

Diplomová práce

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích



**Transkripční analýza vybraných stresových proteinů
u larev octomilky, *Drosophila melanogaster*
(Diptera: Drosophilidae)**

Bc. Jaroslava Korbelová

2011

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

Diplomová práce

Korbelová Jaroslava (2011): Transkripční analýza vybraných stresových proteinů u larev octomilky, *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). [Transcriptional analysis of selected stress proteins in larvae of the fruit fly, *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). Mgr. Thesis, in Czech.] – 39 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

We assessed influence of three acclimation regimes and influence of recovery after cold shock (exposure to 0°C for a period of time corresponding to Lt_{25}) on the relative mRNA levels of selected stress proteins using qRT-PCR method. Larvae acclimated at 25°C showed relatively weak upregulation responses to cold shock. Much stronger responses were observed in the larvae that were cold-acclimated at 15°C or 15°C → 6°C prior to cold shock. Two different general trends were distinguished in the response to cold acclimation and cold shock: (a) proteins from families SP70 and SP90 and splice variants *c* and *d* of the transcription factor HSF were upregulated in response to cold acclimation and the levels of their mRNA transcripts further increased after cold shock (for instance, the abundance of *hsp70Aa* mRNA increased up to 300-fold after cold shock (acclimation variant 15°C → 6°C)); (b) four members of the small Hsp family (22, 23, 26 and 27 kDa) and splice variants *a* and *b* of the transcription factor HSF were down-regulated during cold acclimation (for instance, 10-fold in the case of *hsp22*) and the levels of their mRNA transcripts were either unchanged or increased only moderately after the cold shock. A third group of proteins, namely Hsc70, Hsp40 showed no or relatively small changes.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, duben 2011

.....

Jaroslava Korbelová

Poděkování:

Děkuji především svému školiteli Doc. Ing. Vladimíru Košťálovi, CSc. za odborné rady, pomoc při provádění pokusů, podporu a trpělivost po celou dobu naší spolupráce. Mé poděkování patří i ostatním kolegům z Entomologického ústavu, kteří mi byli nápomocni.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Stres.....	1
1.2 Stresové proteiny.....	2
1.3 Typy, struktury a funkce stresových proteinů.....	3
1.3.1 Stresové proteiny rodiny SP70.....	4
1.3.2 Malé stresové proteiny.....	5
1.4 Transkripční faktory tepelného šoku.....	5
1.5 Modelový organismus.....	6
1.6 Cíle práce.....	7
2. Materiál a metodiky	8
2.1 Chov octomilky.....	8
2.2 Aklimační varianty.....	8
2.3 Izolace RNA.....	9
2.4 Reverzní transkripce.....	11
2.5 Testování primerů.....	12
2.6 qRT-PCR.....	13
2.7 Referenční geny.....	14
2.8 Statistické analýzy.....	15
3. Výsledky	16
3.1 Stresové proteiny rodiny 90 (SP90).....	16
3.2 Stresové proteiny rodiny 70 (SP70).....	16
3.3 Stresové proteiny rodiny 40 (SP40).....	19
3.4 Malé stresové proteiny.....	19
3.5 Transkripční faktor tepelného šoku (heat shock factor).....	21
4. Diskuse	25

4.1 Vliv aklimačních režimů na relativní expresi.....	25
4.2 Změny hladin transkriptů stresových proteinů během zotavování.....	26
4.3 Změny hladin transkriptů genu hsf.....	27
5. Závěry.....	28
6. Literatura.....	29

1. Úvod

1.1 Stres

Každý organismus na Zemi, ať už žije v jakémkoliv prostředí, musí čelit stresu. Například stresu způsobenému fluktuacemi environmentálních podmínek, narušením přirozeného prostředí lidmi, či znečištěním. Tyto nevyvážené životní podmínky mají poškozující vliv na všechny úrovně organizace živých organismů: populace, jednotlivé organismy, tkáně i buňky (Parker et al., 1999). Působení stresu ovlivňuje základní parametry života organismu, jako jsou růst, vývoj, reprodukce, či délka života. Můžeme tedy říci, že jedinci pod vlivem stresu celkově neprospívají. Co si ale pod pojmem stres máme představit? Nejprve je důležité si uvědomit, že koncept stresu není absolutní. Životní podmínky, které jsou extrémně stresující pro jeden organismus (například slaná voda pro sladkovodní rybu), mohou být zcela vyhovující pro organismus jiný (slaná voda pro mořskou rybu). Stres musí být definován vždy vzhledem k přirozené ekologické nische studovaného jedince.

V biologii je z pohledu jedince stres chápán jako soubor vnitřních následků vyvolaných působením různých faktorů, takzvaných stresorů. Rozlišujeme dvě skupiny stresorů. První skupinou jsou endogenní faktory, které jsou převážně biologického původu (například patogeny), druhou skupinu tvoří environmentální faktory, které mohou mít fyzikální charakter (teplo, chlad, sucho), či chemickou podstatu (oxidační činidla, těžké kovy). Působení těchto faktorů (stresorů) narušuje buněčnou integritu a přirozené chemické děje probíhající v buňkách. Míra poškození závisí na typu stresu a délce jeho trvání. Primárně se vyskytuje poškození na molekulární úrovni (1), kde zahrnuje syntézu aberantních polypeptidů, oxidaci a denaturaci strukturálních proteinů, změny v kovalentních vazbách enzymů a oxidaci lipidů a nukleotidů (Ananthan et al., 1986). Sekundárně se působení stresu projevuje poškozením struktur (2) (například membrán, filamentů). Enormní stres způsobí rozsáhlé poškození struktur a inhibuje metabolické dráhy (3). Je-li poškození buněk opravitelné (1) (2), snaží se vždy organismus nastolit opětovnou homeostázu. Pokud je však buňka poškozena natolik, že v ní nemohou probíhat ani základní biochemické procesy (3), vstoupí do apoptózy, či odumře nekrotizací.

Cílem každého organismu je vypořádat se s působícími stresory a obnovit vnitřní homeostázu. Každá buňka ovládá různé obranné systémy, které využívá v závislosti na typu

stresoru. Stresová odpověď zahrnuje celý komplex fyziologických procesů, které vedou k zachování rovnováhy vnitřního prostředí organismu. Jedním z nejnámějších mechanismů zdolávání stresu je indukce stresových proteinů. Za vhodných podmínek tento systém hraje roli při buněčném růstu a proliferaci a přispívá k udržení homeostázy. Během působení stresorů pak chrání funkční strukturu proteinů a udržuje buněčnou integritu.

1.2 Stresové proteiny

Všechny buňky (prokaryotické i eukaryotické) mají schopnost indukovat expresi takzvaných stresových proteinů (SP). Tyto proteiny jsou napříč evolucí vysoce konzervované (Burdon, 1986). V rámci některých rodin nalezneme silné homologie. Například u proteinu hsp70 (heat shock protein 70) octomilky *D. melanogaster* a kvasinky *S. cerevisiae* nalezneme 72% shodu aminokyselin (Ingolia et al., 1982).

Stresové proteiny můžeme rozdělit do jednotlivých rodin na základě jejich homologie a molekulové hmotnosti. Hlavními rodinami jsou SP100, SP90, SP70, SP60, SP40 a malé stresové proteiny s molekulovou hmotností menší než 30 kDa (Hoffmann et al., 2003).

Z hlediska stresové odpovědi je patrně nejdůležitější rodina SP70. Do této rodiny patří dva typy proteinů: kognátní formy (70 kDa HSCs, heat-shock cognates) a indukibilní formy (70 kDa HSPs, heat-shock proteins). Kognátní formy proteinů se vyskytují v buňkách víceméně stále a plní různé úlohy v běžném metabolismu buňky za optimálních podmínek. Inducibilní formy jsou indukovány působením stresu, zatímco u nestresovaných buněk je jejich hladina velmi nízká.

Za normálních podmínek se stresové (zejména kognátní) proteiny podílí na procesu skládání (folding) proteinů po syntéze na ribozomu a tedy na formování jejich konečné funkční podoby. Účastní se také v různých metabolických procesech, transportech, signalizaci, buněčnému růstu a vývoji. Je tedy zřejmé, že SP jsou nezbytné pro život každé buňky (Elefant and Palter, 1999; Ellis and van der Vies, 1991; Welch, 1993). 70 kDa HSPs se silně indukují během stresu a chrání buňku před negativními účinky externích stresorů. Bylo prokázáno, že stresové proteiny chrání esenciální proteiny před denaturací, asistují při opravách narušení jejich optimální terciární konformace a účastní se rychlé degradace abnormálně složených proteinů (Sanders, 1990; Welch, 1992).

1.3 Typy, struktury a funkce stresových proteinů

Charakteristika dvou nejznámějších stresových rodin (SP70 a malé stresové proteiny) bude uvedena níže. Další významné stresové proteiny, jež se nacházejí u octomilky *Drosophila melanogaster* (modelový organismus této práce), zobrazuje Tab. 1.

Tab. 1 Rodiny a typy stresových proteinů octomilky *Drosophila melanogaster*

Rodina	Druh	Umístění na chromozomu	Lokace	Funkce
Sp90	<i>hsp83</i>	63BC	cytoplazma	váže specifické proteiny (např. receptory hormonů) a chaperonové polypeptidy do membrán
Sp70	<i>hsp70</i>	87A7/87C1	jádro (cytoplazma)	inducibilní součást stresové odpovědi
Sp70	<i>hsp68</i>	95D	jádro (cytoplazma)	inducibilní typ; funkce neznámá
Sp70	<i>hsc70</i>	88E (HSC4)	cytoplazma	konstitutivní protein vázající komponenty v cytoplasmě
Sp70	<i>hsc71</i>	50E/5C (HSC5)	mitochondrie	konstitutivní protein vázající komponenty v mitochondrii
Sp70	<i>hsc72</i>	10E (HSC3)	endoplazmatické retikulum	konstitutivní protein vázající komponenty v endoplazmatickém retikulu
Sp40	<i>hsp40</i>	?	?	kofaktor <i>hsp70</i>
malé HSPs	<i>hsp22</i>	67BC	mitochondrie	účastní se vývoje a stresové odpovědi
malé HSPs	<i>hsp23</i>	67BC	cytoplazma	účastní se vývoje a stresové odpovědi
malé HSPs	<i>hsp26</i>	67BC	cytoplazma	účastní se vývoje a stresové odpovědi
malé HSPs	<i>hsp27</i>	67BC	jádro	účastní se vývoje a stresové odpovědi
ubiquitin	ubiquitin	?	jádro, cytoplazma	označuje proteiny určené pro degradaci

(Tabulka uvádí výběr nejvýznamnějších zástupců. Jednotlivé druhy jsou uvedeny jako kódující geny.)

