

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Imunocytochemická lokalizace „hodinového“  
proteinu CLOCK v mozku larev octomilky  
*Chymomyza costata***

Bakalářská práce

**Veronika Francová**

školitel: prof. Ing. Vladimír Košťál CSc.

České Budějovice 2017

## Bakalářská práce

Francová, V., 2017: Imunocytochemická lokalizace „hodinového“ proteinu CLOCK v mozku larev octomilky *Chymomyza costata*. [Immunocytochemical localization of the „clock“ protein CLOCK in larval brains of the drosophilid fly *Chymomyza costata*. Bc. Thesis, in Czech] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### Anotace:

This Theses contributes to neuroanatomic description of photoperiodic calendar in the drosophilid fly *Chymomyza costata*. Photoperiodic calendar is a timekeeper device that is used for orientation in seasonal time. The „clock“ protein CLOCK was localized in lateral and dorsal neurons in the brains of photoperiodically-sensitive larvae of the 3rd instar. We found that protein CLOCK does not exhibit any differences in intensity on daily basis in the LNv 1-4 neurons. Our results indicate that the intensity of signal is modulated on daily basis in the LNv 5 neuron; showing a maximum in early night.

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, 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 19. 4. 2017

.....

Veronika Francová

## Poděkování:

Děkuji prof. Ing. Vladimírovi Košťálovi CSc. za odborné vedení, trpělivost, cenné rady a informace při psaní mé bakalářské práce. S metodami, týkajícími se řešené problematiky, mě seznámili a naučili Dr. Konrad Schöttner a Mgr. Hana Sehadová, Ph. D., kterým také patří můj dík. A také nesmím zapomenout poděkovat celému týmu laboratoře Diapauzy hmyzu ENTÚ BC AVČR, který mi byl celou dobu oporou a vytvářel přátelské prostředí.

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Teoretický rámec práce .....	1
2.1. Fotoperioda a diapauza .....	1
2.2. Struktura a funkce fotoperiodického kalendáře .....	3
2.3. Struktura a funkce cirkadiánních hodin .....	5
2.4. Chymomyza costata.....	6
3. Cíl práce .....	8
4. Materiál a metodiky .....	9
4.1. Modelový organismus.....	9
4.2. Imunocytochemické šetření .....	10
4.3. Konfokální mikroskopie .....	12
4.4. Kvantifikace fluorescentního signálu .....	13
5. Výsledky.....	13
5.1. Neurony LNv 1-4.....	14
5.2. Neuron LNv5 .....	16
5.3. Arborizace.....	18
5.4. Neurony DN.....	20
6. Diskuse.....	22
7. Závěr.....	24
8. Seznam použité literatury.....	24
9. Přílohy .....	31

## Seznam použitých zkratek

*clk* – gen *clock*

CLK – protein CLOCK

CLK-lir – CLK like immunoactivity, lir = značí míru nejistoty, protilátka může reagovat i s jiným antigenem než je CLK, není testována

*cyc* – gen *cycle*

CYC – protein CYCLE

D – tma (dark)

IgG – imunoglobulin G

L – světlo (light)

LD – dlouhý den (long day), 18 hodin světlo: 6 hodin tma

npd – nonphotoperiodic diapause, mutantní kmen

PB – phosphate buffer, fosfátový pufr

*per* – gen *period*

PER – protein PERIOD

SD – krátký den (short day), 12 hodin světlo: 12 hodin tma

*tim* – gen *timeless*

TIM – protein TIMELESS

wt – wild-type, divoký kmen

Zt – Zeitgeber time, čas od rozsvícení světla

# 1. Úvod

Střídání roční doby opakující se v cyklu, probíhá díky otáčení Země kolem Slunce. Rotace Země kolem středové osy má za následek střídání dne a noci během 24 hodin. Těmto podmínkám se musely přizpůsobit již první jednoduché organismy. V evolučním vývoji organismů často vznikaly časoměrné systémy, které slouží k synchronizaci všech funkcí organismu s cykličností okolního prostředí. K orientaci během 24 hodinové periody slouží biologické hodiny, u nichž jsou molekulární a neuroanatomické principy popsány do detailů (poprvé na modelovém organismu *Drosophila melanogaster*). Pro orientaci v ročních dobách se u organismů vyvinul sezónní kalendář, u kterého principy fungování většinou neznáme, tak je tomu právě u hmyzu. Jediná doposud známá informace o tomto časoměrném systému je jeho fungování na bázi sledování změn fotoperiodismu (fotoperioda je definována jako měnící se doba světla a tmy v průběhu dne). Pravděpodobně je založen na kooperaci s molekulárním a neuroanatomickým mechanismem hodin. Cílem této práce je přispět k poznání a porozumění funkce fotoperiodického kalendáře u octomilky *Chymomyza costata*.

## 2. Teoretický rámec práce

### 2.1. Fotoperioda a diapauza

Zástupci hmyzu jsou relativně malí, exotermní živočichové, kteří jsou velmi citliví na sezónní změny v jejich přirozeném prostředí. V důsledku rotace Země kolem Slunce jsou příznivé podmínky střídány podmínkami nepříznivými v každém terestrickém ekosystému. Naklonění zemské osy ( $23,5^\circ$ ) je zodpovědné za prodlužování a zkracování délky dne v průběhu roku. Mění se poměr délky dne a noci je označován jako fotoperioda. V evoluci se velmi často objevovala vysoká citlivost na fotoperiodu. Ačkoliv byla existence fotoperiodismu lidem pravděpodobně známá už spoustu let, klíčovou roli jasně rozpoznali před méně než 100 lety. Průkopnické experimenty fotoperiodické regulace na rostlinách (Garner and Allard, 1920) brzy následovaly výzkumy iniciace fotoperiodismu u mšic (Marcowitch, 1924, 1923) a dalším hmyzu (Kogure, 1933; Sabroskyet al., 1933). U různých organismů, včetně hmyzu, je fotoperiodická regulace životního cyklu chápána jako téměř obecné řešení (Nelson et al., 2010; Danks, 1994, 1987; Tauber et al., 1986; Wilde, 1962).

S nepříznivými podmínkami je hmyz schopen se vypořádat nevšední fenotypovou plastičností včetně změn chování, sezónní metamorfózou, migrací a vstoupením do dormance (Nijhout, 2003; Wolda, 1988; Danilevsky, 1965; Andrewartha, 1952; Danks, 1994). Obměna chování, morfologie, zbarvení, velikosti křídel, kutikulárních struktur mohou buď sloužit jako adaptace pro vylepšení aktivního životního stylu nebo, za zcela nepříznivých podmínek prostředí, jsou součástí strategie přežití při pozastavení aktivity a vývoje. Nepříznivé podmínky nedovolují hmyzu pokračovat v přímém vývoji, např. během zimních mrazů, suchých period nebo během období dešťů a záplav v tropech. Tyto zcela nepříznivé podmínky může hmyz obejít přesunem na příznivější místo (migrací) nebo vstoupením do klidového stádia (dormanci). Ačkoliv je hmyzí migrace na dlouhou (kontinentální) vzdálenost spíše neobvyklá, výjimky existují (Dingle, 1972). Častější strategií pro přečkání drsných podmínek je právě vstoupení do dormance (Southwood, 1962).

Rozlišujeme dva základní typy dormance – kviescenci a diapauzu (MacRae, 2010; Košťál, 2006; Saunders, 2002; Danks, 1987; Lees, 1955; Tauber et al., 1986). Kviescence je přímá odpověď organismu, v jakékoliv fázi jeho vývoje, na nepříznivé environmentální vlivy (zima, sucho, nedostatek potravy). Jakmile tyto nepříznivé podmínky nastanou, životní aktivita je utlumena až do té doby, kdy se podmínky znovu změny na příznivé. Naproti tomu diapauza je centrálně řízené zastavení vývoje v určité, zcela specifické, fázi ontogeneze jako odpověď na tzv. „token stimuli“ neboli na signály z prostředí (Lees, 1955). Tyto signály pracují na principu červené barvy na semaforu. Signály nejsou samy o sobě nepříznivé, pouze informují o riskantním pokračování v přímém vývoji. Fotoperiodický signál (spojený s termoperiodickým signálem) je nejčastěji využíván „token stimuli“ pro řízení sezónních odpovědí nejrůznějších organismů (Nelson et al., 2010).

Diapauzu dále dělíme na fakultativní a obligatorní. Fakultativní diapauza je volitelné rozhodnutí mezi přímým vývojem a vstupem do diapauzy na základě environmentálních vlivů. Obligatorní diapauza, je naopak nedílnou součástí ontogenetického vývoje organismu a nevyžaduje žádné podněty z okolního prostředí. Fakultativní diapauza se pravděpodobně vyskytuje mnohem častěji (Košťál, 2011).

Z ekologického hlediska diapauzu dělíme na zimní (hibernace) a letní (estivace), (Masaki, 1980). Oba ekologické typy se projevují podobnými příznaky, jako jsou zastavení vývoje, tvorba a následné pomalé využití energetických zásob, hluboké fyziologické změny a

zvýšená rezistence vůči stresujícím faktorům z okolního prostředí. Zatímco při vstupu do hibernace reaguje organismus na krátký den (SD), při vstupu do estivace reaguje na dlouhý den (LD)[pozn.: většina druhů hmyzu měří délku noci (Saunders, 2002)]. V rovníkové oblasti se fotoperiodický signál nevyskytuje. Z tohoto důvodu je u mnoha tropických druhů hmyzu nutné, aby dormance nastala buď jako přímá reakce na limitující přírodní faktory, např. sucho, přebytek vody, sezónní změny teploty nebo v předstihu, v reakci na jiné signály z prostředí - roční průběh teploty a rozdělení srážek, biotické vlivy jako je kompetice, predace, změna kvality potravy, apod.(Wolda, 1988; Denlinger, 1986).

Hmyz a jiné organismy mají tedy dva základní časoměrné mechanismy: jednak systém, který je senzitivní k fotoperiodickému signálu a dokáže rozpoznat roční dobu (fotoperiodický kalendář), (Nelson et al., 2010), a dále systém, který umožňuje (biologické cirkadiánní hodiny). Zatímco znalosti cirkadiánních hodin na molekulární úrovni se za poslední století velmi prohloubily (Helfrich-Förster, 2009; Nitabach and Taghert, 2008; Wijnen and Young, 2006; Rosato et al., 2006a, b; Hall, 2003; Dunlap, 1996), fyziologické mechanismy kalendáře (zejména u hmyzu) zůstávají stále nepochopeny (Goto et al., 2010; Kyriacou et al., 2008; Bradshaw and Holzapfel, 2007; Saunders 2005; Danks, 2005; Saunders, 2002; Tauber and Kyriacou, 2001).

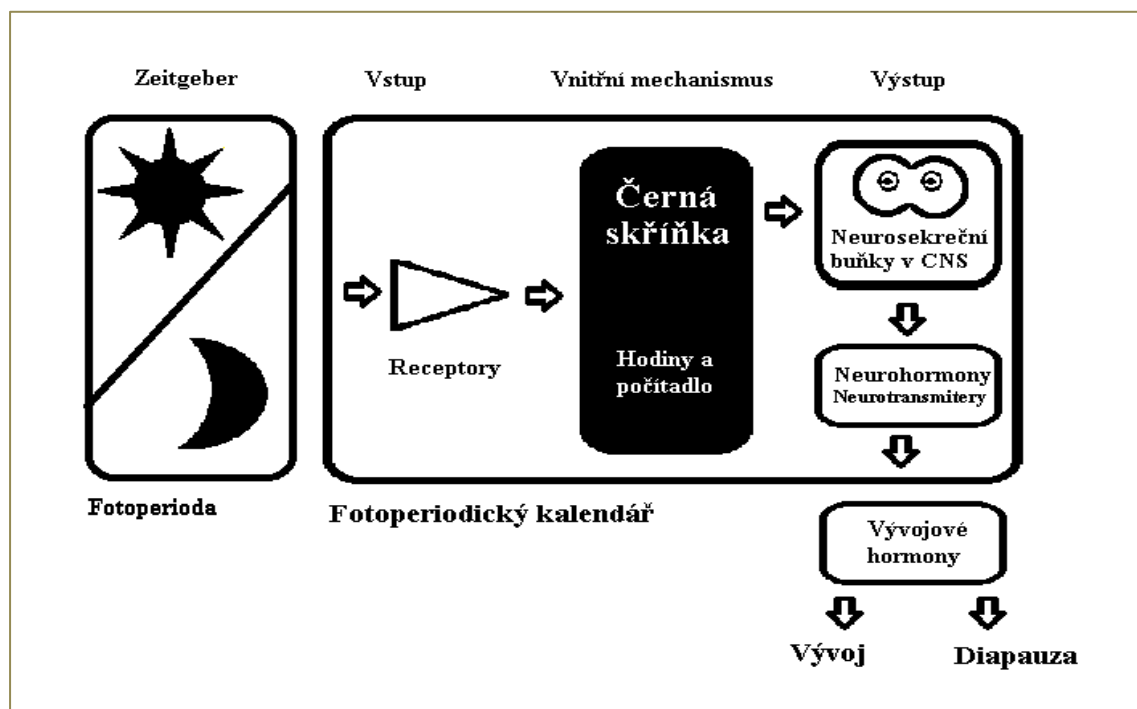
## **2.2. *Struktura a funkce fotoperiodického kalendáře***

