

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Vztah mezi lokomoční aktivitou, oxidačním stresem
a stárnutím ploštice *Pyrrhocoris apterus***

Diplomová práce

Bc. Marcela Buřičová

Školitelka: Doc. RNDr. Magdalena Hodková, CSc.
ENTÚ BC AVČR, v.v.i.

České Budějovice 2012

Diplomová práce

Buřičová, M., 2012. Vztah mezi lokomoční aktivitou, oxidačním stresem a stárnutím plošnice *Pyrrhocoris apterus*. [Relationship between locomotor activity, oxidative stress and aging in fire bug *Pyrrhocoris apterus*: Mgr. Thesis, in Czech] - 80p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The hypothesis that experimental manipulations increasing life span correlate to reduced physical activity and reduced molecular oxidative damage was tested. We used three longevity phenotypes of males and females of *Pyrrhocoris apterus*, diapause insects, reproductive insects and insect with ablation of the corpus allatum, an endocrine gland producing juvenile hormone. Protein carbonyl content in thoracic muscles was used as an index of molecular oxidative modification.

Tato práce byla financována z prostředků projektu GAČR č. P502/10/1612.

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.

V Českých Budějovicích, dne 26. 4. 2012

Marcela Buřičová

Abstract

We tested the hypothesis that experimental manipulations increasing life span correlate to reduced physical activity and reduced molecular oxidative damage. We used three longevity phenotypes of males and females of *Pyrrhocoris apterus*, diapause insects, reproductive insects and insects with ablation of the corpus allatum, an endocrine gland producing juvenile hormone. Protein carbonyl content in thoracic muscles was used as an index of molecular oxidative modification. In both sexes, diapause and ablation of the corpus allatum (allatectomy) extended life span, but the intensity of locomotor activity was reduced only by diapause. The carbonyl content, both relative (per protein unit) and absolute (per thorax) increased with age in reproductive insects of both sexes. However, effects of diapause and allatectomy on carbonyl content differed between males and females. In males, the carbonyl content was not affected by either diapause or allatectomy. In females, diapause abolished the age-related increase in both relative and absolute carbonyl level, while only the increase in relative carbonyl level was abolished by allatectomy. Overall, the results show that allatectomy and diapause, although both prolong life span, have differential and sex-specific effects on locomotor activity and carbonyl content and do not provide a general support for the proposed hypothesis. Only the extension of life span in diapause females was accompanied by both reduced locomotor activity and reduced carbonyl content as the hypothesis suggests.

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala své školitelce Doc. RNDr. M. Hodkové, CSc. za milý přístup, trpělivost, cenné rady a provedené alatektomie. Dále RNDr. I. Hodkovi, CSc. za podnětné připomínky. Paní Janě Mikešové a Bc. Hance Vaněčkové za milou společnost, vstřícnost a pomoc s chovy. Svě rodině a blízkým přátelům za podporu.