1.3.1 Stresové proteiny rodiny SP70

Proteiny rodiny SP70 hrají důležitou roli v buněčné obraně proti stresu. Jak již bylo zmíněno výše, nalezneme je u všech živých organismů (prokaryot i eukaryot). Všechny stresové proteiny rodiny 70 obsahují specifickou funkční doménu. Vysoce konzervovanou oblast v N-terminální části zahrnující vazebnou doménu pro adenosintrifosfát (ATP), zatímco C-terminální oblast je méně konzervovaná a obsahuje vazebné místo, kam se mohou navázat jiné peptidy (Plesofsky-Vig, 1996).

Proteiny rodiny 70 můžeme u octomilky rozdělit do čtyř skupin: cytoplasmatické kognáty (*hsc70* a *hsc70b*), mitochondriální stresové proteiny (*hsc71*), hlavní stresový protein endoplazmatického retikula (*hsc72*) a indukibilní cytoplasmatické (jaderné) stresové proteiny (*hsp70* a *hsp68*).

Hlavní cytoplasmatické kognáty jsou silně koncentrovány okolo jádra. Hojně se vyskytují během vývoje a růstu. Za stresových podmínek se *hsc70* mírně indukuje, ale míra jeho indukce je mnohem nižší než u jeho indukibilního ekvivalentu *hsp70* (Rubin et al., 1993).

Hsc71, stejně jako ostatních 95% mitochondriálních proteinů (Pfanner, 1990), je kódován v jádře, syntetizován v cytoplazmě a translokován do mitochondriální matrix, kde plní svou roli při sestavování a sbalování mitochondriálních proteinů.

Hsc72 se pevně váže na nově syntetizované, nekompletně sestavené, či nesprávně glykosylované proteiny v endoplazmatickém retikulu a zabraňuje jejich vyplavování. (Kassenbrock et al., 1988; Lindquist and Craig, 1988).

Hlavní indukibilní stresový protein, *hsp70*, je u *D. melanogaster* kódován několika homologními geny lokalizovanými na dvou chromozomálních místech (87A7 a 87C1). Během stresu je velmi rychle a hojně upregulován. Například u octomilek vystavených vysoko-teplotnímu šoku byl zaznamenán vzestup četnosti genu *hsp70* již po 4 minutách (Lindquist, 1986). V době zotavování je tento gen translokován do cytoplazmy (Lindquist and Craig, 1988), kde se účastní při degradaci poškozených proteinů.

1.3.2 Malé stresové proteiny

V této práci jsme se zaměřili na malé stresové proteiny o molekulové hmotnosti 22, 23, 26 a 27 kDa. U octomilky *D. melanogaster* je *hsp22* lokalizovaný v mitochondriální matrix (Morrow et al., 2000), *hsp23* a *hsp26* se nachází v cytosolu a *hsp27* v jádře (Beaulieu et al., 1989; Marin and Tanguay, 1996). Každý z těchto proteinů je kódován jedním unikátním genem a všechny tyto geny jsou lokalizovány na lokusu 67BC (Pauli and Tissières, 1990).

Malé stresové proteiny dokáží chránit proteiny před denaturací při působení vysokých teplot (van Montfort, 2001; Sun, 2005), ale i při jiných stresových podmínkách, například při chladu, suchu, hypertonickém stresu, UV či při působení těžkých kovů (Waters, 2008; Dasgupta, 1992). Během stresu jsou malé stresové proteiny indukovány ve velkých množstvích v každé buňce (Arrigo and Landry, 1994), v níž se nachází uvnitř a okolo jádra, váží se jednak na mRNA (Lindquist, 1986) a také na mikrofilamenta, a tvoří s nimi tzv. superagregáty. Má se za to, že touto nekovalentní vazbou na některé komponenty buňky je dosaženo jejich zvýšené stabilizace (Arrigo and Landry, 1994).

1.4 Transkripční faktory tepelného šoku

Klíčem k ovlivnění genové exprese stresových proteinů (jak kognátních, tak inducibilních forem), je transkripční faktor, běžně zvaný faktor tepelného šoku (HSF, heat shock factor). U octomilky *D. melanogaster* byly identifikovány čtyři sestřihové varianty (splicing variants) genu *hsf* (*hsf a*, *hsf b*, *hsf c*, *hsf d*) (Fujikake, 2005).

Obecná struktura HSF obsahuje DNA vazebnou doménu a dva leucinové zipy. Analýza vazebné domény odhalila přítomnost DNA-vazebného motivu "helix-turn-helix" (Craig et al., 1994; Wu et al., 1994). Domény leucinových zipů jsou α helikální oblasti bohaté na leucin, kde každou sedmou aminokyselinou je leucin. Sousedící leucinové zbytky dvou proteinů se mohou navzájem spojovat na každé dvě otáčky α helix a tímto způsobem se mohou tvořit dimery a trimery HSF.

Za normálních podmínek se u *D. melanogaster* nachází HSF v monomerní formě, která je buď slabě vázaná na kognáty HSC nebo je sbalena "do sebe" pomocí leucinových zipů. Monomery HSF nemají DNA-vazebnou aktivitu. Během stresu však dochází k rychlé homotrimerizaci HSF. Trimery se potom hromadí v jádře, kde se váží na tzv. "heat shock

elements" (HSE) v promotorech genů kódujících stresové proteiny a tím spouští jejich rychlou transkripci. Tato transkripční odpověď na stres je velmi rychlá, začíná v řádu několika málo minut. Trimerizaci HSF způsobuje jednak sám tepelný šok, který "rozbalí" leucinové zipy monomerních HSF a také výskyt aberantních, částečně denaturovaných proteinů v buňce po jakémkoli šoku. Kognáty HSC, které původně vázaly monomerní HSF, totiž preferují vazbu na tyto denaturované proteiny a uvolňují tak monomery HSF pro jejich vzájemnou trimerizaci.

1.5 Modelový organismus

Pro naši práci jsme zvolili jako modelový organismus octomilku *Drosophila melanogaster*, která je obecným modelem biologie a genetiky. Jsou k dispozici podrobné znalosti o její fyziologii a kompletně známe její genom. Octomilka je původem tropický druh, má tedy nízkou chladovou odolnost a nízkou schopnost chladové aklimace.

Drosophila melanogaster je často používána pro studium fyziologických odpovědí na různé formy stresu (Hoffmann et al., 2003; Sinclair et al., 2007; Kristensen et al., 2008a). A právě u ní vědci poprvé pozorovali expresi šokových proteinů jako způsob odpovědi na tepelný stres (Ritossa, 1962).

Většina prací se zaměřuje na dospělé. V naší práci jsme ovšem pracovali s plně vzrostlými larvami třetího (posledního) instaru. Je potřeba zdůraznit, že larvy jsou sice nedospělé organismy, avšak morfologicky i fyziologicky plně komplexní a stresu se dokáží bránit silnými stresovými odpověďmi. Jsou tedy vhodné pro studium stresových proteinů.

Smyslem volby pracovat právě s larvami octomilky je hledání možných analogií s muškou *Chymomyza costata* (jiný druh téže čeledi Drosophilidae), která právě v tomto vývojovém stádiu vykazuje nejvyšší chladovou odolnost (tzn. přežívá ve zmrzlém stavu a to i za teplot kapalného dusíku, -196°C) (Moon et al., 1996). Tato práce je součástí dlouhodobějšího výzkumného programu, ve kterém srovnáváme různé fyziologické, biochemické a molekulární parametry larev těchto dvou blízce příbuzných druhů (včetně například transkripční odpovědi šokových proteinů na chladovou aklimaci a stres). Hledáme odpověď na otázku, které fyziologické a biochemické adaptace umožňují larvám *C. costata* přežít zchlazení na teplotu kapalného dusíku? Čím se liší od larev *D. melanogaster*, které přežívají pouhé minuty (max. hodiny po aklimaci) za teploty 0°C ?

1.6 Cíle práce

Cílem práce je detailně popsat transkripční odpověď larev octomilky *D. melanogaster* na chladovou aklimaci a na následný chladový stres. Zaměřujeme se na transkripci genů kódující šokové proteiny různých rodin.

Ptáme se tedy:

1. Zda existuje vliv tří různých aklimačních postupů na relativní expresi vybraných genů. Tyto tři aklimační postupy vyplývají z předchozí práce (Korbelová, 2009). Larvy z jednotlivých aklimačních postupů se navzájem silně liší svojí schopností přežívat v chladu (jejich doba přežití za teploty 0°C se prodlužuje více než 100-násobně).
2. Jak se liší odpověď na chladový stres u larev ze tří aklimačních postupů. Dávka chladového stresu byla zvolena tak, aby odpovídala u všech tří aklimačních variant hodnotě Lt_{25} (tedy takové době vystavení teplotě 0°C, jež způsobí mortalitu právě u 25% larev ve vzorku).

2. Materiál a metodiky

2.1 Chov octomilky

Pro naši práci jsme si jako modelový organismus zvolili octomilku *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae), laboratorní kmen Oregon. Octomilky jsme chovali ve zkumavkách (50 ml) opatřených vatovou zátkou. Jako zdroj potravy slouží mouchám umělá dieta, která se skládá z agaru, kukuřičného šrotu, cukru a kvasnic a je konzervována pomocí methylparabenu (Sigma).