V přírodě je fotoperioda poměrem světla a tmy v rámci jednoho solárního dne. Obecně, včetně laboratorních podmínek, se jedná o poměr fotofáze a skotofáze (světelná fáze: temnostní fáze, L: D) v jednom světelném cyklu. V laboratorních podmínkách je možné měnit poměr L a D, dokonce se celková délka světelného cyklu nemusí rovnat 24 hodinám. U hmyzu, který byl v laboratorních podmínkách vystaven různé(24 hodinové) fotoperiodě (Saunders, 2002, pp. 300-304), měla křivka fotoperiodické odpovědi rozdílný tvar. V intervalu kritické fotoperiody, přesněji kritické délky noci, polovina zkoumaných organismů vstupuje do diapauzy a druhá polovina pokračuje v přímém vývoji. Pro většinu zkoumaného hmyzu je vstup do diapauzy kvalitativní odpověď na podkriticky krátkou (estivace) nebo nadkriticky dlouhou noc (hibernace). Většinou tedy nedochází ke kvantitativně přesnému měření délky noci anebo k odpovědi na postupně se měnící fotoperiodu (Saunders, 2002, pp 304-306). Fotoperiodickou odpověď mohou pozměnit ostatní environmentální faktory (teplota, kvalita a množství potravy, biotické faktory) (Saunders, 2002; Tauber et al., 1986; Danks, 1987).



Fotoperiodický systém se teoreticky skládá ze 4 jednotek (obrázek 1):

- a) světelné receptory na vstupu
- b) fotoperiodické hodiny rozlišující krátké a dlouhé noci
- c) fotoperiodické počítadlo krátkých a dlouhých nocí
- d) výstupní dráhy spojující celý systém s efektory (Williams and Adkinson, 1964; Saunders, 1981, 2002)



Obr. 1: Schéma fotoperiodického kalendáře. Vnější signály, jako je fotoperioda, jsou rozeznány receptory a zpracovány ve vnitřním mechanismu, který se skládá z fotoperiodických hodin a počítadla. Fyziologické principy vnitřního mechanismu zůstávají u hmyzu nevyjasněné a jsou nazývány „černou skříňkou“. Výstupní dráhy obsahují neurosekreční buňky, které produkují neurohormony, neurotransmitery a mitogeny, jež mají vliv na biosyntézu a uvolňování vývojových hormonů z endokrinních orgánů. Pokračování v přímém vývoji nebo vstup do diapauzy je potom odpovědí na přítomnost nebo nepřítomnost těchto hormonů (Košťál, 2011).

Ačkoliv víme, že je fotoperiodický kalendář umístěn v hmyzím mozku, jeho jednotlivé části dosud nebyly přesně lokalizovány nebo jednoznačně charakterizovány (biochemicky ani fyziologicky) u žádného druhu hmyzu. Části kalendáře, jako jsou hodiny a počítadlo, zůstávají stále utajeny. Základní funkční vlastnosti systému byly dostatečně zodpovězeny již průkopníky výzkumu fotoperiodismu: E. Bünning, A. D. Lees, C. S. Pittendrigh a jejich

nástupci. Jejich laboratorní experimenty spoléhaly na měnící se vstupní podmínky (většinou světelné a teplotní) a pozorování výstupních dat (četnost diapauzy nebo sezónních změn). Všechny části mezi vstupem a výstupem zůstávají v „černé skříňce“. V pozdější době značně přispěl ke studiu rovněž D. S. Saunders (Saunders, 1968, 1978, 1992), který také prezentoval excelentní přehled všech pionýrských studií v knize *Insect Clock* (Saunders, 2002).

### **2.3. Struktura a funkce cirkadiánních hodin**

Cirkadiánní hodiny jsou endogenní systém, který pomáhá organismům vyrovnat se se změnami světla, tepla a jinými vnějšími faktory během solárního dne. Interakce mezi vnějšími faktory a činnostmi biologických hodin pak ovlivňuje chování: např. chování, námluvy, páření, kladení vajíček, atd. (Saunders, 2002), a také velkou spoustu fyziologických funkcí, jako je syntéza a uvolňování hormonů (Košťál, 2011), cyklus buněčného dělení (Matsuo et al., 2003; Reddy et al., 2005), biosyntéza feromonů (Raina and Menn, 1987), nebo cykly metabolismu (Wijnen and Young, 2006). Funkce cirkadiánních hodin je úzce spojena s celkovou časovou regulací organismu. Základní vlastnosti cirkadiánních hodin jsou následující:

- a) hodiny stále (endogenně) tikají i po vyřazení synchronizačního environmentálního signálu (Zeitgeber),
- b) endogenní perioda jejich oscilace se blíží (cirka) 24 hodinám,
- c) endogenní perioda není závislá na okolní teplotě,
- d) jsou schopny se synchronizovat s environmentálními signály.

Současné znalosti cirkadiánních hodin jsou do značné míry založeny na studiu hmyzího modelu octomilky *Drosophila melanogaster*, u níž byly poprvé identifikovány některé hodinové geny (Konopka and Benzer, 1971; Rosato et al., 2006a, b).

Za základní mechanismus hodin, který řídí denní rytmicitu chování a fyziologických funkcí, se považuje exprese hodinových genů ve specifických buňkách v mozku poháněná transkripční a translační zpětnou vazbou jejich produktů (Hall, 2003). První byly objeveny geny *period* - *per* (Bargiello et al., 1984; Reddy et al., 1984; Zehring et al., 1984) a *timeless* - *tim* (Seghal et al., 1994, Myers et al., 1995). Proteiny PERIOD a TIMELESS - PER a TIM jsou negativní elementy hodin a zároveň inhibují expresi pozitivních elementů CLOCK a CYCLE - CLK a CYC (Curtin et al., 1995; Saez and Young, 1996). Celý mechanismus je senzitivní na světlo díky molekulám fotoreceptoru CRYPTOCHROME - CRY (Stanewsky et al., 1988).

Výstupní signál hodin je pravděpodobně zprostředkován neuromediátorem, tzv. pigment disperzním faktorem PDF (Park and Hall, 1998).

#### 2.4. *Chymomyza costata*

*C. costata* je holarktický druh octomilky z čeledi *Drosophilidae* s několika generacemi v průběhu roku, jejichž počet je závislý na místním klimatu (Hackman et al., 1970). Larvální stadia divokého kmene – wt v jakékoliv části vývoje jsou citlivá na fotoperiodu. Pokud jsou chována za podmínek SD, zastaví vývoj ve třetím larválním instaru a vstupují do fakultativní diapauzy. Larvy chované za podmínek LD naopak pokračují v přímém vývoji - kuklení (Riihimaa and Kimura, 1989; Košťál et al., 2000a). Selekcí z wt byl izolován mutantní nediapauzní kmen - npd (Riihimaa and Kimura, 1988). Larvy npd kmene nereagují na fotoperiodu (npd, non photoperiodic diapause) a pokračují v přímém vývoji bez ohledu na délku dne. Denní rytmicity chování dospělců byla studována u obou kmenů (wt, npd). Zatímco kmen wt vykazuje denní rytmicitu řízenou cirkadiánními hodinami, kmen npd tuto endogenní rytmicitu postrádá. Analýza genové vazby potvrdila, že za ne-fotoperiodismus a zároveň ne-rytmicitu u larev npd kmene je zodpovědná mutace jediného lokusu neznámého autozomálního genu (Riihimaa and Kimura, 1989; Riihimaa, 1996, Lankinen and Riihimaa, 1992, 1997). Formální analýzou fotoperiodického kalendáře bylo zjištěno, že fotoperiodického měření času se účastní nějaký neznámý prvek s cirkadiánně oscilační povahou. Mohlo by se snad jednat o cirkadiánní hodiny nebo jejich část? (Yoshida and Kimura, 1995; Košťál et al., 2000b). Dále bylo zjištěno, že hodinový gen *per* vykazuje zřetelné denní a cirkadiánní oscilace mRNA u wt kmene nikoli však u npd kmene (Košťál and Shimada, 2001; Kobelková et al., 2010). Všechny tyto výsledky naznačují, že mutace jediného genového lokusu (npd) může současně za poruchy cirkadiánních hodin (chybění cirkadiánního chování u dospělců) a za ztrátu fotoperiodismu - chybění indukce diapauzy u larev (Košťál, 2011).

Mutantní kmen npd se od wt kmene odlišuje nepřítomností *tim*mRNA v mozku fotoperiodicky citlivých larev. V mozcích wt kmene *tim*mRNA navíc vykazuje mírnou denní oscilaci. Pokud je *tim*mRNA zničena pomocí *anti-tim*RNAi i divoký kmen wt ztrácí citlivost na světelné změny a stává se ne-fotoperiodickým (Pavelka et al., 2003). Dále bylo zjištěno, že u npd kmene chybí nejen *tim*mRNA, ale i protein TIM. U wt kmene je TIM lokalizován pravděpodobně v LN<sub>v</sub> 5 buňce a snad také v jedné skupině DN buněk. Zároveň opět vykazuje slabou, ale zřetelnou denní oscilaci. Největší exprese TIMu se objevuje v časně noci

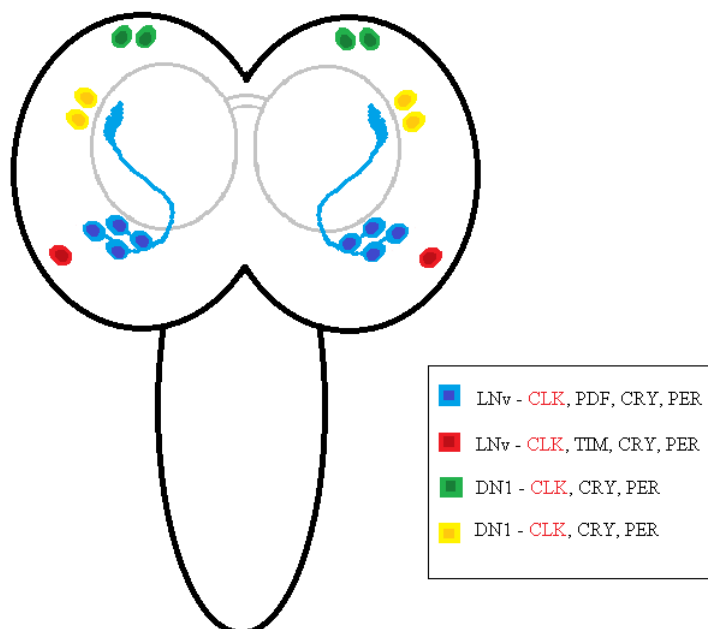
(za SD) nebo v brzkém ránu (za LD). Oscilace je tedy modulována v závislosti na fotoperiodě. Gen *tim* nese v promotorové části velkou delecí (1860 bází), a to pouze u npd kmene. Tato delece eliminuje většinu regulačních motivů a patrně způsobuje ne-expresi proteinu TIMu npd kmene, patrně s následkem fenotypových projevů: ne-fotoperiodismu a ne-rytmicity (Stehlík et al., 2008). Postupné zkracování promotorové sekvence genu *tim* vedlo u transformovaných S2 hmyzích buněk k poruchám exprese genu *tim*. Eliminace všech E-box elementů (simulace delece) v promotoru genu *tim* způsobí ne-expresi proteinu a tím, patrně, i pozorované fenotypové změny u npd kmene: ne-fotoperiodičnost, ne-rytmicita (Kobelková et al., 2010).

V návaznosti na předchozí informace se zdá, že gen *tim* je klíčem k fotoperiodismu. Otázkou zůstává, zda *tim* (a jeho produkt TIM) působí ve fotoperiodickém časovém mechanismu (v kalendáři) v rámci své známé funkce jako element cirkadiálních biologických hodin, či zda je jeho funkce na hodinách nezávislá a odlišná, nebo zda a v kalendáři funguje sám za sebe.

