechanism in *Drosophila*. *Cell Tissue Res* 309: 11-26
- Stanewsky R, Kaneko M, Emery P, Beretta B, Wager-Smith K, Kay SA, Rosbash M, Hall JC (1998) The *cry^b* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95:681-692
- Suri V, Qian Z, Hall JC, Rosbach M (1998) Evidence that the TIM light response is relevant to light-induced phase shifts in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 21: 225-234
- Syrova Z, Doležel D, Šauman I, Hodková M (2003) Photoperiodic regulation of diapause in linden bugs: are *period* and *Clock* genes involved? *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 2510-2515
- Šauman I, Hashimi, H (1999) Insect clock: What are they telling us besides time? *Entomological Science* 2(4): 589-596
- Šauman I, Reppert SM (1996) Circadian clock neurons in the silkworm *Antheraea pernyi*: novel mechanisms of period protein regulation. *Neuron* 17:889-900
- Šauman I, Reppert SM (1996) Molecular characterization of prothoracicotropic hormone (PTTH) from the giant silkworm *Antheraea pernyi*: developmental appearance of PTTH expressing cells and relationship to circadian clock cells in central brain. *Dev Biol* 178:418-429
- Šauman I, Tsai T, Roca AL, Reppert SM (1996) Period protein is necessary for circadian control of egg hatching behavior in the silkworm *Antheraea pernyi*. *Neuron* 17, 901-9
- Tomioka K, Chiba Y (1984) Effects of nymphal stage optic nerve severance or optic lobe removal on the circadian locomotor rhythm of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zool Sci* 1:385-394
- Tomioka K, Matsumoto A (2010) A comparative view of insect circadian clock systems. *Cell Mol Life Sci.* May;67(9):1397-406

Toh KL, Jones CR, He Y, Eide EJ, Hinz WA, Virshup DM, Ptacek LJ, Fu YH (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science* 291, 1040-3

Truman JW (1972) Physiology of insect rhythms. II. The silkworm brain as the location of the biological clock controlling eclosion. *J. Comp. Physiol.* 81, 99–114

Ueda HR, Matsumoto A, Kawamura M, Iino M, Tanimura S, Hashimoto S (2002) Genome-wide transcriptional orchestration of circadian rhythms in *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 14048-14052

van der Horst GTJ, Muijtjens M, Kobayashi K, Takano R, Kanno SI, Takao M, de Wit J, Verkerk A, Eker APM, van Leenen D, et al. (1999) Mammalian *Cry1* and *Cry2* are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398: 627-630

Weber F (2009) Remodeling the clock: coactivators and signal transduction in the circadian clockworks. *Naturwissenschaften* 96:321–337

Weber F, Hung HC, Maurer C, Kay SA (2006) Second messenger and Ras/MAPK signalling pathways regulate CLOCK/CYCLE-dependent transcription. *J Neurochem* 98:248–257

Wen CJ, Lee HJ (2008) Mapping the cellular network of the circadian clock in two cockroach species. *Arch Insect Biochem Physiol* 68:215–231

Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, Jones CR, Wu SC, Saigoh N, Saigoh K, Ptacek LJ, Fu YH (2005) Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature* 434, 640-4

Yoshii T, Todo T, Wu Ilbeck C, Stanewsky R, Helfrich-Förster C (2008) *Cryptochrome* is present in the compound eyes and a subset of *Drosophila*'s clock neurons. *J Comp Neurol* 508:952–966

Yu W, Zheng H, Houl JH, Dauwalder B, Hardin PE (2006) PER-dependent rhythms in CLK phosphorylation and E-box binding regulate circadian transcription. *Genes Dev* 20:723

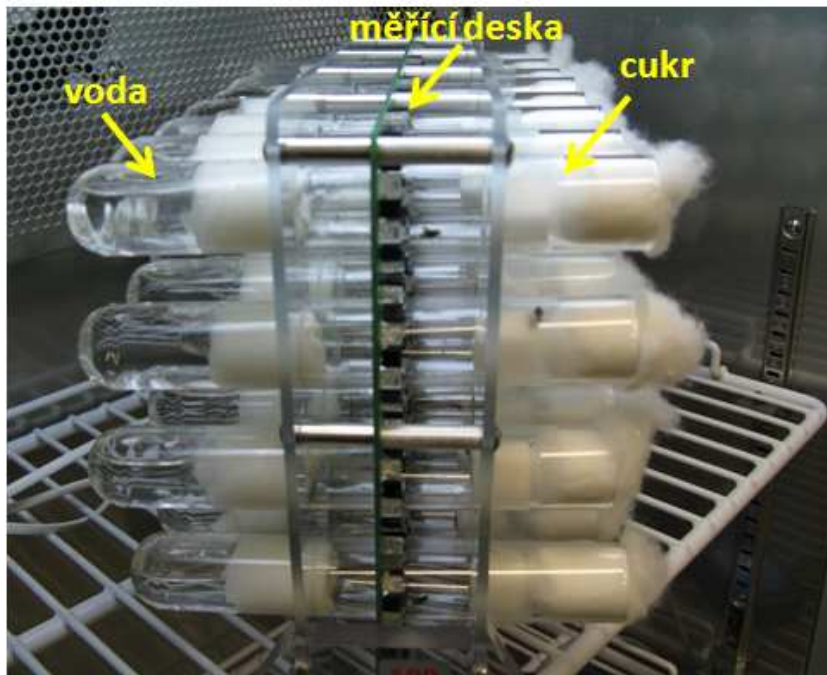
Yuan Q, Metterville D, Briscoe AD, Reppert SM (2007) Insect *cryptochromes*: gene duplication and loss define diverse ways to construct insect circadian clocks. *Mol Biol Evol* 24:948–955