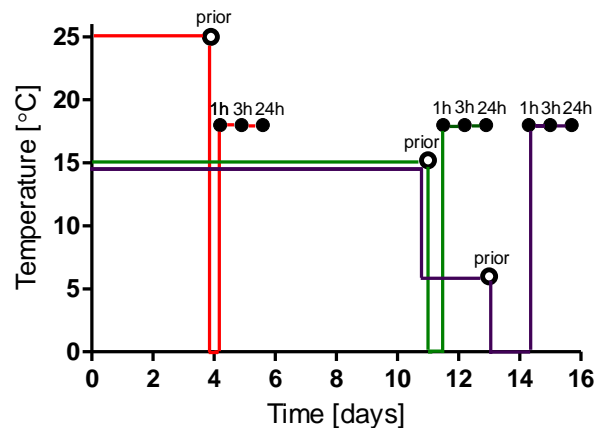
Octomilky jsme nechávali klást v chovných zkumavkách po dobu 24 hodin, při teplotě 18°C, za dlouhého dne (12 hodin světlo : 12 hodin tma). Poté byly octomilky přemístěny do jiné zkumavky. Zkumavky s nakladenými vajíčky byly umístěny do klimatermů s různým nastavením teplot (viz níže: aklimační varianty).

Pro pokusy jsme si vybírali "dospělé" larvy těsně před dosažením finální fáze jejich třetího instaru, tzv. wandering stage, kdy larvy opouští dietu a hledají si vhodné místo pro kuklení.

2.2 Aklimační varianty

Schéma pokusu je znázorněno na Obr. 1. První skupina larev byla chována za konstantních 25°C, druhá skupina za konstantních 15°C. Poslední variantou byl vývoj larev v 15°C po dobu 11 dnů, poté byly larvy vystaveny teplotě 6°C po dobu 2 dnů. Délka vývoje larev je v různých teplotách značně odlišná, bylo pro nás tedy potřebné průběžně kontrolovat, kdy larvy dosáhnou požadovaného stupně vývoje (finální velikost třetího instaru). Poté bylo z každé aklimační varianty odebráno 3 x 10 larev, jež představovaly kontrolní skupinu. Ostatní larvy byly přemístěny do malých plastových tubiček s dietou a vystaveny nízko-teplotnímu šoku při 0°C po dobu $L_{t_{25}}$. Cílem bylo vystavit larvy ze všech tří aklimačních variant takovému nízko-teplotnímu šoku, který způsobí přibližně shodné poškození, tedy mortalitu u 25% larev (hodnota $L_{t_{25}}$ pro larvy chované v 25°C je 15 minut, pro larvy chované v 15°C je 1,5 hodiny a pro larvy z aklimační varianty 15°C → 2 dny 6°C je 30 hodin; tyto hodnoty jsme získali z předchozích pokusů, jsou uvedeny v mé bakalářské

práci). Po vystavení nízko-teplotnímu šoku jsme larvy přemístili do konstantní teploty 18°C, kde probíhalo postupné zotavení. Odebírali jsme 3 x 10 zotavujících se larev po 1h, 3h a 24 hodinách (od konce nízko-teplotního šoku), přidali k nim 200 µl RNA Blue, rozstříhali je a uchovávali v -80°C. Posléze jsme izolovali celkovou RNA a syntetizovali cDNA pomocí reverzní transkripce. Tato cDNA byla nakonec použita jako templát pro kvantitativní analýzu vybraných transkriptů pomocí qRT-PCR.



Obr. 1 Schéma aklimačních variant u modelového organismu *Drosophila melanogaster*. Prázdné body představují odběr "dospělých" larev před vystavením nízko-teplotnímu šoku (vždy 3 x 10 larev). Plné body představují odběr zotavujících se larev 1h, 3h a 24 hodin po ukončení vystavení nízko-teplotnímu šoku (vždy 3 x 10 larev).

2.3 Izolace RNA

RNA jsme izolovali z celých larev pomocí RNA Blue. Metoda izolace pomocí reagens RNA Blue poskytuje čistou a nedegradovanou RNA, která může být následně použita například pro qRT-PCR (v našem případě). Problémem při izolaci RNA je aktivita všudypřítomných RNáz, proto je před prací nutné důkladně očistit pracovní plochu, při práci pak mít nasazené rukavice a používat sterilní zkušavky a automatické pipety určené výhradně pro práci s RNA.

Postup práce:

- z -80°C jsme si vyndali připravené vzorky a přidali k nim 800 μl RNA Blue (Top-Bio s.r.o.), důkladně jsme homogenizovali pomocí ručního homogenizátoru se sterilním plastovým nástavcem
- vzorky jsme ponechali 10 minut při pokojové teplotě a každé 3 minuty je promíchali pomocí Vortexu
- ke každému vzorku jsme přidali 200 μl chloroformu a rázně jsme protřepali po dobu 15 sekund
- vzorky jsme ponechali 5 minut při pokojové teplotě, mezitím jsme si připravili 1,5 ml RNA zkumavky, do kterých jsme napipetovali 400 μl isopropanolu, zkumavky jsme umístili na led
- centrifugovali jsme při 15 000g/10min/4°C, po centrifugaci se utvoří dvě fáze a interfáze, odebrali jsme 400 μl horní (bezbarvé) vodní fáze, jež obsahuje RNA (tuto fázi přidáváme do již připravených zkumavek s isopropanolem)
- necháme RNA vysrážet na ledu po dobu 30 minut
- centrifugovali jsme při 20 000g/20min/4°C, poté jsme odstranili všechnu kapalinu (50% isopropanol)
- k peletě jsme přidali 500 μl 75% etanolu v DEPC vodě (voda s přísádkem diethylpyrocarbonátu, který inaktivuje RNázy), promíchali jsme jemně převrácením
- centrifugovali jsme při 20 000g/5min/4°C, poté jsme odstranili všechnu kapalinu
- vzorky jsme sušili asi 5 minut na vzduchu
- usušenou peletu jsme rozpustili v 11 μl DEPC vody, 1 μl jsme odebrali na změření absorbance (1 μl vzorku + 149 μl vody; faktor ředění = 150)
- změřili jsme absorbanci při 260 nm a vypočítali koncentraci celkové RNA dle následujícího vzorce:

$$\text{Abs}_{260} \times 40 \times \text{faktor ředění} / 1\,000 = \text{koncentrace } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

- vzorky jsme naředili přesně na koncentraci 1 μg celkové RNA/1 μl DEPC vody, od každého vzorku jsme připravili jeden alikvot o objemu 5 μl , který jsme následovně použili pro syntézu cDNA, zbytek vzorku jsme uložili do -80°C

2.4 Reverzní transkripce

Reverzní transkripce je proces katalyzovaný enzymem RNA-dependentní-DNA-polymerázou, při němž se podle templátu mRNA syntetizuje jednovláknová cDNA pomocí Oligo (dT)₁₅ primeru.

Postup práce:

- 5 µl alikvot celkové RNA v PCR zkumavce jsme dali na 5 minut do inkubátoru přehřátého na 70°C, pak jsme vzorky umístili na led
- připravili jsme si Master Mix podle Tab. 2

Tab. 2 Master Mix pro reverzní transkripci (Reverse Transcription System, Promega)

	1x	11x M Mix	22x M Mix
MgCl ₂	4	44	88
10x pufr	2	22	44
dNTP mix	2	22	44
RNasin	0,5	5,5	11
AMV RT	0,8	8,8	17,6
Oligo (dT) ₁₅	1	11	22
tRNA templát	5	X	X
DEPC voda	4,7	51,7	103,4
celkový objem	20 µl	165 µl	330 µl

- 15 µl Master Mixu jsme přidali k 5 µl alikvotu tRNA (celkový objem 20 µl)
- reakci jsme nechali inkubovat při 42°C po dobu 45 minut, poté jsme zahřáli na 95°C po dobu 5 minut
- PCR zkumavky jsme nechali zchladit 5 minut na ledu, a pak je krátce stočili na stolní centrifuze
- vzniklou cDNA jsme naředili 25x, což je vyhovující pro qRT-PCR (do 20 µl reakce jsme přidali 480 µl sterilní vody)
- rozpipetovali jsme alikvoty po 42 µl, zkumavky s alikvoty jsme umístili do -80°C

2.5 Testování primerů

Výhodou navrhování primerů byl námi zvolený modelový organismus *Drosophila melanogaster*, u které je kompletně znám její genom. Primery byly navrženy za pomoci programu CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primers) a následně objednány dva páry primeru (Generi Biotech). U obdržených primerů jsme provedli kontrolní PCR a elektroforézu, abychom ověřili velikost a čistotu produktů a vybrali vhodnější pár z dvojice.

Postup práce:

- primery jsme naředili v 1x TE-pufu (1 mM EDTA, 10 mM Tris-Cl, pH=8,0) na koncentraci 100 pmol/μl, čímž nám vznikl zásobní roztok primeru
- dále jsme primery ředili vodou na koncentraci 20 pmol/μl, čímž nám vznikl pracovní roztok primeru
- připravili jsme si Master Mix podle Tab. 3

Tab. 3 Master Mix pro kontrolní PCR

	1x	3x
iQ Mix (BioRad)	10	30
voda	4,2	12,6
cDNA	5	15
Primer +	0,4	X
Primer -	0,4	X
celkový objem	20 μl	57,6 μl

- kontrolní PCR:

95°C/3 min

94°C/30 s → 60°C/30 s → 72°C/30 s (35x)

72°C/1 min

4°C/10 min

- elektroforeza:
 - připravili jsme si 1,5% agarový gel:
 - 0,375 g agaróza (Sigma)
 - 0,5 ml 50x TAE (40 mM Tris, 20mM kys. octová, 1 mM EDTA, pH=8,0)
 - 24,5 ml voda
 - do první dráhy byl vložen velikostní žebříček (100 bp, Lonza)
 - vzorek jsme smíchali s 2 μ l Loading Dye (Promega), který nám umožní snadné napipetování vzorku do komůrek v gelu (vzorek obarví a zvýší jeho hustotu)
- po proběhnutí elektroforézy jsme gel ponořili na 15 minut do roztoku s obsahem ethidium bromidu (20 ml 10x TE, 180 ml vody, 40 μ l EtBr o koncentraci 1 mg / ml)
- ověřili jsme vizuálně velikost a čistotu PCR produktu

2.6 qRT-PCR

Tato metoda je prováděna na speciálním PCR přístroji, "light cycleru", který umožňuje kontinuálně zaznamenávat přírůstky DNA produktu během každého cyklu. Standardně se používají 96-ti jamkové destičky, do nichž se napipetují vzorky. Ke vzorkům se přidá fluorescenční značka (SYBR Green), která se váže na syntetizovanou dvouvláknovou DNA. Úroveň naměřené fluorescence pak odpovídá množství nasyntetizované nukleové kyseliny. Díky této vysoce senzitivní a robustní metodě jsme byli schopni detekovat i malé rozdíly v hladinách transkriptů námi studovaných genů.