Předkládaná bakalářská práce je právě součástí širšího projektu, který si klade za cíl odpovědět na výše položenou otázku. Souběžně s mojí bakalářskou prací probíhaly v laboratoři Diapauzy hmyzu na ENTÚ BC AVČR další experimenty, jejichž výsledky zatím nejsou publikovány (Schöttner, Sehadová, Závodská, Košťál, nepublikovaná data). Tato data naznačují, že larvy *C. costata* nemají funkční cirkadiální hodiny. Nevykazují žádné endogenní rytmy v chování (lokomoce) ani ve fyziologii (respirace) ani v expresi genů (ať už hodinových genů v mozku nebo nehodinových v celém těle). Larvy zato mají fungující fotoperiodický kalendář, pravděpodobně založený na proteinu TIM (viz výše). O funkčních cirkadiálních hodinách můžeme mluvit až u dospělců *C. costata*, kteří naopak ztrácí fotoperiodickou citlivost. Zdá se tedy, že fotoperiodický kalendář larev může být založen na fungování genů biologických hodin, které u larev ještě „netikají“ a stávají se funkčními až později v ontogenezi dospělců.

U larev *C. costata* citlivých na periodu byla rovněž analyzována exprese a lokalizace hodinových proteinů v neuronální síti larválního mozku (CRY– buněčný receptor světla, PER, TIM– negativní elementy hodin, CYC, CLK– pozitivní elementy hodin, PDF– pravděpodobný výstupní signál hodin). Lokalizace „hodinových“ neuronů u larev *C. costata* je velmi podobná jako u larev *D. melanogaster* - jedná se o skupiny buněk LNv 1-4, LNv5, axonální arborizaci neuronů LNv 1-4, DN1 a DN2 (obrázek 2). Expresi a lokalizaci proteinů

se podařilo popsat u různě starých larev wt i npd a za různých světelných podmínek (LD, SD, po přenosu z LD do SD, atd.). Cílem celého projektu je získat ucelený funkční obraz práce časoměrného mechanismu v mozku fotoperiodicky citlivých larev a tím popsat fungování fotoperiodického kalendáře (poprvé u hmyzu vůbec).



Obr. 2: Schéma mozku naznačující lokalizaci „hodinových“ neuronů se všemi „hodinovými“ proteiny v hemisférách (předběžná nepublikovaná data).

### 3. Cíl práce

Praktickým cílem mé práce bylo naučit se soubor technik, které se používají pro imunocytochemickou detekci antigenů proteinové povahy v biologických preparátech.

Mým konkrétním úkolem bylo v rámci výše představeného projektu přispět:

- a) optimalizací metody imunodetekce proteinu CLOCK (CLK)
- b) popisem exprese proteinu CLK ve specifickém vybraném případě: konkrétně u wt kmene *C. costata*, a to pouze za podmínek SD, u larev 3. instaru, 3 dny starých (fotoperiodicky citlivých), ve čtyřech různých denních časech (Zt 2, 8, 14, 20).

## 4. Materiál a metodiky

### 4.1. Modelový organismus

Organismus, kterým jsme se zabývali po celou dobu našeho experimentu, je *Chymomyza costata*, respektive larvy této octomilky. Larvy i imaga byly chovány v inkubátorech SanyoMIR154, dříve popsáním způsobem (Košťál et al., 2000). Chov larev divokého kmene (wt – wild type) probíhal v 18°C při simulaci krátkého dne (sd – short day), tj. 12 hodin světla a 12 hodin tmy. Do takto připraveného inkubátoru byly umístěny chovné nádoby s vajíčky a dietou vhodnou pro ideální růst a vývoj larev.

Složení diety:

1. voda – 1000ml
2. ječný slad – 52g
3. kukuřičný šrot – 28g
4. kvasnice – 18g
5. agar – 10g
6. paraben – 17ml

Desátý až dvanáctý den od začátku inkubace vajíček byly larvy roztríděny podle vývojového stádia. Cílem bylo získat pouze larvy na přechodu mezi 2. a 3. instarem a takto získat larvy stejného stáří. Larvy 2. a 3. instaru byly rozlišovány podle velikosti ústních háčků. Ontogeneticky synchronizované larvy byly použity pro experiment právě, když dosáhly věku tři dny 3. instaru. Toto ontogenetické stádium vývoje larev je maximálně citlivé k fotoperiodickému signálu, který indukuje diapauzu (Košťál et al., 2000). V určený 3. den jsme odebírali skupiny 10 – 15 larev ve čtyřech různých denních časech (Zeitgebertime, Zt): Zt 2, Zt 8, Zt 14, Zt 20.

## 4.2. *Imunocytochemické šetření*

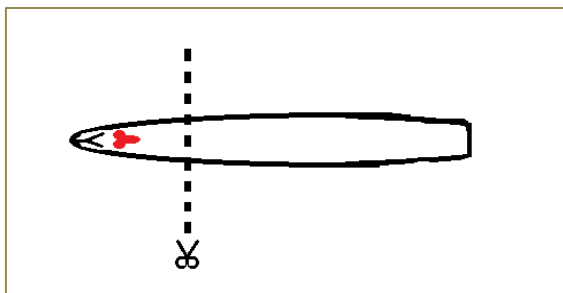
### 1. Fixace přední části larev

- a) larvy odebrané z diety byly přemístěny do mikroskopické misky naplněné fosfátovým pufrém (PB – phosphate buffer, pH 7,4)

Příprava fosfátového pufru (500 ml):

1. roztok A (zásaditý): rozpustit 107,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  nebo 71,2 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  v 400 ml  $\text{H}_2\text{O}$
2. roztok B (kyselý): rozpustit 15,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  nebo 13,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  v 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$
3. postupně přidat roztok A do roztoku B, měřit pH dokud nedosáhne 7,2 – 7,4 (při ředění se zvýší na pH 7,4)

- b) pomocí preparačních nůžek a pinzety byly larvy za první třetinou přestřiženy tak, aby mozek zůstal neporušený (obrázek 3)



Obr. 3: Místo přestřížení larvy.

- c) hlavové části larev byly přesunuty do mikroskopické misky naplněné fixačním roztokem (4% PFA v PB) a tkáně byly 20minfixovány na rotátoru

Příprava fixačního roztoku (200 ml):

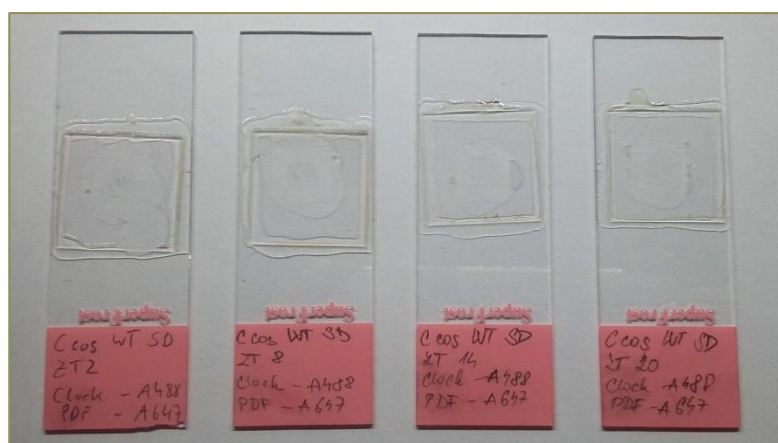
1. 8 g paraformaldehydu přidat k 100 ml teplé  $\text{H}_2\text{O}$  55-60 °C, rozpouštět ve vodní lázni
2. přidat 120  $\mu\text{l}$  1M NaOH (možno i více, dokud není roztok PFA čirý, potom se upravuje pH)
3. připravit roztok PB: v 80 ml  $\text{H}_2\text{O}$  rozpustit 2,51 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  nebo 1,63 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  a 0,9 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  nebo 0,8 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
4. smíchat roztoky PFA a PB
5. upravit pH 7,4 (pomocí 1M NaOH)
6. doplnit  $\text{H}_2\text{O}$  do 200ml a přidat 0,2  $\mu\text{l}$  Triton X-100 v 0,1% PBT
7. uchovávat po 1 ml v minizkumavkách při -20 °C

- d) dále byla fixáž nahrazena čistým PB a promyta, 3x 15min na rotátoru
  - e) po 3 dny byly uchovány v čistém PB při 4°C za tmy
2. Pitva mozků
- a) mozky byly přemístěny z mikrozkušavky do mikroskopické misky s PB, kde byl oddělen mozek od ostatní tkáně
  - b) očištěné mozky byly přesunuty do mikroskopické misky s 1ml PBT (PB + 0,5% TritonX-100)
  - c) misky byly překryty parafilmem a do dalšího kroku uchovány při 4°C
3. Blokace nespecifických vazebných míst
- a) bylo připraveno blokovací sérum 5% BSA (bovine serum albumin) v PBT, 200 µl blokovacího séra do každé mikroskopické misky
  - b) misky byly překryty parafilmem a byly ponechány na vibrační podložce při pokojové teplotě 2h ve tmě
4. Inkubace s primárními protilátkami
- a) primární protilátky byly ředěny v PBT s 5% BSA a byl přidán 0,02% roztok azidu sodného (eliminace bakteriální kontaminace), protilátky byly aplikovány současně: morčecí proti Drosophilímu CLOCK(P. Hardin), ředění 1: 1000, myší proti C7PDF (DSHB, Biology Department, University of New York, USA), ředění 1: 1000
  - b) po odstranění blokovacího séra z mikroskopické misky bylo přidáno po 100 µl roztoku obou primárních protilátek, misky byly přikryty parafilmem a inkubovány 4 dny při 4°C za tmy
  - c) roztok primárních protilátek byl odebrán a uchován ve 4°C pro opakované použití
  - d) vzorky byly promyty v 1ml PBT 3-6x 15min na orbitální třepače při pokojové teplotě
5. Inkubace se sekundárními protilátkami
- a) po odstranění poslední dávky promývacího pufu bylo do misky přidáno po 200 µl roztoků obou sekundárních protilátek v PBT s 5% BSA, v ředění 1: 200. Byly použity: kozí (protilátka) proti morčecím imunoglobulinům (IgG) Alexa Fluor 488, kozí proti myším IgG Alexa Fluor 647
  - b) misky byly překryty parafilmem a inkubovány před noc v 4°C za tmy
  - c) vzorky byly promyty v 1ml PBT 3-6x 15min na orbitální třepače při pokojové teplotě za tmy
  - d) vzorky byly promyty v 1ml PB 1x 5min



## 6. Zhotovení preparátu

- a) podložní sklíčko bylo vyčištěno 96% etanolem
- b) podložní sklíčko bylo popsáno–druh, fenotyp, Zt, sekundární protilátka
- c) na podložní sklíčko byl nalepen výztužný kroužek (kancelářské potřeby, zmírňuje tlak krycího skla a tak brání tkáň před poškozením)
- d) světlo bylo ztlumeno na minimum
- e) mozky byly v misce odděleny, byly důkladně očištěny od zbytkové tkáně (nervová vlákna, imaginální disky) a seskupeny na jedno místo, pomocí pipety (s ustríženým vrcholem) přemístěny v kapce pufru na podložní sklo (do výztužného kroužku)
- f) pufr byl vyměněn za mountovací médium Vectashield (Vector Laboratories, Kalifornie, USA)
- g) mozky v kroužku byly uspořádány pro následné snazší pozorování a překryty krycím sklem, které bylo zafixováno bezbarvým lakem na nehty
- h) hotové preparáty (obrázek 4) jsme skladovali ve tmě a chladu



Obr. 4: Hotové preparáty.

### 4.3. *Konfokální mikroskopie*

Vzorky byly analyzovány na konfokálním mikroskopu FluoView™ FV1000 (Olympus). Konfokální mikroskop nám umožnil vidět všechny části mozku v jednotlivých optických vrstvách. Obraz mozku jsme skenovali po jednotlivých hemisférách vždy v té části, ve které jsme viděli cílové buňky – pětici LNv neuronů, jejich axonální arborizaci, dva neurony DN1 a dva neurony DN2 (obrázek 2). Pracovali jsme s argonovým a fluorescentním laserem, které obsahovaly světelné spektrum kompatibilní s použitými sekundárními protilátkami. Vybranou oblast jsme skenovali po vrstvách o síle 1,25  $\mu\text{m}$ , při 40x zvětšení.