Obsah

1	ÚVOD	1
1.1	TEORIE STÁRNUTÍ	1
1.1.1	<i>Teorie volných radikálů</i>	2
1.2	STÁRNUTÍ A ENDOKRINNÍ SOUSTAVA	11
1.2.1	<i>Snížená Inzulin/IGF-1 signalizace (IIS) a diapauza</i>	11
1.3	DIAPAUZA, METABOLISMUS, OXIDAČNÍ STRES A STÁRNUTÍ	22
1.4	POHYBOVÁ AKTIVITA A STÁRNUTÍ.....	25
1.5	PYRRHOCORIS APTERUS	26
2	CÍLE PRÁCE	29
2.1	VLIV FOTOPERIODY A CORPORA ALLATA NA DÉLKU ŽIVOTA	29
2.2	VZTAH MEZI DÉLKOU ŽIVOTA A MNOŽSTVÍM KARBONYLOVANÝCH PROTEINŮ (INDIKÁTORU OXIDAČNÍHO POŠKOZENÍ) V HRUDNÍCH SVALECH.....	29
2.3	VZTAH MEZI POHYBOVOU AKTIVITOU A DÉLKOU ŽIVOTA	29
2.4	VZTAH MEZI POHYBOVOU AKTIVITOU A OBSAHEM KARBONYLOVANÝCH PROTEINŮ V HRUDNÍCH SVALECH	30
3	METODIKA	31
3.1	MODELOVÝ ORGANISMUS.....	31
3.2	PŘÍPRAVA VZORKŮ.....	31
3.3	METODIKA STANOVENÍ KARBONYLOVANÝCH PROTEINŮ	32
3.3.1	<i>Spektrofotometrická detekce</i>	32
3.4	METODA BCA.....	34
3.5	JEDNOROZMĚRNÁ ELEKTROFORÉZA A WESTERN BLOT	35
3.5.1	<i>SDS-PAGE Elektroforéza</i>	35
3.5.2	<i>Western Blot</i>	36
3.6	MĚŘENÍ POHYBOVÉ AKTIVITY	37
3.7	STATISTICKÉ HODNOCENÍ	38
4	VÝSLEDKY	39
4.1	VLIV DIAPAUZY A CORPUS ALLATUM NA DÉLKU ŽIVOTA	39
4.2	VLIV OXIDAČNÍHO STRESU NA DÉLKU ŽIVOTA	40
4.3	OBSAH KARBONYLOVANÝCH PROTEINŮ A CELKOVÝCH PROTEINŮ V HRUDNÍCH SVALECH	41
4.3.1	<i>Samice – karbonylované proteiny</i>	42
4.3.2	<i>Samice – celkové proteiny</i>	43
4.3.3	<i>Samci – karbonylované proteiny</i>	44
4.3.4	<i>Samci – celkové proteiny</i>	45

4.4	POHYBOVÁ AKTIVITA.....	46
4.4.1	<i>Pokus 1 – Reprodukční a diapauzní ploštice</i>	<i>46</i>
4.4.2	<i>Pokus 2 – Reprodukční, alatektomované a diapauzní ploštice</i>	<i>49</i>
4.5	INTENZITA POHYBOVÉ AKTIVITY	49
4.6	RYTMUS V POHYBOVÉ AKTIVITĚ.....	51
4.7	POUŽITÍ METODY WESTERN BLOT.....	53
5	DISKUZE	55
5.1	IIS SIGNALIZACE A DÉLKA ŽIVOTA	55
5.2	POHYBOVÁ AKTIVITA A DÉLKA ŽIVOTA	55
5.3	OXIDAČNÍ STRES, METABOLISMUS A POHYBOVÁ AKTIVITA	56
5.4	STÁRNUTÍ A MNOŽSTVÍ OXIDAČNĚ POŠKOZENÝCH PROTEINŮ	57
5.5	POCHYBNOSTI O TEORII OXIDAČNÍHO STRESU	59
6	ZÁVĚRY	62
7	LITERATURA.....	64

1 ÚVOD

1.1 Teorie stárnutí

Stárnutí je považováno za velmi složitý proces, který pro biologii zůstává stále nepochopeným fenoménem. Stárnutí probíhá na všech úrovních, jak molekulárních, buněčných, tak i systémových a všechny úrovně se mohou navzájem ovlivňovat (Weinert a Timiras, 2003). Do dnešní doby vzniklo mnoho teorií popisujících stárnutí z určitého aspektu. Pro zajímavost, bylo uvedeno na 300 teorií stárnutí (Medvedev, 1990). Většina z nich byla popřena a jen několik získalo experimentální podporu.

V dnešní době můžeme teorie stárnutí rozdělit do dvou hlavních skupin, do tzv. teorií programových a teorií chyb. Programové teorie se odvozují od přirozeně určených životních období, kterými organismus prochází (růst, dospělost, stáří), podle tzv. biologického rozvrhu. Změny v genové expresi regulují jednotlivé fáze přes imunitní a „údržbové“ odpovědi organismu. Teorii chyb odvozujeme od vnějších zásahů do organismu způsobujících kumulativní poškození na různých úrovních (Jin, 2010).

Teorie programovaného stárnutí zahrnuje následující podkategorie: i) teorie programované dlouhověkosti, ii) endokrinní teorii a iii) teorii imunologickou.