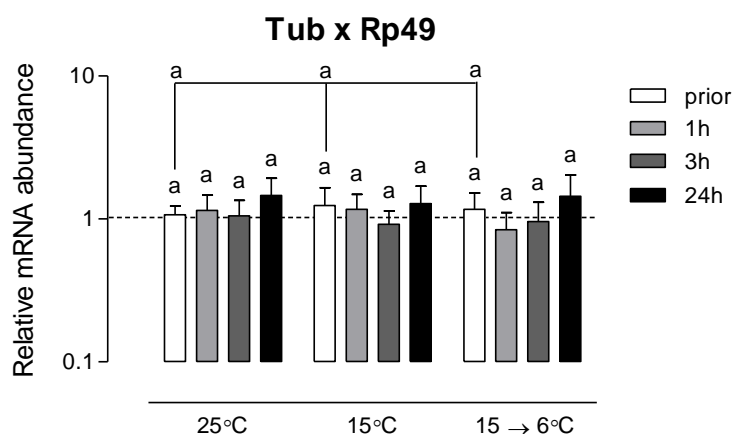
Postup práce:

- z -80°C jsme si vyndali dříve připravené alikvoty (cDNA); z -20°C jsme si vyndali iQ Mix, primery a PCR vodu
- do zkumavky jsme napipetovali 1 000 μ l iQ SYBR Green Supermixu a 420 μ l vody, čímž jsme si připravili Master Mix

- z celkového objemu Master Mixu (1420 μ l), jsme odebrali polovinu a dali ji do jiné zkumavky, čímž nám vznikly dvě zkumavky s Master Mixem, každá o objemu 710 μ l
- do každé z připravených zkumavek jsme přidali 20 μ l primeru (+) a 20 μ l primeru (-)
- do 96-ti jamkové destičky jsme napipetovali po 5 μ l vzorku, ke každému vzorku jsme pak přidali po 15 μ l Master Mixu
- destičku jsme opatřili folií (brání odpaření vzorků) a umístili ji do PCR termocykléru (BioRad, CFX96 Thermal Light Cycler)
- získaná data jsme vyhodnocovali vzhledem ke zvoleným referenčním genům

2.7 Referenční geny

Jako referenční geny bylo nutné zvolit takové geny, které nevykazují kvantitativní nárůst v organismu po jeho vystavení nízko-teplotnímu šoku. Geny *Rp49* a *β -tubulin* se ukázali jako vysoce vyhovující (Ponton, 2011), protože jejich transkripty vykazovaly prakticky konstantní hladinu četnosti (tedy konstantní hodnoty C_T), jak u různých aklimačních variant, tak po vystavení nízko-teplotnímu šoku. Obr. 2 ukazuje vzájemné relativní porovnání četností mRNA transkriptů pro tyto dva geny. Statistická analýza nenalezla žádné významné rozdíly. (*Rp49* je ribozomální protein kódující stavební složku ribozomu; *β -tubulin* kóduje stavební složku buněčného cytoskeletu.)



Obr. 2 Relativní četnosti transkriptů pro β -tubulin vzhledem k četnosti transkriptů pro Rp49 a jejich změny v závislosti na aklimačním postupu a na času zotavování po nízko-teplotním šoku u larev octomilky *D. melanogaster*. Jednotlivé sloupce ukazují průměr \pm směrodatnou odchylku ($n = 3$). Shodná písmena označují sloupce, které se navzájem statisticky významně neliší (post-hoc Tukeyho test, $\alpha = 5\%$). Výsledky testů ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 0.2078$, $P = 0.8180$; (b) zotavení: 25°C: $F = 0.9868$, $P = 0.4463$; 15°C: $F = 0.6321$, $P = 0.6147$; 15°C \rightarrow 6°C: $F = 1.247$, $P = 0.3552$.

2.8 Statistické analýzy

Nejprve jsme hodnoty C_T (critical time) přepočítali na relativní změny celkového množství daného transkriptu ve vzorku jako 100%. Ze získaných hodnot C_T pro Rp49 a β -tubulin jsme vypočítali geometrický průměr, který jsme použili jako referenční hodnotu (Ref) pro relativní kvantifikaci četnosti mRNA transkriptů pro cílové geny (X) pomocí metody dle Pfaffla (2001):

$$(\text{eff Ref}^{C_T \text{Ref}}) / (\text{eff X}^{C_T X}),$$

kde koeficient amplifikační efektivity na jeden PCR cyklus (eff) je roven 1,85 (průměrná hodnota odvozená z předběžných experimentů).

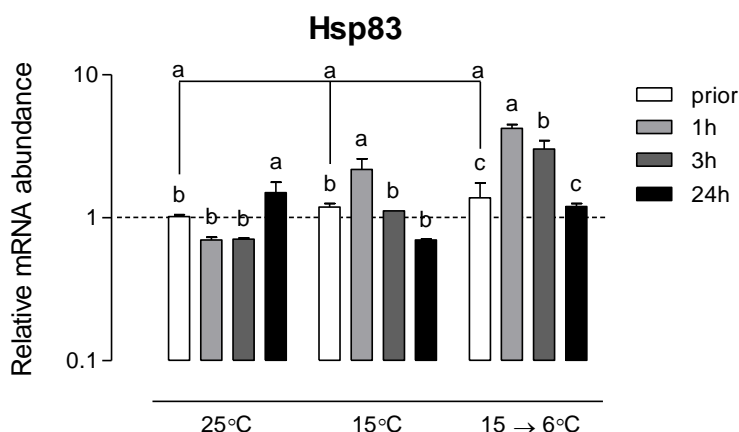
Získaná data jsme následně statisticky vyhodnotili pomocí čtyř nezávislých jednocestných ANOVA testů a následných Tukeyho testů v programu Prism 5 (GraphPad Software). V prvním ANOVA testu (a) jsme posuzovali vliv tří různých aklimačních postupů na relativní expresi vybraných genů. Ve třech dalších ANOVA testech (b) jsme posuzovali vliv času během zotavování po chladovém šoku na relativní expresi vybraných genů. Tukeyho testy byly potom použity pro identifikaci statisticky významných rozdílů mezi jednotlivými aklimačními postupy (a) nebo časy zotavování (b).

3. Výsledky

3.1 Stresové proteiny rodiny 90 (Sp90)

Zjistili jsme, že aklimace nemá vliv na relativní četnost transkriptů genu *hsp83* (Obr. 3).

Během zotavování larev po nízko-teplotním šoku se četnosti transkriptů mírně, ale statisticky významně, zvyšovaly (maximálně pouze 4-násobně). U larev chovaných v 25°C bylo maxima dosaženo až po 24 hodinách od konce chladového šoku. U larev z aklimačních variant 15°C a 15°C → 6°C bylo nejvíce transkriptů přítomno v čase 1 hodina od konce nízko-teplotního šoku a dále se již množství postupně snižovalo až na výchozí úroveň.



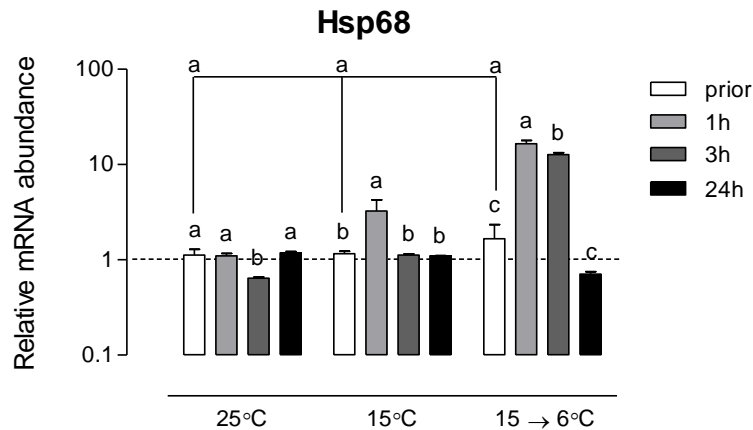
Obr. 3: Relativní četnosti transkriptů pro *hsp83*. ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 2.046$, $P = 0.2102$; (b) zotavení: 25°C: $F = 22.64$, $P = 0.0003$; 15°C: $F = 27.24$, $P = 0.0001$; 15°C → 6°C: $F = 59.89$, $P < 0.0001$. Ostatní popisky viz Obr. 2.

3.2 Stresové proteiny rodiny 70 (Sp70)

Při porovnání vlivu aklimačních postupů na relativní expresi genu *hsp68* nenajdeme žádný statisticky významný rozdíl (Obr. 4).

Během zotavování se četnosti transkriptů genu *hsp68* chovají různě podle aklimační varianty. U larev vyvíjejících se v 25°C se nemění. U larev chovaných při 15°C se během zotavování mírně (zhruba 4-násobně) zvyšují v čase 1 hodina od konce nízko-teplotního šoku.