#### **4.4. Kvantifikace fluorescentního signálu**

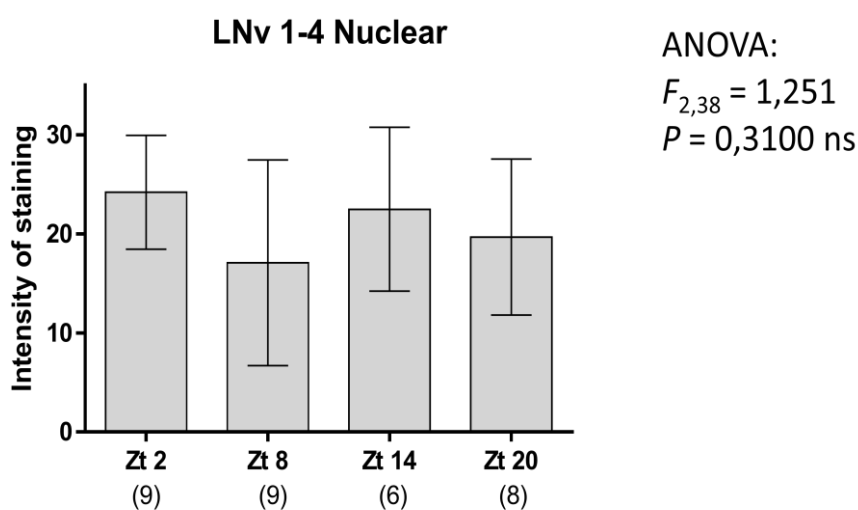
Intenzitu fluorescentního signálu jednotlivých buněk a jejich částí (jádro/cytoplazma) jsme měřili pomocí softwaru ImageJ. Pro kalibraci obrazu jsme zvolili stupnici šedi, kterou jsme nakalibrovali 0 – 255 (0 náleží bílé barvě). Relativní intenzitu proteinu CLOCK v buňce jsme měřili v té vrstvě obrazu, ve které vykazoval signál největší intenzitu záření. Pro každou ze čtyř LNv buněk, jež tvoří ucelenou skupinku, jsme provedli celkem 9 měření – 3 pro jaderný signál, 3 pro cytoplasmatický signál a 3 pro pozadí (backgroundsignal) v těsné blízkosti každé měřené buňky. Jaderný signál od cytoplasmatického jsme v tomto případě rozlišili pomocí signálu proteinu PDF, který se vyskytuje vždy pouze v cytoplasmě. U páté LNv, jež se vyskytuje odděleně od skupinky čtyř ostatních LNv buněk, jsme měřili pouze signál celé buňky (3x oproti 3x měřenému pozadí), tedy bez rozlišení jaderného a cytoplasmatického signálu (tato buňka nemá PDF signál, jež by umožnil přesně lokalizovat cytoplazmu a jádro). Šest měření jsme provedli taktéž u každé axonální arborizace (3x arborizace, 3x pozadí). U buněk DN1 a DN2 jsem intenzitu signálu neměřila, pouze jsem si zaznamenala, jestli signál je nebo není patrný (ANO/ NE) pro pozdější analýzu frekvence výskytu signálu. Z takto provedených měření jsme získali sumární tabulku hrubých dat (viz přílohy) pro každou hemisféru, se kterou jsme dále pracovali.

Pro posouzení statistické významnosti vlivu denního času (ZT) na intenzitu signálu proteinu CLOCK v jednotlivých skupinách neuronů jsme použili jednocestný ANOVA test. Následně (v těch případech, kdy ANOVA našla statisticky významný vliv) jsme použili Bonferroniho 'multiple comparison' test s cílem zjistit, které denní časy se navzájem liší intenzitou signálu CLOCK. Oba testy byly provedeny pomocí softwaru Prism6 (GraphPad, San Diego, USA). Frekvenci výskytu neuronů s pozitivním signálem CLOCK jsme statisticky dále nehodnotili. Jde pouze o předběžná data.

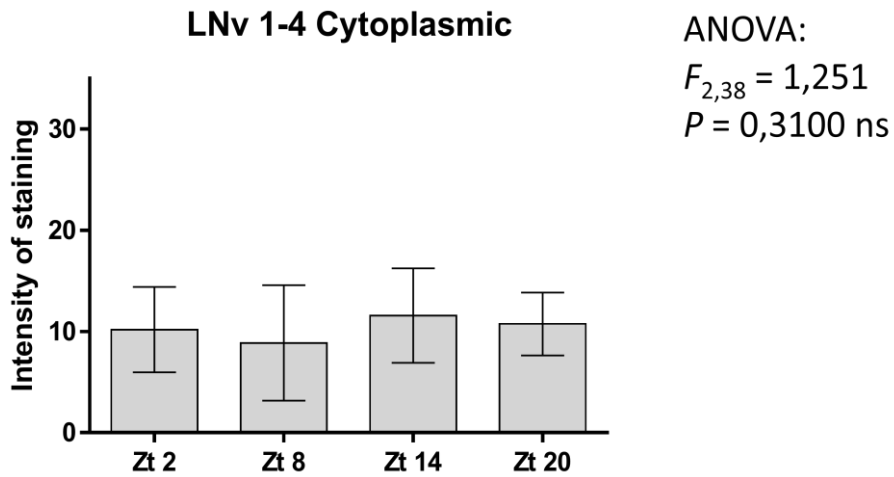
## 5. Výsledky

### 5.1. Neurony LNv 1-4

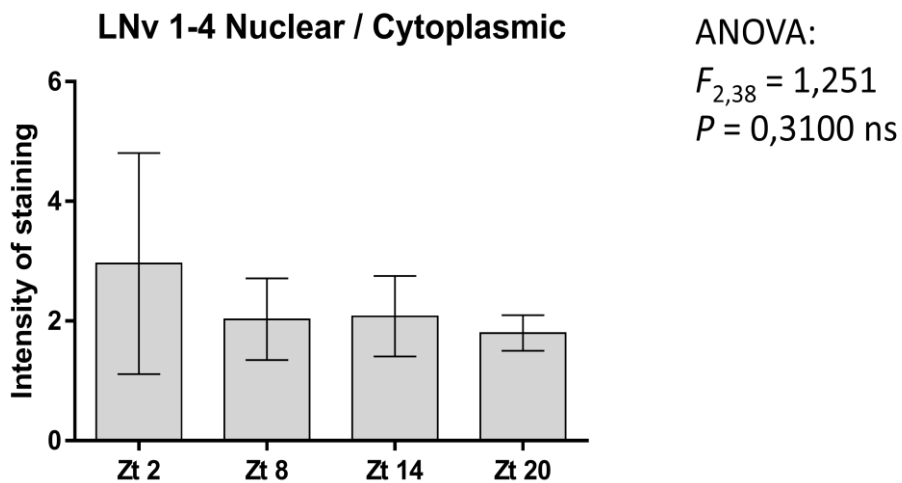
Intenzita nukleárního signálu je relativně vysoká (obrázek 5) oproti intenzitě cytoplazmatického signálu, který je relativně nízký (obrázek 6). Intenzita nukleárního, cytoplazmatického signálu ani jejich vzájemného poměru (obrázek 7) se v závislosti na denním světle (Zt) nemění. Na obrázku 8 jsou neurony zobrazeny na snímcích z konfokálního mikroskopu.



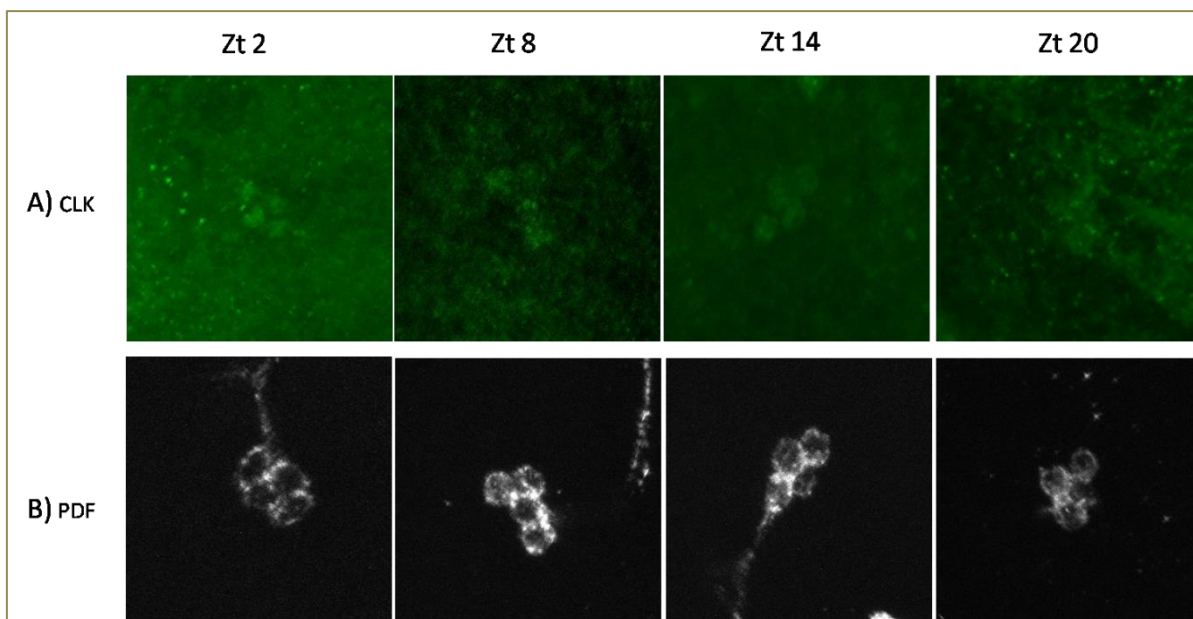
Obr. 5: Každý sloupec ukazuje průměrný nukleární signál CLK-lir (CLK-likeimmunoreactivity) všech osmi LNv 1-4 neuronů (v obou hemisférách mozku zároveň) a směrodatnou odchylku od průměru v jednotlivých denních časech (Zt). Počet analyzovaných mozků je uveden v závorce (n = 6 až 9). Jelikož v každém mozku bylo analyzováno 8 neuronů, data jsou založena na měření 48 až 81 neuronů celkem.



Obr. 6: Každý sloupec ukazuje průměrný cytoplasmatický signál CLK-lir všech osmi LNv 1-4 neuronů a směrodatnou odchylku od průměru v jednotlivých denních časech (Zt).



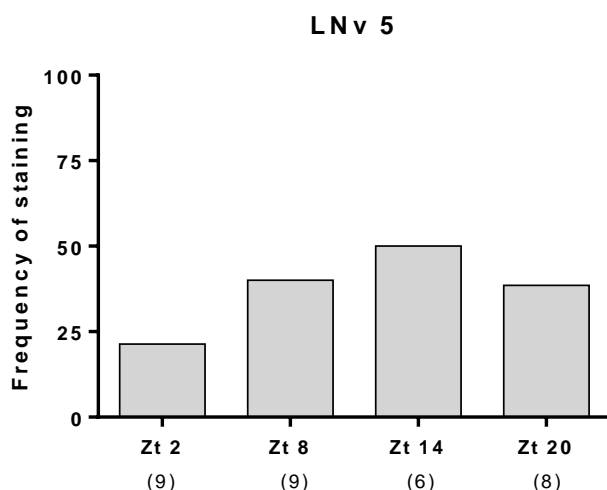
Obr. 7: Každý sloupec ukazuje poměr nukleárního a cytoplasmatického signálu CLK-lir všech osmi LNv 1-4 neuronů a směrodatnou odchylku od průměru v jednotlivých denních časech (Zt).



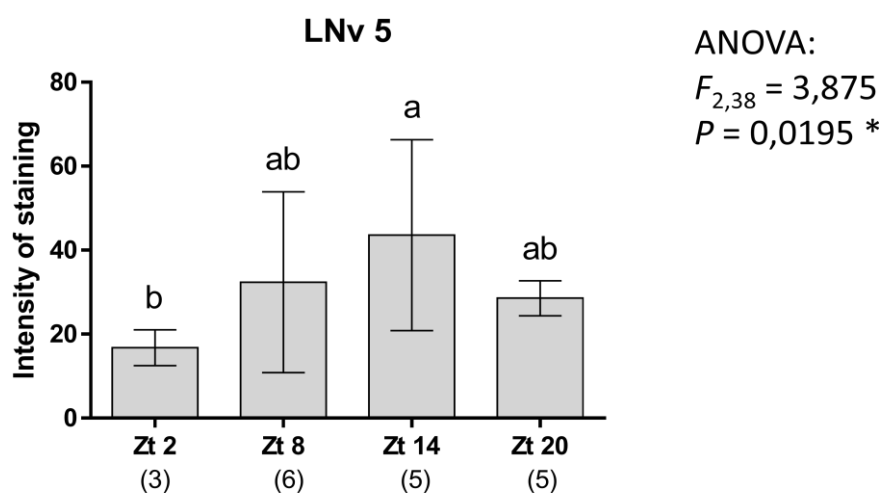
Obr. 8: Příklad snímků z konfokálního mikroskopu neuronů LNv 1-4 (zvětšení 40x) za každého sledovaného času Zt. Protein CLK je znázorněn zelenou barvou, protein PDF (marker) bílou.