- i) Teorie programované dlouhověkosti považuje stárnutí za důsledek s věkem klesající schopnosti genů správně řídit organismus (Prinzinger, 2005).
- ii) Endokrinní teorie pracuje s regulací stárnutí přes evolučně konzervovanou cestu řízenou inzulin/IGF-1 signalizací (Van Heemst, 2005).
- iii) Imunitní teorie vysvětluje stárnutí jako pokles efektivity imunitního systému s věkem, důsledkem je vzrůstající náchylnost k infekčním nemocem (Cornelius, 1972).

Teorie chyb zahrnuje teorie: i) „wear and tear“, ii) „rate of living“, iii) „cross-linking“, iv) volné radikály a v) poškození somatické DNA.

- i) Teorie „wear and tear“ je teorií poměrně starou, pochází již z roku 1882. Vysvětluje stárnutí jako sekundární produkt buněčné činnosti (Weismann, 1882). Teorie se principiálně shoduje s teorií „rate of living“.

- ii) Teorie „rate of living“ (Pearl, 1928) vysvětluje stárnutí nepřímým poměrem rychlosti bazálního metabolismu kyslíku k délce života. Podle teorie „rate of living“ se očekávaná délka života určuje rychlostí metabolismu.
- iii) „Cross-linking“ teorie (Bjorksten, 1968) popisuje stárnutí jako akumulaci „cross linking“ makromolekul (spojování totožných nebo rozdílných makromolekul), které zpomalují procesy v organismu a poškozují buňky i tkáně.
- iv) Teorie poškození somatické DNA (Gensler a Bernstein, 1981) říká, že stárnutí způsobují dvě příčiny, poškození nebo mutace DNA.
- v) „Teorie volných radikálů“ popisuje poškození makromolekul volnými radikály. Narušené makromolekuly se akumulují a poškozují buňky i tkáně – příčina stárnutí. Molekuly náchylné k poškození radikály jsou proteiny, lipidy, cukry i nukleové kyseliny.

1.1.1 Teorie volných radikálů

Jedná se o jednu z nejznámějších a přitom i nejkontroverznějších teorií. Teorie byla nejprve formulována Gerschmanem v roce 1954, dále na ní pracoval a rozšiřoval ji Harman. Ještě v polovině 20. století se předpokládalo, že volné radikály jsou příliš reaktivní pro existenci „in vivo“. Harman navrhl, že se volné radikály tvoří i endogenně při metabolických procesech spotřebovávajících kyslík. Z počátku byla myšlenka zamítána, ale s přicházejícími objevy dalších vědců získávala hypotéza důvěryhodnost. Např. potvrzením existence endogenního peroxidu (Chance, 1979) a především objevem enzymu superoxid dismutázy (SOD), jejímž jediným úkolem v organismu se zdálo být odstraňování superoxidových aniontů (McCord a Fridovich, 1969). V roce 1972 Harman teorii volných radikálů modifikoval. Určil mitochondrii jako místo, kde se generuje největší množství volných radikálů. Vznikla tak mitochondriální teorie stárnutí. Mitochondrie produkují zhruba 90 % buněčné energie cestou oxidativní fosforylace, a proto spotřebovávají největší množství kyslíku. Oxidační stres způsobuje tvorbu mutací v mitochondriální DNA (delece, bodové mutace), jejichž množství se s věkem zvětšuje u mnoha druhů organismů (Yui a spol., 2003). Mitochondriální teorie stárnutí se nevyklučovala s teorií „rate of living“ (ROL), protože mitochondrie nejvíce pracují s endogenním kyslíkem. Mohlo se usuzovat, že čím rychlejší je metabolismus, tím více se spotřebovává kyslík a tím více se produkují volné radikály. Následně dochází k většímu poškození organismu a tím se zkracuje délka života. Teorie volných radikálů začala být uznávána, ale teorie ROL upadala v zapomnění, převážně proto, že meziřádová porovnání (mezi ptáky a savci) nepotvrdila očekávání. Podobně

u vnitrodruhových srovnání metabolismu, protože např. ptáci a malí savci by podle teorie měli žít kratší dobu, než jak je tomu ve skutečnosti. Další experimenty ukázaly, že mitochondrie těchto druhů produkují méně volných radikálů, než se předpokládalo (Ku a spol., 1993). Potvrdila se spíše korelace mezi délkou života a množstvím volných radikálů.