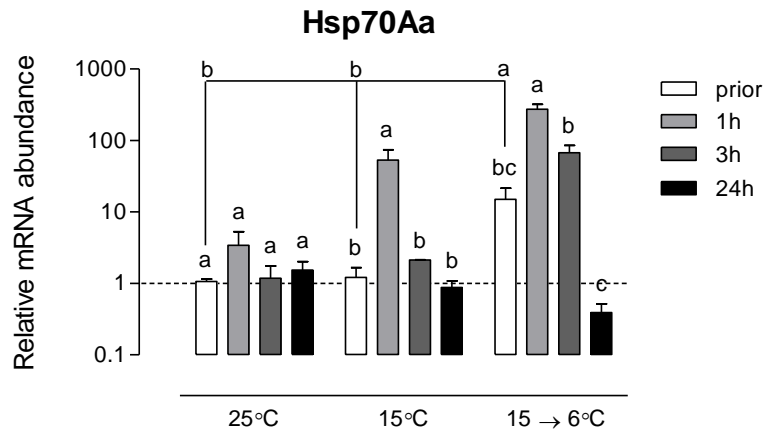
U aklimační varianty 15°C → 6°C se během první hodiny zotavovacího procesu 16-krát upreguluje množství transkriptu a i během třetí hodiny si drží stále poměrně vysokou hladinu, teprve poté klesá zpět na výchozí hladinu.



Obr. 4: Relativní četnosti transkriptů pro *hsp68*. ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 1.753$, $P = 0.2514$; (b) zotavení: 25°C: $F = 20.78$, $P = 0.0004$; 15°C: $F = 13.19$, $P = 0.0018$; 15°C → 6°C: $F = 276.7$, $P < 0.0001$. Ostatní popisky viz Obr. 2.

U genu *hsp70Aa* je zřejmé, že aklimační režimy mají vliv na relativní četnosti transkriptů (Obr. 5). U larev chovaných v 25°C i v 15°C je množství transkriptů relativně nízké, statisticky stejné. U larev aklimační varianty 15°C → 6°C je hladina mRNA transkriptu 11-krát zvýšená.

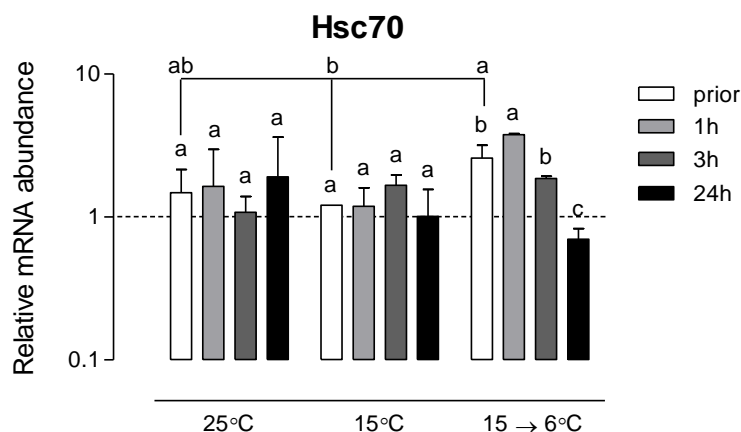
Nejsilnější odpověď na stres je u všech aklimačních variant patrná v čase 1 hodina od konce nízko-teplotního šoku, poté četnosti transkriptů relativně rychle klesají až na výchozí úroveň. U aklimační varianty 15°C se relativní četnosti transkriptů během první hodiny zotavování zvyšují až 65-krát, u varianty 15°C → 6°C až 300-krát.



Obr. 5: Relativní četnosti transkriptů pro *hsp70Aa*. ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 13.48$, $P = 0.0060$; (b) zotavení: 25°C: $F = 3.513$, $P = 0.0689$; 15°C: $F = 18.39$, $P = 0.0006$; 15°C → 6°C: $F = 79.13$, $P < 0.0001$. Ostatní popisky viz Obr. 2.

Porovnáme-li statisticky hodnoty transkriptů pro gen *hsc70* zjistíme, že aklimace má mírný vliv na jejich četnosti (Obr.6). Mírně zvýšená hodnota je u varianty 15°C → 6°C (dvojnásobek hodnoty u varianty 25°C).

U variant 25°C a 15°C neovlivňuje čas během zotavování po chladovém šoku relativní expresi genu *hsc70*. U varianty 15°C → 6°C jsme našli statistické rozdíly v četnosti transkriptů a to takové, že nejvyšší hodnoty byly nalezeny v čase 1 hodina od konce nízko-teplotního šoku, poté se hladiny transkriptu postupně snižovaly.

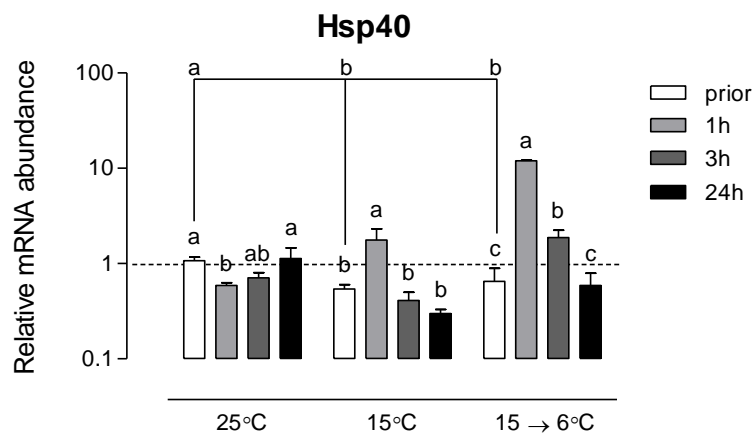


Obr. 6: Relativní četnosti transkriptů pro *hsc70*. ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 5.947$, $P = 0.0377$; (b) zotavení: 25°C: $F = 0.2760$, $P = 0.8412$; 15°C: $F = 1.695$, $P = 0.2446$; 15°C → 6°C: $F = 53.25$, $P < 0.0001$. Ostatní popisky viz Obr. 2.

3.3 Stresové proteiny rodiny 40 (Sp40)

Při zkoumání vlivu aklimace na relativní expresi genu *hsp40* byly nalezeny statistické rozdíly mezi jednotlivými aklimačními postupy (Obr. 7). Varianty 15°C, 15°C → 6°C vykazaly mírně snížené hladiny oproti variantě 25°C.

Larvy aklimační varianty 25°C nebyly schopné během doby zotavování reagovat změnou množství transkriptu. Larvy aklimačních variant 15°C a 15°C → 6°C reagovaly zvýšením hladiny transkriptu (maximálně 11-krát) a to během první hodiny během zotavování, následně se hladiny transkriptů postupně snižovaly.



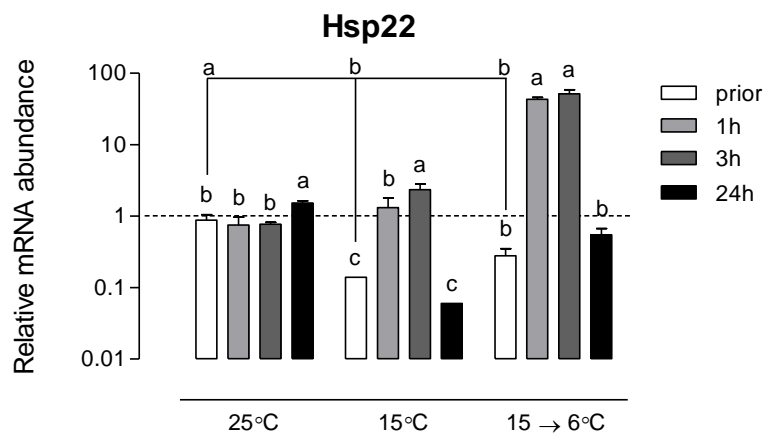
Obr. 7: Relativní četnosti transkriptů pro *hsp40*. ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 9.889$, $P = 0.0126$; (b) zotavení: 25°C: $F = 6.579$, $P = 0.0149$; 15°C: $F = 18.44$, $P = 0.0006$; 15°C → 6°C: $F = 1543$, $P < 0.0001$. Ostatní popisky viz Obr. 2.

3.4 Malé stresové proteiny

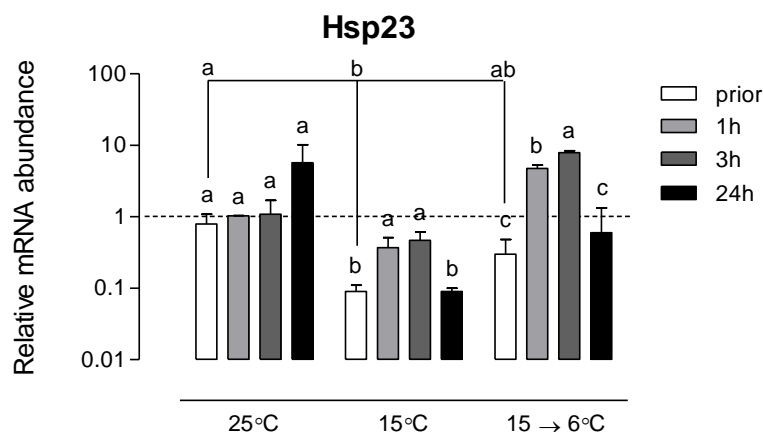
Zjistili jsme, že všechny námi studované malé stresové proteiny (Obr. 8, 9, 10, 11) se chovají v odpovědi na aklimaci a chladový šok velmi podobně. Následující popis je proto platný pro všechny malé šokové proteiny.

U vlivu aklimace byly hladiny transkriptů nejvyšší u larev chovaných v 25°C. U larev aklimačních variant 15°C a 15°C → 6°C byly hladiny transkriptů vždy nižší, a to většinou i statisticky významně.