## 5.2. *Neuron LNv5*

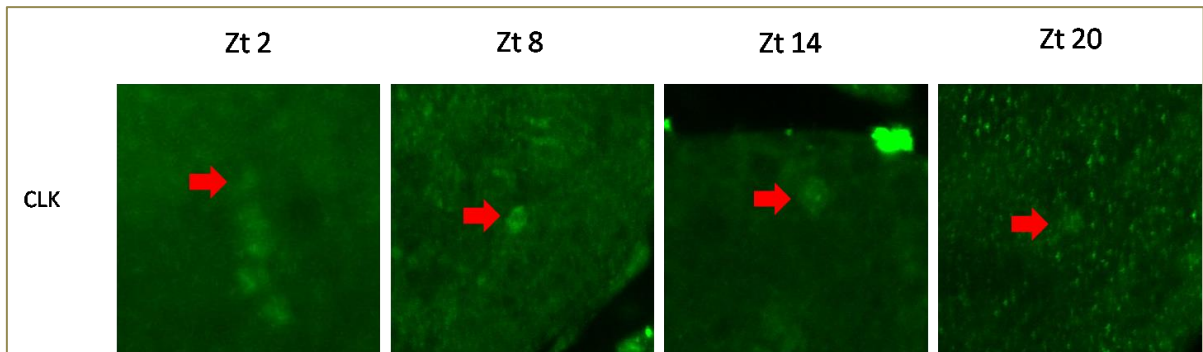
Frekvence výskytu se postupně zvyšuje v průběhu dne z 21,4% (Zt 2) až na 50,0% (Zt 14), poté opět mírně klesá na 38,5% (Zt 20), (obrázek 9). Intenzita signálu vykazuje jistou statisticky významnou závislost na denním čase. Nejslabší intenzita (16,8) je zaznamenána v čase Zt 2, poté se postupně zvyšuje až na 43,60 (Zt 14) a opět klesá na 28,6 (Zt 20), (obrázek 10). Na obrázku 11 je neuron zobrazen na snímcích z konfokálního mikroskopu.



Obr. 9: Každý sloupec ukazuje frekvenci výskytu CLK-lir signálu v pátém neuronu LNv5 v jednotlivých denních časech (Zt). Počet analyzovaných mozků je uveden v závorce (n = 6 až 9).



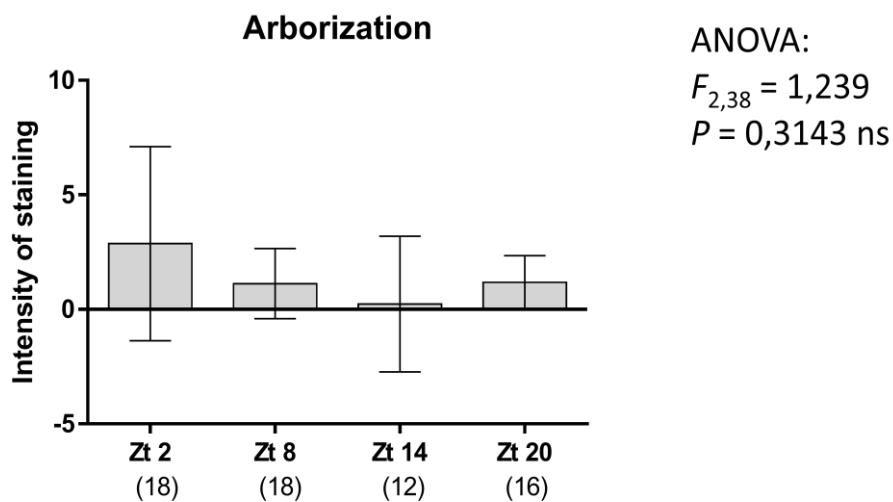
Obr. 10: Každý sloupec ukazuje průměrnou intenzitu signálu CLK-lir v pátém neuronu LNv5 a směrodatnou odchylku od průměru v jednotlivých denních časech. V každé hemisféře je jediný LNv5 neuron, tudíž celkové počty možných LNv5 neuronů byly: Zt 2 – 18, Zt 8 – 18, Zt 14 – 12, Zt 20 – 16. Ale pouze ty neurony, u kterých byl signál zaznamenán, byly započteny do průměru (n = 3 až 6). ANOVA nachází statisticky významný vliv denního času (Zt) na intenzitu signálu. Analýza pomocí Bonferroniho post-hoc testu našla rozdíl mezi intenzitou signálu v časech Zt 2 – Zt 14 (statisticky významné rozdílné průměry jsou označeny různými písmeny).



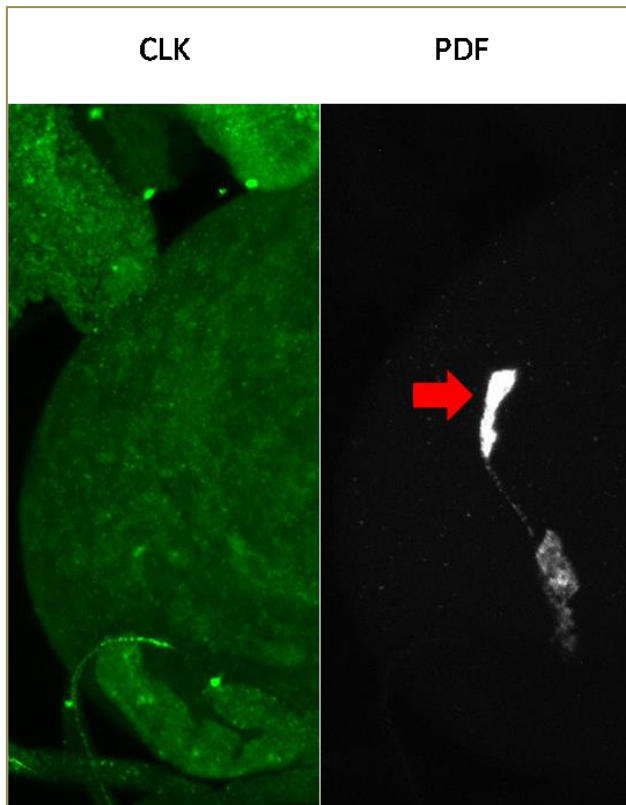
Obr. 11: Příklad snímků z konfokálního mikroskopu LNv 5 (zvětšení 40x) za každého sledovaného času Zt.

### 5.3. Arborizace

Celkově je signál v axonální arborizaci velmi slabý, někdy úplně chybí a okolní pozadí vykazuje vyšší intenzitu (obrázek 12). Na obrázku 13 je axonální arborizace zobrazena na snímcích z konfokálního mikroskopu.



Obr. 12: Každý sloupec ukazuje průměrnou intenzitu signálu CLK-lir v arborizaci axonálních výběžků neuronů LNv 1-4 a směrodatnou odchylku od průměru. V každé hemisféře je jediná arborizace, tudíž se celkové počty hodnocených arborizací (n) pohybovaly od 12 do 18.

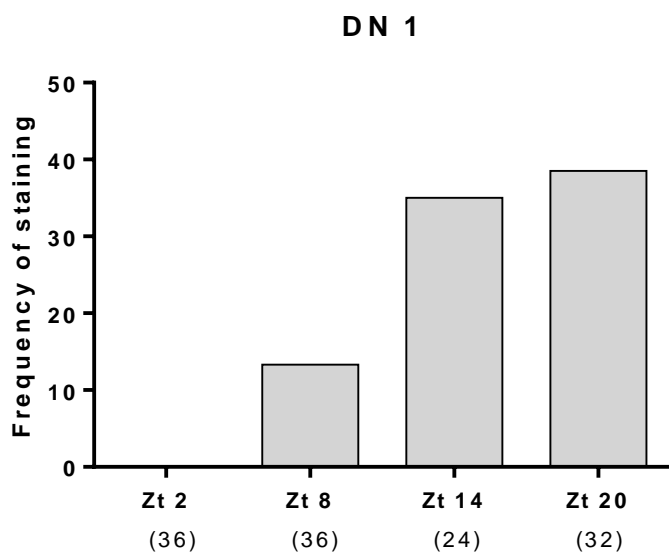


Obr. 13: Příklad snímků z konfokálního mikroskopu axonální arborizace. Protein CLK je znázorněn zeleně, protein PDF (marker) bíle.

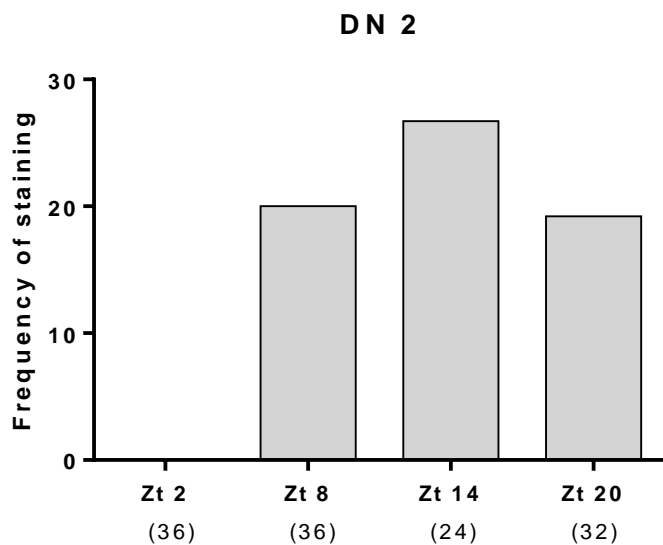


#### 5.4. *Neurony DN*

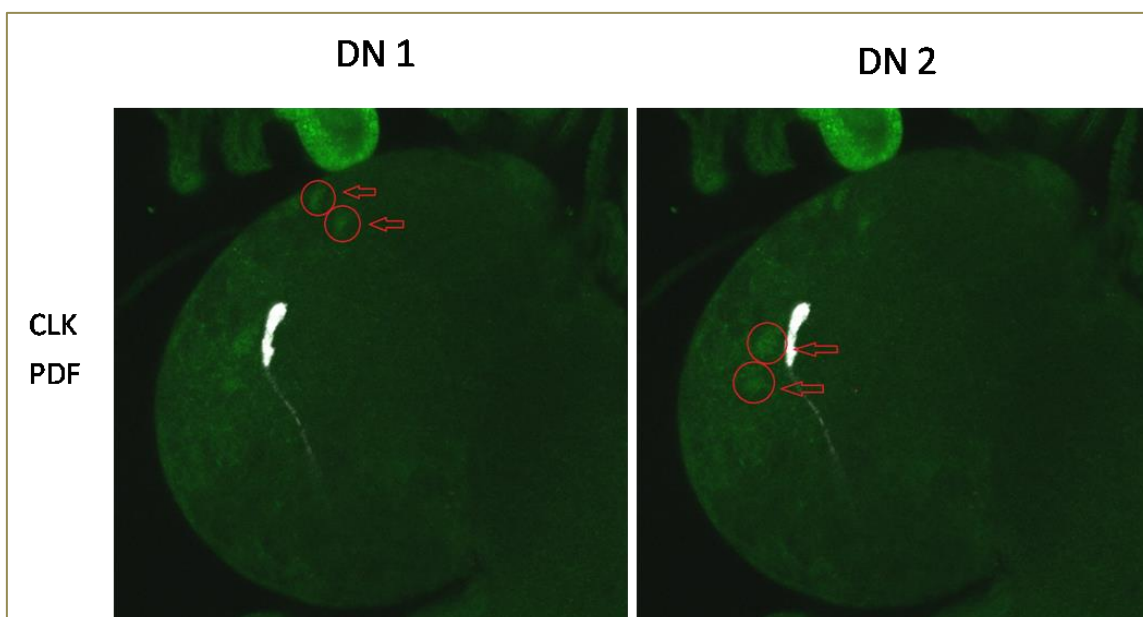
Signální protein CLK se v neuronech DN1 a DN2 v čase Zt 2 vůbec nenachází. Frekvence výskytu se v ostatních denních časech pohybuje mezi 13,3% a 38,5%, přičemž se zdá, že frekvence výskytu se postupně zvyšuje s přibývajícím časem a to zejména u neuronů DN1 (obrázek 14, obrázek 15). Na obrázku 16 jsou neurony zobrazeny na snímcích z konfokálního mikroskopu.



Obr. 14: Každý sloupec ukazuje frekvenci výskytu CLK-lir signálu v neuronech DN1. V každé hemisféře jsou dvě DN1 buňky, a tak jsou celkové počty hodnocených buněk (n) od 24 do 36.