Postupně se zjistilo, že oxidační poškození způsobují i peroxidy a aldehydy, které nepatří mezi volné radikály. Právě z tohoto důvodu byla teorie volných radikálů přejmenována na teorii oxidačního stresu (Sohal a Weidrich, 1996). Teorie oxidačního stresu postuluje, že buňky jsou vystaveny oxidačnímu stresu při normálních fyziologických podmínkách, kdy existuje určitá nerovnost v množství prooxidantů a antioxidantů. Tato nerovnost vede k neustálému hromadění oxidativně poškozených makromolekul s věkem, což vede k poklesu efektivnosti buněčných pochodů (Muller a spol., 2007).

Později se ukázalo, že volné radikály nemají pouze negativní dopady na organismus, ale že mají i svou funkci, například v udržování homeostázy, vypořádávání se s infekcí a v regulaci buněčné proliferace (Finkel, 1998).

1.1.1.1 Co jsou volné radikály a ROS?

Volné radikály mohou být prvky, molekuly nebo ionty, které mají ve valenční sféře jeden nebo i několik nepárových elektronů dodávajících částici zvýšenou reaktivitu. ROS (=reactive oxygen species) jsou reaktivní formy molekul obsahující kyslík. ROS zahrnují jak volné radikály, tak i peroxidy a aldehydy. Mezi nejvýznamnější patří superoxidové anionty ($\cdot O_2^-$), hydroxidové radikály ($\cdot OH^-$), peroxid vodíku (H_2O_2), alkyl peroxid radikál ($\cdot OOR$), alkyl peroxid ($\cdot OR$) a organické peroxidy ($ROOR'$).

1.1.1.2 Kde se v organismu berou?

ROS jsou produktem normálního buněčného metabolismu, ale pochází i z vnějšího prostředí. Za faktory environmentálního původu považujeme záření (x-záření, γ -záření a ultrafialové záření) a atmosférické polutanty (ozon, N_2O_2 , NO_2 a cigaretový kouř). Mnoho ROS vzniká jako vedlejší metabolický produkt při autooxidaci redukovaných forem elektronových přenašečů (NAD(P)H, redukované flaviny, cytochrome P450), dále při zánětlivých reakcích, syntéze oxidu dusnatého, oxidázami katalyzovaných reakcí, lipidových peroxidací, glykace/ glykooxidace a při reakcích katalyzovaných kovy (Stadtman a Levine, 2000).