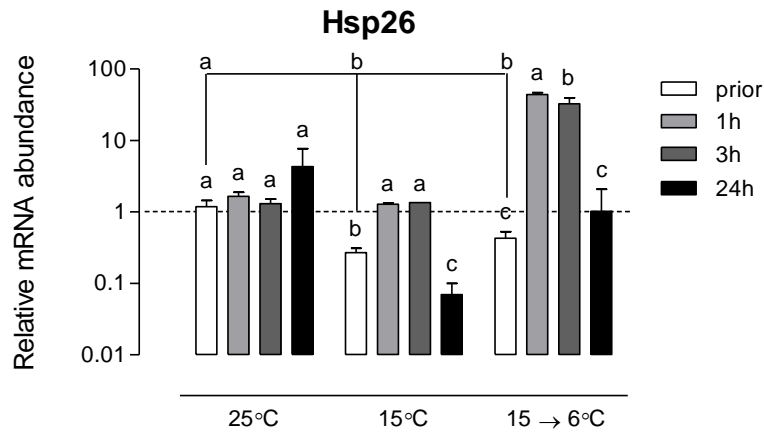
Obecně lze říci, že u varianty 25°C je pozorovatelné mírné zvýšení hladiny transkriptů v čase 24 hodin od konce nízko-teplotního šoku (tato změna byla však statisticky významná pouze u *hsp22*). Během zotavování larev z aklimační varianty 15°C byly hladiny upregulovány v časech 1 a 3 hodiny od konce nízko-teplotního šoku. Přesto však i tyto zvýšené hladiny byly relativně nízké vzhledem k výchozí hodnotě u varianty 25°C. Nejsilnější odpověď na chladový šok byla systematicky pozorována u larev aklimační varianty 15°C → 6°C, kde během první a třetí hodiny zotavování byly transkripty upregulovány 40 – 50-krát (nejsilněji u *hsp22* a *hsp26*).



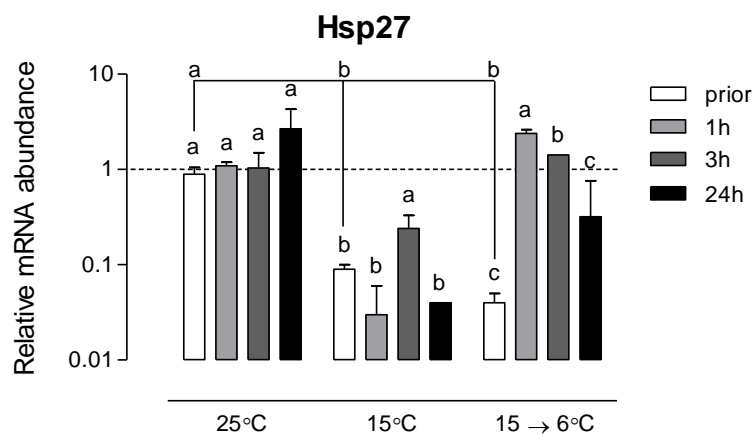
Obr. 8: Relativní četnosti transkriptů pro *hsp22*. ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 41.15$, $P = 0.0003$; (b) zotavení: 25°C: $F = 17.82$, $P = 0.0007$; 15°C: $F = 31.41$, $P < 0.0001$; 15°C → 6°C: $F = 146.4$, $P < 0.0001$. Ostatní popisky viz Obr. 2.



Obr. 9: Relativní četnosti transkriptů pro *hsp23*. ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 9.457$, $P = 0.0140$; (b) zotavení: 25°C: $F = 3.223$, $P = 0.0825$; 15°C: $F = 11.48$, $P = 0.0029$; 15°C → 6°C: $F = 146.3$, $P < 0.0001$. Ostatní popisky viz Obr. 2.



Obr. 10: Relativní četnosti transkriptů pro *hsp26*. ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 27.45$, $P = 0.0010$; (b) zotavení: 25°C: $F = 2.311$, $P = 0.1528$; 15°C: $F = 874.4$, $P < 0.0001$; 15°C → 6°C: $F = 102.5$, $P < 0.0001$. Ostatní popisky viz Obr. 2.

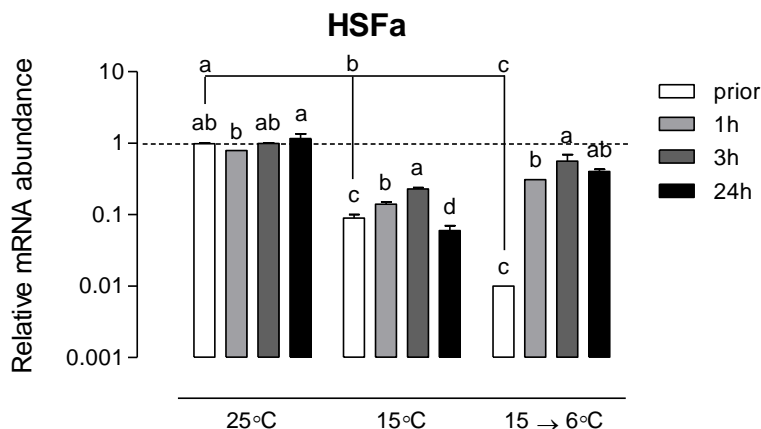


Obr. 11: Relativní četnosti transkriptů pro *hsp27*. ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 79.36$, $P < 0.0001$; (b) zotavení: 25°C: $F = 2.954$, $P = 0.0980$; 15°C: $F = 12.40$, $P = 0.0022$; 15°C → 6°C: $F = 55.48$, $P < 0.0001$. Ostatní popisky viz Obr. 2.

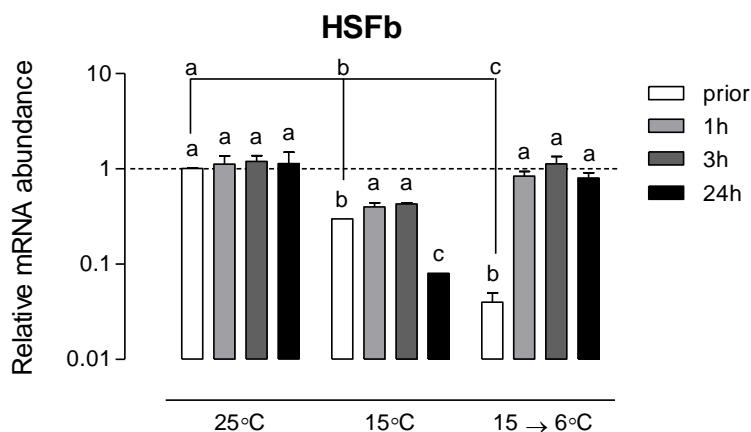
3.5 Transkripční faktor tepelného šoku (heat shock factor)

U sestřihových (splicing) variant *a* a *b* genu *hsf* pozorujeme jasný, statisticky významný vliv aklimačních postupů na četnost transkriptů (Obr. 12 a 13). Nejvyšší exprese byla zjištěna u larev aklimační varianty 25°C, naopak nejnižší u 15°C → 6°C (až 100-násobný pokles u sestřihové varianty *a*).

Odpověď na chladový šok se mění v závislosti na aklimační variantě: Žádná odpověď u aklimační varianty 25°C. Mírná nebo výrazná upregulační odpověď u variant 15°C nebo 15°C → 6°C. I přes výraznou upregulaci po chladovém šoku nedosahují však četnosti ani výchozí hladiny u varianty 25°C (díky předchozí, až 100-násobné, downregulaci během aklimace).



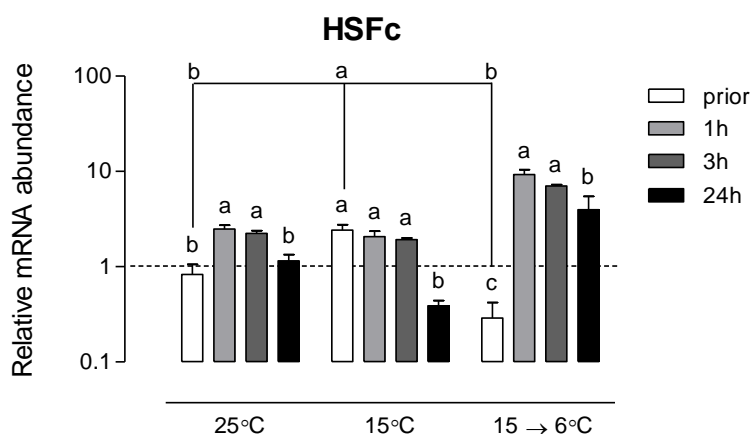
Obr. 12: Relativní četnosti transkriptů pro *hsf a*. ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 2609$, $P < 0.0001$; (b) zotavení: 25°C: $F = 7.337$, $P = 0.0110$; 15°C: $F = 166.0$, $P < 0.0001$; 15°C → 6°C: $F = 36.00$, $P < 0.0001$. Ostatní popisky viz Obr. 2.



Obr. 13: Relativní četnosti transkriptů pro *hsf b*. ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 11345$, $P < 0.0001$; (b) zotavení: 25°C: $F = 0.3362$, $P = 0.7999$; 15°C: $F = 177.1$, $P < 0.0001$; 15°C → 6°C: $F = 36.83$, $P < 0.0001$. Ostatní popisky viz Obr. 2.

Nejvyšší hladinu transkriptů genu *hsf c* měly larvy chované v 15°C, larvy aklimačních variant 25°C a 15°C → 6°C vykazovaly nižší, statisticky navzájem shodnou hladinu transkriptů (Obr. 14).

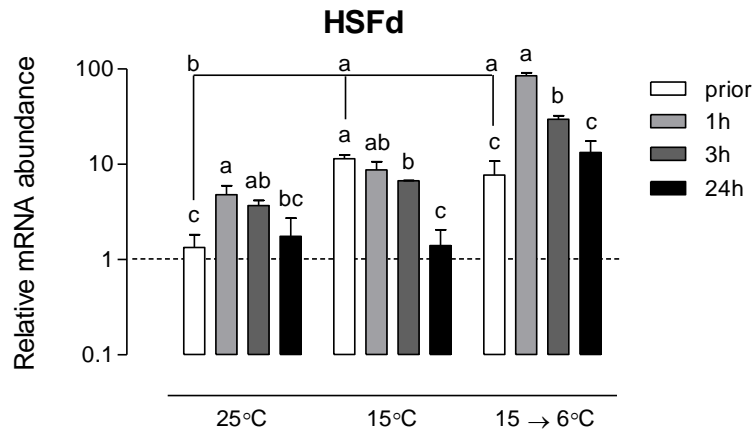
U larev aklimační varianty 25°C docházelo během zotavování k mírné upregulaci transkriptů. Silněji reagovaly larvy z varianty 15°C → 6°C, u nichž docházelo až k 30-násobné upregulaci a to v čase 1 hodina od konce nízko-teplotního šoku.