Obr. 15: Každý sloupec ukazuje frekvenci výskytu CLK-lir signálu v neuronech DN2. V každé hemisféře jsou dvě DN2 buňky, a tak jsou celkové počty hodnocených buněk (n) od 24 do 36.



Obr. 16: Příklad snímků z konfokálního mikroskopu buněk DN 1 (vlevo) a DN 2 (vpravo). Protein CLK je znázorněn zeleně, protein PDF bíle.

## 6. Diskuse

V souvislosti s oborem, který studuji – Biomedicínská laboratorní technika, pro mne bylo prioritní osvojit si techniku imunocytochemické lokalizace proteinových antigenů a práci s konfokálním mikroskopem. Metodické části, které mne dovedly ke kýženým výsledkům a na kterých jsem se podílela, jsou: chov octomilek, pitva larev, fixace tkáně, hybridizace s primárními a sekundárními protilátkami, příprava samotného preparátu, skenování preparátu pomocí konfokálního mikroskopu, vyhodnocení snímků pomocí softwaru ImageJ, statistické vyhodnocení výsledků. Touto cestou byly dosaženy mé původní cíle a zodpovězena biologická otázka týkající se exprese a lokalizace proteinu CLK u larev *C. costata*.

Laterální neurony LNv 1-4 jsou sídlem cirkadiálních biologických hodin jak u larev, tak i u dospělců *D. melanogaster* (Saunders et al, 1989). U octomilky *C. costata* je v neuronech LNv 1-4 protein CLK přítomen v jádře i v cytoplazmě. Hranice mezi jádrem a cytoplazmou byla bezpečně určena pomocí proteinu PDF, který se vyskytuje pouze v cytoplazmě a byl použit jako marker. Přesná lokalizace těchto neuronů byla určena také pomocí markeru PDF, který je v těchto neuronech silně vyjádřen (Fernández et al., 2008). Intenzita signálu proteinu CLK však nevykazuje žádnou závislost na denním čase, a to ani v jádře ani v cytoplazmě. Fluktuační intenzity nejsou statisticky významné a tak se zdá, že v neuronech LNv 1-4 je signál relativně silný a stálý. Z velkého počtu pozorování může být usouzena věrohodnost těchto výsledků a zároveň jsou tyto výsledky v souladu s experimenty, které v laboratoři Diapauzy hmyzu paralelně probíhaly. Souběžné experimenty ukazují, že fotoperiodicky citlivé larvy *C. costata* nemají funkční cirkadiální hodiny, na rozdíl od larev *D. melanogaster*, u nichž je exprese hodinových proteinů v laterálních neuronech pozorována (Malpel et al., 2004).

Intenzita signálu CLOCK neuronu LNv 5 vykazuje jistou závislost na denním čase a maximum v časné noci. Tímto časovým průběhem exprese se protein CLK podobá časovému průběhu intenzity signálu proteinu TIM (Stehlík et al, 2008). Jelikož publikované výsledky naznačují, že protein TIM je klíčem k porozumění fotoperiodismu u larev *C. costata* (Pavelka et al., 2003; Stehlík et al., 2008; Kobelková et al., 2010), je možné, že sídlem fotoperiodického kalendáře u larev *C. costata* je právě neuron LNv5. Tyto výsledky jsou ale pouze předběžné, a to z důvodu absence použitého markeru u LNv5 (neobsahuje PDF).

Detekování lokalizace LNv5 bez vhodného markeru mohlo mít za následek přehlednutí buňky s nízkou intenzitou signálu. Neuron LNv 5 též obsahuje protein PER a CRY, tyto dva proteiny by mohly být použity jako markery a tím naše předběžné výsledky potvrdit či vyvrátit.

Intenzita signálu proteinu CLK byla velmi nízká (prakticky nulová) v axonálních arborizacích neuronů LNv 1-4. Na rozdíl od proteinu PDF není tedy protein CLK axonálně transponován, což je v souladu s jeho funkcí jaderného regulátoru genové transkripce (Masesh et al., 2014).

Exprese proteinu CLK v dorsálních neuronech (skupiny buněk DN 1 a DN2) byla v této práci posouzena pouze velmi předběžně. Podobně jako v případě LNv5 neuronu, ani v neuronech DN1 a DN2 není přítomen protein PDF, používaný v této práci jako marker. Nicméně, naše předběžné výsledky naznačují, že protein CLK je v neuronech DN1 a DN2 slabě exprimován a navíc se zdá, že exprese má jistý denní průběh: vyšší četnost CLK-pozitivních neuronů byla zjištěna v nočních časech. Jak neurony LNv 5 tak i skupiny DN1 a DN2 exprimují proteiny CRY (Jerry, 2006; Schöttner a Sehadová, nepublikované výsledky), jež teoreticky může těmto neuronům zajistit vlastní citlivost ke světelnému signálu.

Role proteinu CLK a zároveň všech dalších tzv. „hodinových“ proteinů v laterálních a dorsálních neuronech larev *C. costata*, může být posouzena až ve chvíli, kdy budou k dispozici výsledky všech paralelních experimentů. Prozatím se výsledky jeví tak, že sledovaná neuroanatomická struktura „hodinových“ neuronů pravděpodobně slouží u larev *C. costata* spíše jako fotoperiodický kalendář než jako cirkadiánní biologické hodiny. Je jisté, že tyto neurony svou roli cirkadiánních hodin u larev neplní, což dokazují paralelní výsledky získané z laboratoře Diapauzy hmyzu (larvy nevykazují žádné endogenně rytmické funkce na úrovni chování, fyziologie, či exprese genů) a zároveň i naše pozorování stálé intenzity signálu proteinu CLK v neuronech LNv 1-4. Je pravděpodobné, že tato neuronální síť se stává skutečnými funkčními hodinami až u dospělců *C. costata*, kteří vykazují jasnou cirkadiánní rytmičnost chování, ale naopak již nemají fungující fotoperiodický kalendář.

## 7. Závěr

Osvojila jsem si imunocytochemickou techniku lokalizace hodinových proteinů CLOCK a PDF v mozcích fotoperiodicky citlivých larev *C. costata*.

Protein CLOCK byl jasně přítomen v neuronech LNv 1-4, jak v jádrech, tak v cytoplazmě, nebyl však axonálně transportován do axonálních arborizací těchto neuronů.

Intenzita signálu proteinu CLOCK v neuronech LNv 1-4 se neměnila v průběhu denního času (což je v souladu s pozorováním, že larvy *C. costata* nemají funkční cirkadiánní hodiny).

Identifikace dalších CLOCK-pozitivních neuronů v mozcích larev *C. costata* byla ztížena tím, že tyto neurony ne-exprimují protein PDF (používaný jako marker). Přesto naše výsledky naznačují, že neuron LNv 5 exprimuje protein CLOCK a intenzita jeho signálu je závislá na denním čase (což je v souladu s pozorováním rytmické exprese proteinu TIM v neuronu LNv 5). Naše výsledky tak předběžně označují neuron LNv 5 jako pravděpodobné sídlo fotoperiodického kalendáře larev. Tyto výsledky bude třeba dále ověřit.

## 8. Seznam použité literatury

**Andrewartha H. G. (1952)***Diapause in relation to the ecology of insects.* Biological Reviews, 27(1), 50-107.

**Bargiello T. A., Jackson F. R., Young M. W. (1984)***Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in Drosophila melanogaster.* Nature 312, 752-754.

**Bradshaw W., Holzapfel C. (2007)***Tantalizing timeless.* Science 316(5833), 1851-1852.

**Curtin K. D., Huang Z. J., Rosbash M. (1995)***Temporally regulated nuclear entry of the Drosophila period protein contributes to the circadian clock.* Neuron, 14(2), 365-372.

**Danilevsky A. S. (1965)***Photoperiodism and seasonal development of insects.* Leningrad State University Press, Leningrad, Russia, p. 243.

**Danks H. V. (1987)***Insect dormancy: An ecological perspective.* Biological Survey of Canada (Terrestrial Artropods). Monograph series No. 1, p. 439-439.

- Danks H. V. (2005)***How similar are daily and seasonal biological clocks?*Journal of insect physiology, 51(6), 609-619.
- Danks H. V. (Ed.) (1994)***Insect life-cycle polymorphism: Theory, evolution and ecological consequences for seasonality and diapause control.*Kluwer academic publishers, Dordrecht, p. 376.
- Denlinger D. L. (1986)***Dormancy in tropical insects.*Annual review of entomology, 31(1), p. 239-264.
- Dingle H. (1972)***Migration strategies of insects.* Science, 175(4028), p. 1327-1335.
- Dunlap J. C. (1996)***Genetic and molecular analysis of circadian rhythms.*Annual review of genetics, 30(1), p. 579-601.
- Fernández M. P., Berni J., Ceriani M. F. (2008)***Circadian Remodeling of Neuronal Circuits Involved in Rhythmic Behavior.* PLoS Biol 6(3), p. 69.
- Garner W. W., Allard H. A. (1920)***Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants.* Journal of Agricultural Research 18, 553-606.
- Goto S. G., Shiga S., Numata H. (2010)***Photoperiodism in insects: perception of light and the role of clock genes.*In: Nelson R. J., Denlinger D. L., Somers D. E. (Eds.), *Photoperiodism: The Biological Calendar*, Oxford University Press, Oxford, p. 258-286.
- Hackman W., Lakovaara S., Saura A., Sorsa M., Vepsäläinen K. (1970)***On the biology and karyology of *Chymomyza costata* Zetterstedt, with reference to the taxonomy and distribution of various species of *Chymomyza* (Diptera, Drosophilidae).*Annales entomologicae fennicae 36, p. 1-9.
- Hall J. C. (2003)***Genetics and molecular biology of rhythms in *Drosophila* and other insects.* Advances in genetics, 48, p. 1-280.
- Helfrich-Förster C. (2009)***Does the morning and evening oscillator model fit better for flies or mice?*Journal of biological rhythms, 24(4), p. 259-270.

- Jerry H. H., Wangjie Y., Scott M. D., Paul E.H. (2006)***Drosophila clock is constitutively expressed in circadian oscillator and non-oscillator cells.* Journal of Biological Rhythms, 21(2), p. 93-103.
- Kobelková A., Bajgar A., Dolezel D. (2010)***Functional molecular analysis of a circadian clock gene timeless promoter from the Drosophilid fly Chymomyza costata.*Journal of biological rhythms, 25(6), p. 399-409.
- Kogure M. (1933)***The influence of light and temperature on certain characters of the silkworm, Bombyx mori.* Journal of the Department of Agriculture, Kyushu Imperial University, 4, p. 1-93.
- Konopka R. J., Benzer S. (1971)***Clock mutants of Drosophila melanogaster.* Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 68, p. 2112-2116.
- Košťál V. (2006)***Eco-physiological phases of insect diapause.* Journal of Insect Physiology, 52(2), p. 113-127.
- Košťál V. (2011)***Insect photoperiodic calendar and circadian clock: independence, cooperation, or unity?* Journal of Insect Physiology, 57(5), p. 538-556.
- Košťál V., Noguchi H., Shimada K., Hayakawa Y. (2000b)***Circadian component influences the photoperiodic induction of diapause in a drosophilid fly, Chymomyza costata.*Journal of insect physiology, 46(6), p. 887-896.
- Košťál V., Shimada K. (2001)** *Malfunction of circadian clock in the non-photoperiodicdiapause mutants of the drosophilid fly, Chymomyza costata.*Journal of Insect Physiology, 47(11), p. 1269-1274.
- Košťál V., Shimada K., Hayakawa Y. (2000a)***Induction and development of winter larval diapause in a drosophilid fly, Chymomyza costata.*Journal of Insect Physiology 46, p. 417-428.
- Kyriacou C. P., Peixoto A. A., Sandrelli F., Costa R., Tauber E. (2008)***Clines in clock genes: fine-tuning circadian rhythms to the environment.* Trends in Genetics, 24(3), p. 124-132.