V organismu jsou ROS produkovány v největší míře mitochondriemi. Mitochondrie tvoří ATP ve čtyř-stupňovém procesu: 1) glykolýza, 2) Krebsův cyklus, 3) elektronový, transportní řetězec a 4) oxidativní fosforylace. První dva kroky přímo s kyslíkem nepracují, ale jejich průběh by bez kyslíku nebyl možný. V prvních dvou krocích se redukuje NAD na NADH₂ a FAD na FADH₂. Důležité je si uvědomit, že jejich dostupnost v buňce není neomezená. NAD a FAD jsou okamžitými akceptory elektronů. Kdyby NADH₂ a FADH₂ fungovaly jako zásobárna energie, buňce by jejich zásoba došla a celý proces by zkolaboval. Zde hraje důležitou roli kyslík, který NADH₂ i FADH₂ zpětně oxiduje na NAD a FAD, čímž je uvolňuje pro další využití. Odnímání elektronů z NADH₂ a FADH₂ probíhá v elektronovém transportním řetězci. Řetězec se skládá ze 4 hlavních proteinových komplexů umístěných na vnitřní straně mitochondriální membrány. V prvních třech komplexech dochází k odnímání elektronů z NADH₂ a FADH₂. V posledním komplexu, zvaném cytochrom oxidáza, se redukuje molekula kyslíku na molekulu vody. Uvolnění NAD a FAD je v elektronovém transportním řetězci sekundární proces, primární je tvorba molekuly ATP procesem oxidativní fosforylace (Hill a spol., 2008). V 1 – 2 % případů dochází k neúplné redukci kyslíku a vzniku superoxidového radikálu (O₂⁻), jak bylo zjištěno z pokusů *in vitro* (Boveris a Chance, 1973). Pokusy byly prováděny na izolovaných mitochondriích v nefyziologických podmínkách s vysokou koncentrací kyslíku. Ve fyziologických podmínkách by byla produkce ROS pravděpodobně nižší, uvádí se kolem 0,1 % (St. Pierre a spol., 2002). Superoxidový radikál se tvoří převážně na dvou místech elektronového transportního řetězce: 1) komplex I. (NADH dehydrogenáza) a 2) komplex III. (ubichinon-cytochrom c reduktáza). Při normálních metabolických podmínkách je komplex III. největším producentem ROS (Turrens, 1997). Elektrony z komplexu I. a II. (dehydrogenáza) přecházejí k cytochromu c (ubichinon) a produkují jeho redukovanou formu QH₂. V Q cyklu dochází k postupné jedno-elektronové redukci za využití oxidovaných a redukovaných forem cytochromu b a cytochromu c. Nestabilní meziprodukt Q cyklu (Q⁻) může předávat elektrony i na molekuly kyslíku a tvořit superoxidový radikál. Tvorba superoxidu je neenzymatická a tedy, čím rychlejší metabolismus, tím větší je produkce ROS (Finkel a Holbrook, 2000). V cytoplazmě mohou ROS tvořit NADPH oxidázy a syntetázy oxidu dusnatého (NOS).

1.1.1.3 Co ROS způsobují?

Nerovnost mezi produkcí ROS a antioxidantů navozuje v buňce oxidační stres. Důsledkem tohoto stresu jsou změny ve struktuře proteinů, lipidů nebo nukleových kyselin. Nejvíce studované změny navozené oxidačním stresem jsou změny ve struktuře proteinů, kdy se tvoří karbonylové deriváty (Stadtman, 1992). Tyto deriváty jsou v dnešní době jedním z nejoblíbenějších ukazatelů oxidačního stresu, hlavně díky své stabilitě. Zatímco poškozené nukleové kyseliny podstupují řadu vysoce účinných opravných mechanismů, karbonylace proteinů je, až na výjimky, nevratným oxidačním procesem (Dalle-Donne a spol., 2003).

Teoreticky by mohly být karbonylovány všechny typy proteinů, ale zdá se, že některé proteiny a tkáně podléhají karbonylaci více než jiné (Yan a spol., 1997). Existují faktory, které umožňují předpovídat citlivost aminokyselin vůči ROS (Obr.1). Citlivost můžeme posuzovat podle zastoupení aminokyselin citlivých k oxidaci, přítomnosti kov-vazebných míst a podle pozice proteinu v buňce (Avery, 2011). Vliv má i terciální struktura proteinů. Pokud dojde ke špatnému sbalení proteinu, je protein náchylnější ke karbonylaci (Dukan, 2000). Přibývá i poznatků, že nově syntetizované proteiny jsou nejnáchylnější na oxidaci, jelikož ještě nezískaly konečnou terciální strukturu a nezačlenily se do proteinových komplexů, které poskytují ochranu před ROS (Medicherla a Golberg, 2008). Proteiny náchylné k oxidačnímu poškození často nacházíme ve specifických metabolických drahách a funkcích jako je např.: energetický metabolismus, mitochondriální proteiny, chaperony a jednotky ubiquitin-proteazomového systému.

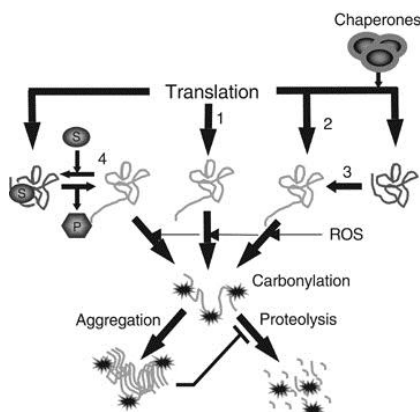
Navíc se ukázalo, že oxidační poškození proteinů hraje roli i v proteinové funkci a také při degradaci proteinů. Rychlá karbonylace poškozených proteinů umožňuje kvalitativní kontrolu, protože karbonylované proteiny jsou náchylnější k degradaci než nekarbonylované. Většina karbonylovaných proteinů, ať už se jedná o proteiny poškozené ROS nebo specificky oxidované pro signální účely, není opravena, nýbrž odstraněna proteolytickou degradací v endogenních proteázách (katepsin c, kalpain, trypsin a hlavně proteazom 20s).