Obr. 14: Relativní četnosti transkriptů pro *hsf c*. ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 59.52$, $P = 0.0001$; (b) zotavení: 25°C: $F = 48.01$, $P < 0.0001$; 15°C: $F = 46.82$, $P < 0.0001$; 15°C → 6°C: $F = 47.83$, $P < 0.0001$. Ostatní popisky viz Obr. 2.

Silný vliv aklimačních postupů na četnosti transkriptů genu *hsf* byl prokázán u sestřihové varianty *d* (Obr. 15). Relativně nízká hodnota byla zjištěna u larev z varianty 25°C, vyšší hodnoty (statisticky stejné) měly larvy z variant 15°C a 15°C → 6°C.

Statistické analýzy potvrdily silnou odpověď na chladový šok (vliv času během zotavování) tedy na expresi sestřihové varianty *d* u všech aklimačních variant. Nejčetnější byly hladiny transkriptů 1 hodinu od konce nízko-teplotního šoku. Nejvýrazněji reagovaly larvy aklimační varianty 15°C → 6°C, kde docházelo až k 80-násobnému zvýšení transkriptů oproti výchozí hladině u varianty 25°C.



Obr. 15: Relativní četnosti transkriptů pro *hsf d*. ANOVA: (a) vliv aklimace: $F = 21.74$, $P = 0.0018$; (b) zotavení: 25°C: $F = 11.28$, $P = 0.0030$; 15°C: $F = 41.16$, $P < 0.0001$; 15°C → 6°C: $F = 196.7$, $P < 0.0001$. Ostatní popisky viz Obr. 2.

4. Diskuse

Tato práce popisuje vliv tří různých aklimačních postupů a vliv času během zotavování po chladovém šoku na relativní expresi vybraných genů kódujících stresové proteiny u larev octomilky *D. melanogaster*. Většina dosavadních prací se zaměřovala na mapování změn během působení stresu. Bylo ale zjištěno, že převaha genů/proteinů je upregulována spíše během fáze zotavování (Clark and Worland, 2008), kdy probíhají v organismu opravy způsobené stresem, než v průběhu samotného stresu.

4.1 Vliv aklimačních režimů na relativní expresi

Aklimační režimy jsme zvolili tak, aby mezi jednotlivými skupinami larev bylo možné nalézt jednoznačné rozdíly v přežívání chladového šoku. Je známo, že *D. melanogaster* a jiné druhy čeledi Drosophilidae dokáží zlepšit toleranci chladového šoku, pokud jsou chovány za relativně nízkých teplot (Goto and Kimura, 1998; Ohtsu et al., 1998; Ayrinhae et al., 2004; Rako and Hoffmann, 2006). S využitím poznatků z předchozí (bakalářské) práce jsme zvolili tři aklimační varianty, kdy byly larvy chovány za konstantních teplot 25°C a 15°C a ve třetí variantě nejprve za konstantní teploty 15°C po dobu 11 dnů a poté byly vystaveny teplotě 6°C po dobu 2 dnů.

Předpokládali jsme, že u larev chovaných v 25°C budou četnosti transkriptů nízké (oproti ostatním variantám), neboť tato teplota je pro vývoj larev optimální a larvy tedy "nemají potřebu" upregulovat stresové proteiny. Naše hypotéza se potvrdila. U larev chovaných za konstantní teploty 15°C jsme zaznamenali pouze down-regulaci všech malých stresových proteinů (22, 23, 26 a 27) a *hsp40*. U larev aklimační varianty 15°C → 6°C docházelo k upregulaci inducibilních proteinů rodin SP90 a SP70 (11-násobné zvýšení u *hsp70Aa*). Znamená to tedy, že vystavení teplotě 6°C má na larvy octomilky poškozující vliv a larvy se snaží s tímto stresem vypořádat upregulací stresových proteinů.

Larvy i dospělci jsou velmi náchylné k poškození chladem, vývojovým prahem pro dospělé je teplota 9 - 10°C (Cohet & David, 1980), při teplotě 7°C ztrácí nervovou a svalovou dráždivost (Hosler et al., 2000) a rozsáhlá mortalita nastává při méně než -5°C (Czajka & Lee, 1990).

4.2 Změny hladin transkriptů stresových proteinů během zotavování

V této práci jsme potvrdili známý fakt, že odpověď na stres je velmi rychlá. Většina stresových proteinů je indukována během několika málo minut a během první hodiny zotavování po tepelném šoku dosáhnou hladiny transkriptů maximálního množství (Lindquist, 1986), poté jejich hladiny postupně klesají. Tento obecný vzorec chování platí pro většinu stresových proteinů.

Zvolenými časy odběru larev během zotavování (1h, 3h a 24h od konce nízko-teplotního šoku) jsme se snažili co možná nejlépe vystihnout čas (a) nejvyšší četnosti transkriptu (1h), (b) postupného snižování množství transkriptu (3h) a (c) vrácení hladiny transkriptu na jeho původní úroveň (24h). Ideální by jistě bylo odebírat vzorky larev každou hodinu, ovšem tento postup by byl časově a finančně velmi náročný.

Stresové proteiny rodin SP90 a SP70 se chovají během zotavování podobně. Larvy aklimační varianty 25°C nejsou schopné upregulovat během zotavování stresové proteiny. Naproti tomu larvy aklimačních variant 15°C a 15°C → 6°C jsou schopné silné upregulace během první hodiny zotavovacího procesu (u *hspAa* až 300-násobné zvýšení), poté hladiny transkriptů postupně klesají. Tato silná upregulace může být následkem předchozí aklimace, kdy byly octomilky chovány za relativně nízkých teplot, během kterých již upregulovali stresové proteiny, byly tedy "předpřipravené" na možný chladový šok. Tento způsob chování je znám, jak u rostlin (Goodwin et al., 1996), tak u živočichů. Například u octomilky (*Drosophila*) a masařky (*Sarcophaga*) bylo prokázáno, že pokud probíhá jejich vývoj za nízkých teplot, jsou následně schopné lépe se vypořádat s poškozujícími účinky chladového šoku (Denlinger et al. 1991) díky schopnosti vyšší upregulace stresových proteinů (oproti larvám, jejichž vývoj probíhá za optimálních teplot).

Malé stresové proteiny vykazují během zotavování velmi podobný vzor chování (Colinet, 2009). (Stresový protein Hsp40 se sice ve většině zdrojů řadí do samostatné rodiny, zde ale můžeme říci, že jeho chování během zotavovacího procesu se velmi podobá malým stresovým proteinům). U larev aklimační varianty 25°C se mírně upregulovala četnost transkriptů až 24 hodin od konce nízko-teplotního šoku. U larev chovaných v 15°C docházelo k upregulaci transkriptů během zotavování, ovšem jejich četnosti byly vzhledem k variantě 25°C poměrně nízké. Naopak nejsilněji reagovaly larvy varianty 15°C → 6°C, které upregulovaly transkripty 40 – 50-krát a držely si jejich vysoké hladiny i tři hodiny od konce nízko-teplotního šoku.

4.3 Změny hladin transkriptů genu *hsf*

Faktor tepelného šoku zprostředkovává indukci stresových proteinů v odpovědi na různé formy stresu. Je pravděpodobné, že každá ze čtyř sestřihových variant genu *hsf* (*hsf a*, *hsf b*, *hsf c*, *hsf d*) může mít v organismu jinou funkci. Bylo zjištěno, že hladiny transkriptu *hsf b* se zvyšují po vysoko-teplotním šoku, zatímco četnosti transkriptu *hsf d* se zvyšují po nízko-teplotním šoku (Fujikake, 2005). Naše výsledky tuto tezi podporují.

Je zajímavé, že transkripce *hsf a*, *hsf b* je velmi podobná chování malých stresových proteinů, zatímco *hsf c*, *hsf d* se chovají jako velké stresové proteiny (SP90 a SP70).

Nejsilněji upregulovaným a tedy převládajícím genem u *D. melanogaster* během stresu je *hsp70* (Parsell and Linnquist, 1993; Parsell et al., 1993), což nápadně koreluje s chováním sestřihové varianty *d* genu *hsf*. Může to tedy znamenat, že zvýšení hladiny transkriptů *hsf d* vyvolá následnou upregulaci transkriptů genu *hsp70Aa*.

Vyrovňávání se organismu se stresem je komplexní proces zahrnující mnoho fyziologických pochodů, které jsou vzájemně provázané. Je tedy vždy nutné mít na mysli možné spojitosti a dívat se na problém z různých úhlů pohledu.

5. Závěry

Zjistili jsme, že různé aklimační postupy (25°C, 15°C a 15°C → 6°C) mají vliv na relativní expresi vybraných genů stresových proteinů u larev octomilek *D. melanogaster*:

- chladová aklimace vede jednak ke zvýšení četnosti transkriptů velkých šokových proteinů (obzvláště SP70), ale zároveň ke snížení četnosti transkriptů malých stresových proteinů

Zjistili jsme, že se projevuje vliv času během zotavování po chladovém šoku na relativní expresi vybraných genů stresových proteinů u larev octomilek *D. melanogaster*:

- u většiny stresových proteinů dochází velmi rychle k jejich upregulaci (během první a třetí hodiny od konce nízko-teplotního šoku), poté hladina transkriptů klesá na původní úroveň, tato silná upregulace probíhá u varianty 15°C → 6°C, u varianty 15°C je upregulace nižší a larvy varianty 25°C odpovídají slabě nebo vůbec

Transkripce HSF variant *a* a *b* dobře koreluje s transkripcí malých šokových proteinů, kdežto varianty *c* a *d* korelují s transkripcí velkých šokových proteinů.