- Lankinen P., Riihimaa A. (1992)***Weak circadian eclosion rhythmicity in *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae), and its independence of diapause type.*Journal of insect physiology, 38, p.803-811.
- Lankinen P., Riihimaa A. (1997)***Effects of temperature on weak circadian eclosion rhythmicity in *Chymomyza costata* (Diptera: Drosophilidae).*Journal of insect physiology, 43(3), p. 251-260.
- Lees A. D. (1955)***The physiology of diapause in arthropods.* Cambridge University Press, p. 151.
- MacRae T. H. (2010)***Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause.* Cellular and Molecular Life Sciences, 67(14), p. 2405-2424.
- Malpel S., Klarsfeld A., Rouyer F. (2004)***Circadian synchronization and rhythmicity in larval phoroperception-defective mutants of *Drosophila*.* J Biol Rhythms. 19(1), 10-21.
- Marcovitch S. (1923)***Plant lice and light exposure.* Science, 58(1513), p. 537.
- Marcovitch S. (1924)***The migration of the Aphididae and the appearance of the sexual forms as affected by the relative length of daily light exposure.* Journal of agricultural research, 27(5), p. 13-522.
- Masaki S. (1980)***Summer diapause.* Annual Review of Entomology, 25(1), p. 1-25.
- Mashes G., Jeong E., Ng F. S., Liu Y., Gunawarhdana K., Houli J. H., Yildirim E., Amunuqama R., Jones R., Allen D. L., Edery I., Kim E. Y., Hardin P. E. (2014)***Phosphorylation of the transcription activator CLOCK regulates progression through a 24-h feedback loop to influence the circadian period in *Drosophila*.* Journal of Biological Chemistry, 289(28), p. 19681-93.
- Matsuo T., Yamaguchi S., Mitsui S., Emi A., Shimoda F., Okamura H. (2003)***Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo.* Science, 302(5643), p. 255-259.
- Myers M. P., Wager-Smith K., Wesley C. S., Young M. W., Sehgal A. (1995)***Positional cloning and sequence analysis of the *Drosophila* clock gene, timeless.*Science, 270(5237), p. 805-808.



- Nelson R. J., Delinger D. L., Somers D. E. (2010)***Photoperiodism. The biological Calendar.* Oxford University Press, Oxfors, p. 581.
- Nijhout H. F. (2003)***Development and evolution of adaptive polyphenisms.* Evolution and development, 5(1), p. 9-18.
- Nitabach M. N., Taghert P. H. (2008)***Organization od the Drosophila cicadian control circuit.* Current Biology 18, R84-R93.
- Park J. H., Hall J. C. (1998)***Isolation and chronobiological analysis of a neuropeptide pigment-dispersing factor gene in Drosophila melanogaster.* Journal of biological rhythms, 13(3), p. 219-228.
- Pavelka J., Shimada K., Košťál V. (2003)***TIMELESS a link between fly's circadian and photoperiodic clocks?* European Journal of Entomology, 100(2), p. 255-266.
- Raina A. K., Menn J. J. (1987)***Endocrine regulation of pheromone production in Lepidoptera.* In Pheromone Biochemistry. Academic Press Orlando, Fla. p. 159-174.
- Reddy A. B., Wong G. K., O'Neill J., Maywood E. S., Hastings M. H. (2005)***Circadian clocks: neural and peripheral pacemakers that impact upon the cell division cycle.* Mutation Research 574(1), p. 76-91.
- Reddy P., Zehring W. A., Wheeler D. A., Pirrotta V., Hadfield C., Hall J. S., Rosbash M. (1984)***Molecular analysis of the period locus in Drosophila melanogaster and identification of a transcript involved in biological rhythms.* Cell 38, p. 701-710.
- Riihima A. J. (1996)***Genetic variation in diapause, cold-hardiness and pupal eclosion rhythm in Chymomyza costata.* Acta Universitatis Ouluensis 1-60 A274.
- Riihimaa A. J., Kimura M. T. (1988)***A mutant strain of Chymomyza costata (Diptera: Drosophilidae) insensitive to diapause-inducing action of photoperiod.* Physiological entomology, 13(4), p. 441-445.
- Riihimaa A. J., Kimura M. T. (1989)***Genetics of the photoperiodic larval diapause in Chymomyza costata (Diptera; Drosophilidae).* Hereditas, 110(3), p. 193-200.

- Rosato E., Peixoto A. E., Costa R., Kyriacou C. P., (2006a)***Linkage disequilibrium, mutational analysis and natural selection in the repetitive region of the clock gene , period, in Drosophila melanogaster.* Genetical Research 69, p. 89-99.
- Rosato E., Tauber E., Kyriacou C. P. (2006b)***Molecular genetics of the fruit-fly circadian clock.* European journal of human genetics, 14(6), p. 729-738.
- Sabrosky C. W., Larson I., Nabours R. K. (1933)** *Experiments with light upon reproduction, growth and diapause in grouse locusts (Acrididae, Tetriginae).* Transactions of the Kansas Academy of Science (1903), p. 298-300.
- Saez L., Young M. W. (1996)***Regulation of nuclear entry of the Drosophila clock proteins period and timeless.* Neuron, 17(5), p. 911-920.
- Saunders D. S. (1968)***Photoperiodism and time measurement in the parasitic wasp, Nasonia vitripennis.* Journal of Insect Physiology, 14(4), p. 433-450.
- Saunders D. S. (1978)***An experimental and theoretical analysis of photoperiodic induction in the flesh-fly, Sarcophaga argyrostoma.* Journal of comparative physiology, 124(1), p.75 95.
- Saunders D. S. (1981)***Insect photoperiodism—the clock and the counter: a review.* Physiological Entomology, 6(1), p. 99-116.
- Saunders D. S. (1992)** *The photoperiodic clock and “counter” in Sarcophaga argyrostoma: experimental evidence consistent with “external coincidence” in insect photoperiodism.* Journal of Comparative Physiology A, 170(1), p. 121-127.
- Saunders D. S. (2002)** *Insect clocks, 3rd ed.* Elsevier.p. 560.
- Saunders D. S. (2005)***Erwin Bünning and Tony Lees, two giants of chronobiology, and the problem of time measurement in insect photoperiodism.*Journal of insect physiology, 51(6), p. 599-608.
- Saunders D. S., Henrich V. C., Gilbert L. I., (1989)***Induction of diapause in Drosophila melanogaster: Photoperiodic regulativ and the impal of arrhythmic clock mutations on time measurement.* Proceedings of the National Academy of Science sof the USA, 86, 3748-3752.

- Seghal A., Price J. L., Man B., Young M. W. (1994)***Loss of circadian behavioural rhythms and per mRNA oscillations in the Drosophila mutant timeless.* Science 263,p. 1603-1606.
- Southwood T. R. E. (1962)***Migration of terrestrial arthropods in relation to habitat.* Biological reviews, 37(2), p. 171-211.
- Stanewsky R., Kaneko M., Emery P., Beretta B., Wager-Smith K., Kay S. A., Rosbash M., Hall J. C. (1988)***The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in Drosophila.* Cell, 95(5), p. 681-692.
- Stehlík J., Závodská R., Shimada K., Šauman I., Košťál V. (2008)***Photoperiodic induction of diapause requires regulated transcription of timeless in the larval brain of Chymomyza costata.* Journal of Biological Rhythms, 23(2), p. 129-139.
- Tauber E., Kyriacou B. P. (2001)***Insect photoperiodism and circadian clocks: models and mechanisms.* Journal of Biological Rhythms, 16(4), p. 381-390.
- Tauber M. J., Tauber C. A., Masaki S. (1986)** *Seasonal adaptations of insects.* Oxford University Press, Oxford, p. 411.
- Wijnen H., Young M. W. (2006)***Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms.* Annual review of genetics 40, p. 409-448.
- Wilde J. D. (1962)** *Photoperiodism in insects and mites.* Annual review of entomology, 7(1), p. 1-26.
- Williams C. M., Adkisson P. L. (1964)***Physiology of insect diapause. XIV. An endocrine mechanism for the photoperiodic control of pupal diapause in the oak silkworm, Antheraea pernyi.* Biological Bulletin, p. 511-525.
- Wolda H. (1988)***Insect seasonality: why?* Annual review of ecology and systematics, p. 1-18.
- Yoshida T., Kimura M. T. (1995)***The photoperiodic clock in Chymomyza costata.* Journal of Insect Physiology, 41(3), p. 217-222.
- Zehring W. A., Wheeler D. A., Reddy P., Konopka R. J., Kyriacou C. P., Rosbash M., Hall J. C. (1984)***P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic Drosophila melanogaster.* Cell, 39(2), p. 369-376.

## **9. Přílohy**

V příloze jsou přiložené tabulky s původními daty k jednotlivým denním časům.

LEFT hemisphere																	
replicate	Intensity of staining										arborization			Frequency of occurrence (%)			
	LNv1		LNv2		LNv3		LNv4		LNv5	all	DN1	DN1	DN2	DN2			
	N	C	N	C	N	C	N	C							all	all	all
1	27,85	8,33	25,60	11,37	37,66	13,20	35,07	17,94	1	A	0,00	A	A	A	A		
2	19,73	8,77	24,78	10,12	31,41	17,52	24,22	11,64	2	A	0,00	A	A	A	A		
3	29,38	22,33	29,90	25,41	27,17	23,56	46,29	30,45	3	A	5,92	A	A	A	A		
4	36,27	21,96	36,44	25,52	23,49	12,99	35,55	9,64	4	A	0,00	A	A	A	A		
5	x	x	x	x	x	x	x	x	5	x	x	x	x	x	x		
6	34,87	2,73	37,69	11,15	25,81	1,65	23,43	0,00	6	A	0,00	A	A	A	A		
7	23,29	3,96	34,02	13,57	33,67	15,43	29,81	7,51	7	11,77	0,00	A	A	A	A		
8	23,27	11,63	20,14	9,86	18,60	3,41	26,87	20,99	8	A	9,20	A	A	A	A		
9	14,41	6,73	11,18	1,96	10,54	2,35	13,48	1,83	9	A	10,55	A	A	A	A		
mean	26,13	10,80	27,47	13,62	26,04	11,26	29,34	12,50		11,77	3,21	0	0	0	0		
SD	6,96	7,04	8,39	7,53	8,10	7,48	9,20	9,54		0,00	4,31						

RIGHT hemisphere																	
replicate	Intensity of staining										arborization			Frequency of occurrence (%)			
	LNv1		LNv2		LNv3		LNv4		LNv5	all	arborization	DN1	DN1	DN2	DN2		
	N	C	N	C	N	C	N	C								all	all
1	18,14	3,54	13,72	5,59	13,31	6,90	31,06	8,27	1	A	11,46	A	A	A	A		
2	12,24	6,15	13,30	10,11	6,56	3,70	9,77	6,49	2	A	0,00	A	A	A	A		
3	16,85	11,06	7,02	5,46	18,03	9,45	15,04	4,75	3	16,30	1,51	A	A	A	A		
4	39,53	19,18	35,53	15,15	16,91	0,00	29,72	13,22	4	A	0,00	A	A	A	A		
5	25,60	14,30	17,19	9,49	25,32	9,29	40,42	18,26	5	A	1,49	A	A	A	A		
6	x	x	x	x	x	x	x	x	6	x	x	x	x	x	x		
7	28,72	8,52	32,19	8,88	15,12	7,16	19,51	15,94	7	22,21	0,00	A	A	A	A		
8	x	x	x	x	x	x	x	x	8	x	x	x	x	x	x		
9	x	x	x	x	x	x	x	x	9	x	x	x	x	x	x		
mean	23,51	10,46	19,83	9,11	15,88	6,08	24,25	11,16		19,26	2,41	0	0	0	0		
SD	9,02	5,19	10,41	3,25	5,61	3,32	10,45	4,98		2,95	4,10						

Legend: x hemisphere damaged  
 A signal absent (not measured)  
 0,00 signal weak (measured, weaker than background = changed to zero)  
 N nuclear signal  
 C cytoplasmic signal  
 all nuclear and cytoplasmic signal not distinguished

x hemisphere damaged  
 A signal absent  
 P signal present

SUMMARY													
	LNv 1-4			all 4 LNv 1-4 cells are equivalent	LNv 5		arborization		DN1		DN2		
	N	C	N/C		intensity	frequency	intensity	frequency	frequency	frequency			
1	25,30	9,39	2,69										
2	17,75	9,31	1,91										
3	23,71	16,56	1,43										
4	31,68	14,71	2,15										
5	27,13	12,84	2,11										
6	30,45	3,88	7,84										
7	27,04	10,12	2,67										
8	22,22	11,47	1,94										
9	12,40	3,22	3,85										
mean	24,19	10,17	2,96		mean	16,76	21,43	mean	2,87	0	0		
SD	5,75	4,21	1,85		SD	4,27		SD	4,24				