Důvody, proč nedochází k odstranění některých karbonylovaných proteinů, zatím nejsou známy (Levine, 2002). Velké množství studií dokázalo, že množství karbonylovaných proteinů stoupá s věkem u různých buněk, organel i tkání, (Yan a spol., 1997). Akumulace karbonylovaných proteinů narušuje buněčnou funkci, způsobuje ztrátu

katalytické činnosti, strukturální integrity a narušuje regulační procesy v buňce (Stadtman a Levine, 2000).

Příčiny pro vznik karbonylovaných proteinů mohou být (Nynström, 2005):

- oslabení antioxidačního obranného systému
- zvýšená produkce ROS
- zhoršená schopnost odstraňování poškozených proteinů
- zvýšená náchylnost proteinů k oxidativnímu poškození



Obrázek 1 Vznik proteinů náchylných ke karbonylaci (1- chybná translace, 2- chybná terciální struktura, 3- poškození stresem, 4- karbonylace nečinných enzymů). Tvorba cross linked proteinů a jimi způsobená inhibice proteazomů (podle Nyström 2005).

Stárnutí je doprovázeno ztrátou proteolytické kapacity a akumulací katalyticky méně aktivních, teplotně citlivějších enzymů (Dreyfus a spol., 1978). Bylo prokázáno, že s věkem spojenou akumulaci poškozených enzymů způsobují, alespoň částečně, poškozené proteiny, bereme-li v úvahu následující zjištění:

- 1) Změny srovnatelné se stárnutím (katalytická aktivita, teplotní stabilita a citlivost vůči proteolytické degradaci) mohou být u přečištěných enzymů navozeny jejich vystavením ROS *in vitro* (Stadtman, 1990).
- 2) Stejná poškození enzymů jako u starých živočichů můžeme najít i u mladých poté, vystavíme-li je oxidačnímu stresu (Yan a spol., 1997).
- 3) Faktory a fyziologické podmínky vedoucí k prodloužení délky života, způsobují i pokles v hladině intercelulárních oxidovaných proteinů (měřeno množstvím karbonylovaných proteinů) (Sohal a spol. 1993).
- 4) Proteiny ve tkáních starých živočichů jsou senzitivnější k oxidativnímu poškození než tkáň mladých živočichů (Agarwal a Sohal, 1993).

Dalším důležitým faktorem je dostupnost volného železa v buňce, které katalyzuje karbonylaci proteinů (Stadtman a Levine, 2000). Současná data ukazují, že karbonylace proteinů se může objevit, aniž by došlo k nárůstu produkce ROS, zhoršení antioxidační

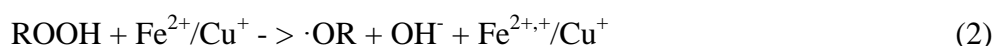
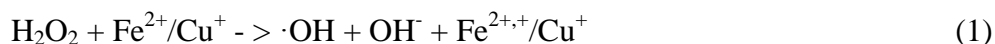
obranu nebo snížení proteazomové aktivity. V tomto případě dochází ke karboxylaci díky nárůstu (větší dostupnosti) a citlivosti substrátu k oxidativnímu poškození. Karboxylace je potom méně specifická. Dalším případem, kdy dochází k nárůstu frekvence karboxylace, je podávání antibiotik, např. streptomycinu. Po podání tohoto léku dojde k nárůstu produkce superoxidu. Aktivita superoxid dismutázy a katalázy zůstává stejná. Taktéž nedochází ani ke změně exprese genů využitých v obraně proti oxidačnímu stresu (Dukan a spol., 2000).