Závodská R, Šauman I, Sehna F (2003) Distribution of PER protein, pigment-dispersing hormone, prothoracicotropic hormone, and eclosion hormone in the cephalic nervous system of insects. *J.Biol.Rhythms* 18, 106-22

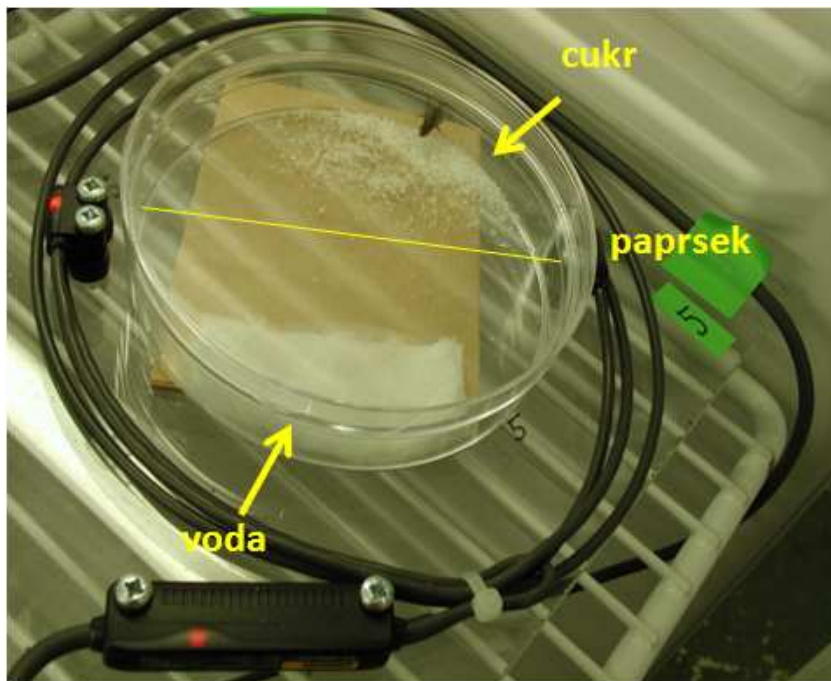
Zhu H, Šauman I, Yuan Q, Casselman A, Emery-Le M, Emery P, Reppert SM (2008) *Cryptochromes* define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *PLoS Biol* 6:138–155

Zhu H, Yuan Q, Briscoe AD, Froy O, Casselman A, Reppert SM (2005) The two CRYs of the butterfly. *Curr.Biol.* 15, R953-R954

PŘÍLOHA 1 – obrázky



obr. P1.1. Měřicí deska LAM se zkumavkami obsahujícími jednu mouchu, na jedné straně vodu a na druhé straně kostku cukru.



obr. P1.2. Petriho miska s cukrem, navlhčenou buničinou a jednou mouchou.

PŘÍLOHA 2

A. Pufry a media (přesný postup dle Molecular Cloning – Sambrook and Russell, 2001)

TAE (50x):

- 242 g Tris
- 57,1 ml kyselina octová
- 100 ml 0,5M EDTA (pH 8,0)
- doplnit do 1 l destilované H₂O

MOPS (10x)

- 0,2 M MOPS (pH 7,0)
- 20 mM acetát sodný
- 10mM EDTA (pH 8,0)

LB medium:

- 10 g trypton
- 5 g kvasnicový extrakt
- 10 g NaCl
- 950 ml destilované H₂O

LB agar:

- 15 g Bacto Agar
- 1 l LB medium

SOC medium:

- 20 g trypton
- 5 g kvasničný extrakt
- 0.5 g NaCl
- 950 ml destilované H₂O
- 20 ml 1 M roztoku glukózy

B. Katalogová čísla použitých kitů a názvy firem

TRI-reagent® - AM9738, Ambion

MinElute PCR Purification kit – 28006, Qiagen

QIAEX®II Gel Extraction Kit – 20051, Qiagen

MinElute Gel Extraction Kit – 28606, Qiagen

High Pure Plasmid Isolation Kit - 11 754 785 001, Roche

FirstChoice® RLM-RACE Kit - AM1700, Ambion

DNeasy Blood&Tissue Kit – 69506, Qiagen

TURBO DNA-free™ Kit - AM1906, Ambion