LEFT hemisphere															
replicate	Intensity of staining										Frequency of occurrence (%)				
	LNv1		LNv2		LNv3		LNv4		LNv5	arborization	DN1	DN1	DN2	DN2	
	N	C	N	C	N	C	N	C			all	all	all	all	
1	11,13	5,31	6,31	1,88	6,87	2,06	7,07	3,01	1	A	2,76	A	A	A	A
2	7,76	5,07	9,39	7,60	11,60	4,30	9,77	3,96	2	8,06	3,16	A	A	A	A
3	6,40	1,41	7,14	11,27	7,83	7,70	12,36	14,74	3	A	0,25	A	A	P	P
4	15,83	9,56	7,46	0,00	15,46	7,37	10,59	0,00	4	A	0,00	A	A	P	P
5	23,29	20,46	45,90	16,58	33,27	22,61	27,97	18,48	5	67,47	0,00	A	A	A	A
6	10,88	7,32	9,09	10,84	14,28	7,48	17,08	9,51	6	A	2,93	A	A	A	A
7	41,27	19,91	39,61	21,61	34,96	17,26	32,74	9,74	7	38,43	0,00	P	P	P	P
8	x	x	x	x	x	x	x	x	8	x	x	x	x	x	x
9	17,87	4,15	21,60	8,83	13,99	9,28	22,66	0,47	9	A	4,53	A	A	A	A
mean	16,80	9,15	18,31	9,83	17,28	9,76	17,53	7,49		37,99	1,70	12,5	12,5	37,5	37,5
SD	10,61	6,74	14,90	6,64	10,13	6,38	8,74	6,33		24,26	1,72				

RIGHT hemisphere															
replicate	Intensity of staining										Frequency of occurrence (%)				
	LNv1		LNv2		LNv3		LNv4		LNv5	arborization	DN1	DN1	DN2	DN2	
	N	C	N	C	N	C	N	C			all	all	all	all	
1	16,04	7,09	8,02	3,03	9,54	5,74	7,89	4,40	1	A	2,57	A	A	A	A
2	10,68	10,60	8,55	1,43	13,18	9,56	21,36	12,48	2	A	0,50	A	A	A	A
3	3,67	3,40	0,00	0,99	1,14	0,00	7,65	2,91	3	6,03	0,00	A	A	A	A
4	14,10	5,97	21,76	6,17	11,10	2,64	15,23	5,99	4	A	0,00	A	A	A	A
5	x	x	x	x	x	x	x	x	5	x	x	x	x	x	x
6	6,63	3,29	4,18	5,54	4,45	0,00	6,51	2,36	6	A	0,00				
7	45,25	24,48	35,69	22,68	35,79	20,55	36,30	15,56	7	46,58	0,07	P	P	P	P
8	17,07	12,93	17,02	7,97	15,56	10,74	10,05	3,66	8	27,58	0,00	A	A	A	A
9	x	x	x	x	x	x	x	x	9	x	x	x	x	x	x
mean	16,21	9,68	13,60	6,83	12,97	7,03	15,00	6,77		26,73	0,45	14,3	14,3	14,3	14,3
SD	12,70	6,88	11,32	6,89	10,39	6,79	9,97	4,78		16,57	0,88				

Legend: x hemisphere damaged  
 A signal absent (not measured)  
 0,00 signal weak (measured, weaker than background = changed to zero)  
 N nuclear signal  
 C cytoplasmic signal  
 all nuclear and cytoplasmic signal not distinguished

x hemisphere damaged  
 A signal absent  
 P signal present

SUMMARY																
	LNv 1-4			all 4 LNv 1-4 cells are equivalent	LNv 5		intensity frequency	arborization		intensity	DN1		frequency	DN2		frequency
	N	C	N/C		mean	SD		mean	SD		mean	SD		mean	SD	
1	9,11	4,07	2,24													
2	11,54	6,88	1,68													
3	5,77	5,30	1,09													
4	13,94	4,71	2,96													
5	32,61	19,53	1,67													
6	9,14	5,79	1,58													
7	37,70	18,97	1,99													
8	14,93	8,83	1,69													
9	19,03	5,68	3,35													
mean	17,08	8,86	2,03													
SD	10,38	5,70	0,68													

LEFT hemisphere															
replicate	Intensity of staining										arborization	Frequency of occurrence (%)			
	LNv1		LNv2		LNv3		LNv4		LNv5	DN1		DN1	DN2	DN2	
	N	C	N	C	N	C	N	C	all	all		all	all		
1	9,66	4,91	14,91	9,81	9,70	6,99	7,13	4,27	1	A	4,37	A	A	P	A
2	51,99	30,06	35,27	20,87	37,15	17,22	33,15	10,61	2	85,76	-4,88	P	P	P	A
3	13,67	8,95	15,53	10,54	20,49	12,04	24,64	16,16	3	A	-1,51	P	A	A	A
4	30,47	22,39	43,05	33,26	31,66	17,39	25,44	24,06	4	46,17	3,69	P	A	P	A
5	21,69	5,67	17,52	6,32	28,77	6,72	38,96	17,29	5	A	-0,95	A	A	A	A
6	x	x	x	x	x	x	x	x	6	x	x	x	x	x	x
<b>mean</b>	<b>25,50</b>	<b>14,40</b>	<b>25,26</b>	<b>16,16</b>	<b>25,55</b>	<b>12,07</b>	<b>25,86</b>	<b>14,48</b>		<b>65,97</b>	<b>0,14</b>				
<b>SD</b>	<b>15,05</b>	<b>10,05</b>	<b>11,65</b>	<b>9,83</b>	<b>9,58</b>	<b>4,67</b>	<b>10,74</b>	<b>6,66</b>		<b>19,80</b>	<b>3,45</b>				

RIGHT hemisphere															
replicate	Intensity of staining										arborization	Frequency of occurrence (%)			
	LNv1		LNv2		LNv3		LNv4		LNv5	DN1		DN1	DN2	DN2	
	N	C	N	C	N	C	N	C	all	all		all	all		
1	19,83	16,12	11,84	7,01	14,20	7,57	15,65	14,25	1	A	-3,53	A	A	A	A
2	x	x	x	x	x	x	x	x	2	x	x	x	x	x	x
3	16,99	10,48	18,57	8,53	22,17	10,85	15,16	4,12	3	36,23	0,13	P	A	A	A
4	17,83	7,83	12,11	7,06	13,13	7,07	15,37	4,67	4	19,93	3,75	P	P	A	A
5	10,61	1,32	9,74	3,96	14,95	1,22	8,15	1,11	5	A	-0,18	A	A	A	A
6	20,22	8,1	28,62	9,43	23,28	11,34	15,13	10,02	6	29,74	1,37	A	A	P	A
<b>mean</b>	<b>17,10</b>	<b>8,77</b>	<b>16,18</b>	<b>7,20</b>	<b>17,55</b>	<b>7,61</b>	<b>13,89</b>	<b>6,83</b>		<b>28,63</b>	<b>0,31</b>				
<b>SD</b>	<b>3,46</b>	<b>4,77</b>	<b>6,89</b>	<b>1,86</b>	<b>4,28</b>	<b>3,62</b>	<b>2,88</b>	<b>4,69</b>		<b>6,70</b>	<b>2,37</b>				

**Legend:**  
 x hemisphere damaged  
 A signal absent (not measured)  
 0,00 signal weak (measured, weaker than background = changed to zero)  
 N nuclear signal  
 C cytoplasmic signal  
 all nuclear and cytoplasmic signal not distinguished

x hemisphere damaged  
 A signal absent  
 P signal present

SUMMARY												
	LNv 1-4			all 4 LNv 1-4 cells are equivalent	LNv 5		arborization	DN1		DN2		
	N	C	N/C		intensity	frequency		intensity	frequency	frequency		
	1	12,87	8,87		1,45							
2	39,39	19,69	2,00									
3	18,40	10,21	1,80									
4	23,63	15,47	1,53									
5	18,80	5,45	3,45									
6	21,81	9,72	2,24									
<b>mean</b>	<b>22,48</b>	<b>11,57</b>	<b>2,08</b>		<b>mean</b>	<b>43,57</b>	<b>50</b>	<b>mean</b>	<b>0,23</b>	<b>35</b>	<b>20</b>	
<b>SD</b>	<b>8,27</b>	<b>4,67</b>	<b>0,67</b>		<b>SD</b>	<b>22,76</b>		<b>SD</b>	<b>2,96</b>			

LEFT hemisphere																	
replicate	Intensity of staining										arborization			Frequency of occurrence [%]			
	LNv1		LNv2		LNv3		LNv4		LNv5	all	arborization	DN1	DN1	DN2	DN2		
	N	C	N	C	N	C	N	C	all			all	all	all			
1	34,05	18,00	32,59	21,36	33,76	12,91	35,13	18,15	32,36		3,00	P	P	A	A		
2	x	x	x	x	x	x	x	x	1	x	x	x	x	x	x		
3	7,74	2,89	12,19	11,02	11,12	4,92	11,64	6,15	2	A	0,00	P	P	A	A		
4	20,33	8,45	10,28	2,25	17,54	10,46	13,85	7,99	3	31,40	0,71	A	A	A	A		
5	16,04	13,53	19,24	7,54	22,67	14,27	17,41	11,92	4	A	1,26	A	A	A	A		
6	9,15	7,10	13,56	12,97	10,41	11,16	16,17	10,69	5	A	1,99	A	A	A	A		
7	10,46	7,24	11,11	5,38	11,50	6,15	11,48	7,35	6	A	0,37	P	P	P	P		
8	x	x	x	x	x	x	x	x	7	x	x	x	x	x	x		
<b>mean</b>	<b>16,30</b>	<b>9,54</b>	<b>16,50</b>	<b>10,09</b>	<b>17,83</b>	<b>9,98</b>	<b>17,61</b>	<b>10,38</b>	<b>8</b>	<b>31,88</b>	<b>1,22</b>	<b>50</b>	<b>50</b>	<b>16,7</b>	<b>16,7</b>		
<b>SD</b>	<b>9,04</b>	<b>4,90</b>	<b>7,76</b>	<b>6,14</b>	<b>8,34</b>	<b>3,39</b>	<b>8,13</b>	<b>3,99</b>		<b>0,48</b>							

RIGHT hemisphere																	
replicate	Intensity of staining										arborization			Frequency of occurrence [%]			
	LNv1		LNv2		LNv3		LNv4		LNv5	all	arborization	DN1	DN1	DN2	DN2		
	N	C	N	C	N	C	N	C	all			all	all	all			
1	13,58	3,95	7,56	2,89	15,72	5,81	13,71	6,04	1	A	0,00	P	P	P	A		
2	13,17	12,93	17,80	10,64	23,33	14,56	17,74	10,77	2	A	0,00	A	A	A	A		
3	27,54	15,06	33,66	19,03	17,84	3,13	41,93	15,26	3	30,22	3,15	P	P	A	A		
4	33,63	17,13	27,93	22,92	22,82	13,42	13,91	2,90	4	20,72	1,18	A	A	P	P		
5	18,76	4,02	8,00	6,46	18,17	9,61	8,38	4,41	5	28,11	0,00	A	A	A	A		
6	8,97	4,86	10,55	6,25	8,39	7,85	10,06	10,5	6	A	0,77	A	A	A	A		
7	x	x	x	x	x	x	x	x	7	x	x	x	x	x	x		
8	35,7	31,43	45,98	12,02	30,83	10,78	37,34	16,78	8	A	2,9	A	A	A	A		
<b>mean</b>	<b>21,62</b>	<b>12,77</b>	<b>21,64</b>	<b>11,46</b>	<b>19,59</b>	<b>9,31</b>	<b>20,44</b>	<b>9,52</b>		<b>26,35</b>	<b>1,14</b>	<b>28,6</b>	<b>28,6</b>	<b>28,6</b>	<b>14,3</b>		
<b>SD</b>	<b>9,87</b>	<b>9,18</b>	<b>13,62</b>	<b>6,71</b>	<b>6,51</b>	<b>3,77</b>	<b>12,51</b>	<b>4,93</b>		<b>4,07</b>							

**Legend:**  
 x hemisphere damaged  
 A signal absent (not measured)  
 0,00 signal weak (measured, weaker than background = changed to zero)  
 N nuclear signal  
 C cytoplasmic signal  
 all nuclear and cytoplasmic signal not distinguished

x hemisphere damaged  
 A signal absent  
 P signal present

SUMMARY													
	LNv 1-4			all 4 LNv 1-4 cells are equivalent	LNv 5		arborization		DN1	DN2			
	N	C	N/C		intensity	frequency	intensity	frequency	frequency	frequency			
1	23,26	11,14	2,09		mean	28,56	38,5	mean	1,18	38,5	19,2		
2	18,01	12,23	1,47										
3	20,46	9,68	2,11										
4	20,04	10,69	1,87										
5	16,08	8,97	1,79										
6	10,91	8,92	1,22										
7	11,14	6,53	1,71										
8	37,46	17,75	2,11										
<b>mean</b>	<b>19,67</b>	<b>10,74</b>	<b>1,80</b>	<b>SD</b>	<b>7,87</b>	<b>3,10</b>	<b>0,30</b>	<b>SD</b>	<b>4,17</b>	<b>1,16</b>			