1.1.1.4 Způsob oxidace proteinů

- a) přímou oxidací postranních řetězců aminokyselin (AA)
- b) oxidací peptidické vazby
- c) reakcí s produkty oxidace lipidů a cukrů

a) Přímá oxidace postranních řetězců AA

Přímá oxidace probíhá v normálních podmínkách nejčastěji kovem katalyzovanou oxidací MCO (=metal catalyzed oxidative attack) aminokyselinových postranních řetězců prolinu, argininu, lysinu a threoninu. Nejběžnější koncové produkty systémů produkujících ROS jsou peroxid vodíku (H_2O_2) a organické peroxidy ($ROOR'$). Peroxidy samy o sobě příliš reaktivní nejsou. Avšak v přítomnosti přechodných kovů (Fe^{2+} , Cu^+) přecházejí do formy vysoce reaktivních hydroxidových radikálů (1) nebo alkylových radikálů (2), které reagují téměř se všemi dalšími organickými molekulami.



Oxidace proteinů při normálních fyziologických podmínkách probíhá místně-specificky. Ionty kovů se vážou na vazebná místa kov/ protein. Následně reagují s peroxidem za vzniku ROS ($\cdot OH$, $\cdot RO$), které reagují přednostně s aminokyselinovými deriváty poblíž jejich vazebného místa (Stadtman, 1990). Na oxidaci hydroxylovým radikálem jsou náchylné všechny typy aminokyselinových zbytků. Oxidace proteinů je reakcí nevratnou, existují však výjimky. Oxidaci cysteinu a methioninu je možné opravit. Jedná se zřejmě o systém chránící tyto aminokyseliny před nevratným poškozením oxidačním stresem. Cystein a methionin obsahují, jako jediné dvě aminokyseliny, síru, a proto jsou citlivější na oxidaci více než jiné aminokyseliny (Lee, 2009). Cystein se oxiduje na disulfid, methionin na methionin sulfoxid (MeSOX). Methionin je jednou z nejcitlivějších aminokyselin k oxidativnímu poškození vůbec. Téměř všechny organismy tvoří enzym methionin sulfoxid reductázu opravující

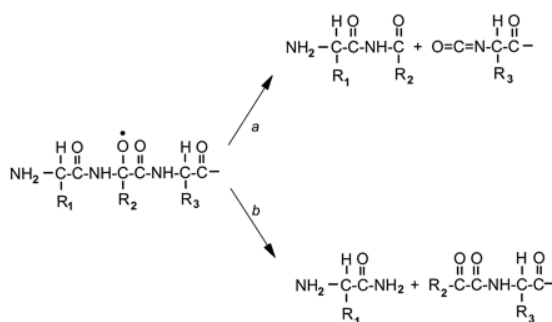
modifikace této AA způsobené oxidativním poškozením (Avery, 2011). Náchylnější k oxidačnímu stresu jsou i aromatické aminokyseliny (Berlett a Stadtman, 1997).

b) Oxidace peptidické vazby

Oxidativní poškození peptidické vazby zahajuje hydroxylový radikál ($\cdot\text{OH}$) pocházející např. z radiolýzy vody nebo kovem katalyzovaného štěpení peroxidu. Hydroxylový radikál nejprve reaguje s α -atomem uhlíku aminokyselinového zbytku, čímž je vytvořen radikál s atomem uhlíku v centru ($\cdot\text{CR}$). Tento radikál okamžitě reaguje s O_2 . Vytvoří alkylperoxy radikál ($\cdot\text{OOR}$), který dále reaguje na alkylový radikál ($\cdot\text{OR}$) a finálně na hydroxylový derivát proteinu. Reakce mohou být katalyzovány peroxidovým radikálem nebo ionty kovů (Fe^{2+} , Cu^+). Všechny přechodné stavy ($\cdot\text{CR}$, $\cdot\text{OOR}$, $\cdot\text{OR}$) mohou reagovat s dalšími aminokyselinami v rámci jednoho nebo jiného proteinu a tvořit tak nové radikály s uhlíkem v centru. Pokud reagují dva uhlíkové radikály navzájem, vzniká „cross-linked“ derivát protein-protein.