6. Literatura

ANANTHAN, J., GOLDBERG, A.L., and VOELLMY, R. (1986). Abnormal proteins serve as eukaryotic stress signals and trigger the activation of heat shock genes. *Science* 232: 522-524.

ARRIGO, A.P. and LANDRY, J. (1994). Expression and function of the low-molecular-weight heat shock proteins. In: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto, R.I., Tissières, A., and Georgopoulos, C., Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 335-373.

AYRINHAÉ, A., DEBAT, V., GILBERT, P., KISTER, A.G., LEGOUR, H., VERGILINO, R., DAVID, J.R. (2004). Cold adaptation in geographical populations of *Drosophila melanogaster*: phenotypic plasticity is more important than genetic variability. *Functional Ecology* 18: 700-706.

BEAULIEU, J.F., ARRIGO, A.P., TANGUAY, R.M. (1989). Interaction of *Drosophila* 27,000 Mr heat-shock protein with the nucleus on heat-shocked and ecdysone-stimulated culture cells. *J. Cell Sci.* 92: 29-36.

BURDON, H. (1986). Heat shock and the heat shock proteins (review article). *Biochem. J.* 240: 313-324.

CLARK, M.S. and WORLAND, M.R. (2008). How insects survive the cold: molecular mechanism – a review. *J. Comp. Physiol B* 178: 917-933.

COHET, Y., DAVID, J. (1980). Geographic divergence and sexual behavior – comparison of mating systems in french and afrotropical populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 54: 161-165.

COLINET, H., LEE, S.F., HOFFMANN, A.A. (2009). Temporal expression of heat shock genes during cold stress and recovery from chill coma in adult *Drosophila melanogaster*.

CRAIG, E.A., WEISSMAN, J.S., and HORWICH, A.L. (1994). Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover. *Cell* 78: 365-372.

- CZAJKA, M.C., LEE, R.E. Jr** (1990) A rapid cold-hardening treatment response protecting against cold shock Indry in *Drosophila melanogaster*. J Exp Biol 148: 245-254.
- DASGUPTA, S., HOHMAN, T.C., CARPER, D.** (1992). Hypertonic stress induces α B-crystallin expression. Exp Eye Res 1992, 54(3): 461-470.
- DENLINGER, D.L., JOPLIN, K.H., CHEN, C.P., LEE, R.E.** (1991). Cold shock and heat shock. In: Lee, R.E., Denlinger, D.L. (Eds.), Insect at Low Temperature. Chapman and Hall Press, New York, pp. 131-148.
- ELEFANT, F. and PALTER, K.B.** (1999). Tissue-specific expression of dominant negative mutant *Drosophila* HSC70 causes developmental defects and lethality. Mol. Biol. Cell 10: 2101-2117.
- ELLIS, R.J. and VAN DER VIES, S.M.** (1991). Molecular chaperones. Annu. Rev. Biochem. 60: 321-347.
- FUJIKAKE, N., NAGAL, Y., POPIEL, H.A., KANO, H., YAMAGUCHI, M., TODA, T.** (2005). Alternative splicing regulates the transcriptional activity of *Drosophila* heat shock transcription factor in response to heat/cold stress. FEBS LETTERS 579 (17): 3842-3848.
- GOODWIN, w., PALLAS, J.A., JENKINS, G.J.** (1996). Transcripts of gene encoding a putative cell wall plasma membráně linker protein are specifically cold induced in *Brassica napus*. Plant Mol. Biol. 31, 771-781.
- GOTO, S.G., KIMURA, M.T.** (1998). Heat- and cold-shock responses and temperature adaptations in subtropical and temperate species of *Drosophila*. Journal of Insect Physiology 44: 1233-1239.
- HOFFMANN, A.A., HALLAS, R.J., DEAN, J.A., SCHIFFER, M.** (2003). Low potential for climatic stress adaptation in a rainforest *Drosophila* species. Science 301: 100-102.
- HOFFMANN, A.A., SORENSEN, J.G., and LOESCHCKE, V.** (2003). Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. J. Therm. Biol. 28: 175-216.
- HOSLER, J.S., BURNS, J.E., ESCH, H.E.** (2000). Flight muscle rating potential and species-specific differences in chill-coma. J Insect Physiol. 46: 621 – 627.

- INGOLIA, T.D., SLATER, M.R., and CRAIG, E.A.** (1982). Mol. Cell. Biol. 2, 1388-1398.
- KASSENBRÖCK, C.K., GARCIA, P.D., WALTER, P., and KELLY, R.B.** (1988). Heavy chain binding protein recognizes aberrant polypeptides translated in vitro. Nature 333: 90-93.
- KRISTENSEN, T.N., HOFFMANN, A.A., OVERGAARD, J., SORENSEN, J.G., HALLAS, R., LOESCHCKE, V.** (2008). Costs and benefits of cold acclimation in field-released *Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 105: 216-221.
- LINDQUIST, S.** (1986). The heat-shock response. Annu. Rev. Biochem. 55: 1151-1191.
- LINDQUIST, S. and CRAIG, E.A.** (1988). The heat-shock proteins. Annu. Rev. Genet. 55: 631-677.
- MARIN, R., TANGUAY, R.M.** (1996). Stage-specific localization of the small heat shock protein Hsp27 during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. Chromosoma 105: 142-149.
- MOON, I., FUJIKAWA, S., SHIMADA, K.** (1996). Cryopreservation of *Chymomyza* Larvae (Diptera: Drosophilidae) at -196°C with Extracellular Freezing. Cryo-Letters 17, 105-110).
- MORROW, G., INAGUMA, Y., KATO, K., TANGUAY, R.M.** (2000). The small heat shock protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* is a mitochondrial protein displaying oligomeric organization. J. Biol. Chem. 275: 31204-31210.
- OHTSU, T., KIMURA, M.T., KATAGIRI, C.** (1998). How *Drosophila* species acquire cold tolerance – quantitative changes of phospholipids. European Journal of Biochemistry 252: 608-611.
- PARKER, E.D., Jr., FORBES, V.E., NIELSEN, S.L., RITTER, C., BARATA, C., BAIRD, D.J., ADMIRAAL, W., LEVIN, L., LOESCHCKE, V., LYYTIKÄINEN-SAARENMAA, P., HØGH-JENSEN, H., CALOW, P., and RIPLEY, B.J.** (1999). Stress in ecological systems. Oikos 86: 179-184.
- PARSELL, D.A., LINQUIST, S.** (1993). The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. Annual Review of Genetics 27: 437-496.

- PARSELL, D.A., TAULIEN, J., LINDQUIST, S.** (1993). The role of heat-shock proteins in thermotolerance. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 339: 279-286.
- PAULI, D. and TISSIÈRES, A.** (1990). Developmental expression of the heat shock genes in *Drosophila melanogaster*. In: *Stress Proteins in Biology and Medicine* (Morimoto, R.I., Tissières, A., and Georgopoulos, C., Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 361-378.
- PFAFFL, M.W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Res.* 29, Art. No. e45.
- PFANNER, N.** (1990). Mitochondrial protein import: unfolding and refolding of precursor proteins. In: *Stress Proteins: Induction and Function* (Schlesinger, M.J., Santoro, M.G., and Garaci, E., Eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 71-77.
- PLESOFSKY-VIG, N.** (1996). The heat shock proteins and the stress response. *The Mycota 3, Biochemistry and Molecular Biology* (Brambl, R. and Marzluf, G.A., Eds.). Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 171-187.
- PONTON, F., CHAPUIS, M.P., PERNICE, M., SWORD, G., SIMPSON, S.J.** (2011). Evaluation of potential reference genes for reverse transcription qPCR studies of physiological response in *Drosophila melanogaster*. doi:10.1016/j.jinsphys.2011.03.014
- RAKO, L., HOFFMANN, A.A.** (2006). Complexity of the cold acclimation response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 52: 94-104.
- RITOSSA, F.** (1962). A new puffing pattern induced by a temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962, 18: 571-573.
- RUBIN, D.M., MEHTA, A.D., ZHU, J., SHOHAN, S., CHEN, X., WELLS, Q.R., and PALTER, K.B.** (1993). Genomic structure and sequence analysis of *Drosophila melanogaster* HSC70 genes. *Gene* 128: 155-163.
- SANDERS, B.M.** (1990). Stress proteins: potential as multitiered biomarkers. In: *Environmental Biomarkers* (McCarthy, J.F. and Shugart, R.L., Eds.). Lewis Publishers, Chelsea, MI, pp. 165-191.

- SINCLAIR, B.J., GIBBS, A.G., KOBERTS, S.P.** (2007). Gene transcription during exposure to, and recovery from, cold and desiccation stress in *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology* 16: 435-443.
- SUN, Y., MACRAE, T.H.** (2005). Small heat shock proteins. Molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci* 2005, 62(21): 2460-2476.
- VAN MONTFORT, R.L.M., SLINGSBY, C., VIERLING, E.** (2001). Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv. Protein chem* 2001, 59: 105-156.
- WATERS, E.R., AEVERMANN, B.D., SANDERS-REED, Z.** (2008). Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes. *Cell Stress Chaperones* 2008, 13(2): 127-142.
- WELCH, W.J.** (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* 72: 1063-1081.
- WELCH, W.J.** (1993). How cells respond to stress. *Sci. Am.* May 1993: 34-41.
- WU, C., CLOS, J., GIORGI, G., HAROUN, R.I., KIM, S.J., RABINDRAN, S.K., WESTWOOD, J.T., WISNIEWSKI, J., and YIM, G.** (1994). Structure and regulation of heat shock transcription factor. In: *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (Morimoto, R.I., Tissières, A., and Georgopoulos, C., Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 395-416.