Alkylový radikál podporuje rozštěpení peptidické vazby diamidovou nebo α -amidovou cestou (Obr.2).

- Fragment zbylý po diamidovém štěpení vzniklý od N-konce získává na C-konci diamidovou strukturu ($(\text{NH}_2)_2$). Fragment vzniklý štěpením od C-konce získá na N-konci izokyanátovou strukturu ($-\text{N}=\text{C}=\text{O}$).
- Fragment zbylý po α -amidovém štěpení vzniklý od N-konce vlastní na C-konci amidovou skupinu, na druhém fragmentu od C-konce se na N-konci vyskytuje N- α ketoacyl derivát.



Obrázek 2 Štěpení peptidické vazby a) diamidovou cestou, b) α -amidovou cestou (podle Berlett a Stadtman, 1997)

Po kyselé hydrolýze peptidové fragmenty utvořené diamidovým štěpením získávají CO_2 , HN_3 a volnou karboxylovou skupinu. Po hydrolýze α -amidovou cestou získá fragment skupinu NH_3 a volnou α -ketokarboxylovou skupinu (Berlett a Stadtman, 1997).

c) Reakce s produkty oxidace lipidů a cukrů

Oxidačně poškozené proteiny vzniknou reakcí se sekundárními produkty oxidace lipidů, kterými jsou: 4-hydroxy-2-nonenal - HNE, malondialdehyd - $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$) (Esterbauer, 1991). Dále vznikají jako důsledek reakce karbonylovaných derivátů (ketoaminy, ketoaldehydy, deoxyozonem), které vznikají jako důsledek reakce redukujících cukrů (glykace a glykooxidace) (Kristal a Yu, 1992) s lysinovými deriváty proteinu (Garrison, 1987).

1.1.1.5 Vznik karbonylovaných derivátů proteinů

Karbonylová skupina (reaktivní aldehydy a ketony) může vzniknout několika různými způsoby:

- a) přímou oxidací aminokyselinových zbytků, převážně lysinu, argininu, prolinu a threoninu (podobné v rámci živočišné říše);
- b) štěpením peptidické vazby (α -amidovou cestou)
- c) reakcí s pokročilými koncovými produkty oxidace lipidů a cukrů (především nukleofilní AA jako cystein, histidin a lysin)

1.1.1.6 Antioxidanty

Karbonylovaná skupina proteinů vzniklá některým z výše uvedených mechanismů může dále reagovat s α -amidovou skupinou lysinu ve stejné nebo jiné molekule proteinu a vytvořit intra- nebo inter- propojení proteinu („cross-linked“).

Organismy vyvinuly celou řadu obranných mechanismů vyrovnávajících se s oxidačním stresem. Antioxidanty mění ROS na nereaktivní látky. Jedná se většinou o zvýšenou produkci antioxidantních proteinů, jako například peroxidázy, katalázy, glutathion peroxidázy, glutathion-S-transferázy, glutathion reduktázy, thiol-specifické peroxidázy, thioredoxin reduktázy, superoxid dismutázy a methionin sulfoxid dismutázy (Avery, 2011). Kovy vážící proteiny jako ferritin, ceruloplazmin a transferin. Dále metabolity a kofaktory jako $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$, NAD^+/NADH , kyselina lipoová, bilirubin, atd. Antioxidačně působí i ionty kovů Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} .

1.1.1.7 Degradace poškozených proteinů

Poškozené proteiny jsou odstraňovány v proteazomálních systémech. Proteazom je enzymatický komplex vyskytující se v cytosolu a v jádře eukaryotických buněk. Degradace poškozených proteinů není 100% účinná a neodstraněné poškozené proteiny mohou

formovat „cross-linked“ proteiny shromažďující se s věkem (Dunlop a spol., 2009). Cross-linked proteiny jsou rezistentní vůči degradaci v proteazomech a navíc snižují schopnost proteazomů odstraňovat jiné oxidované proteiny (Friguet a spol., 1994). Poslední možností na odstranění agregovaných molekul je autofágní destrukce. Ani zde nedochází k naprostému odbourávání (Pan a spol., 2008).

1.1.1.8 ROS jako signalizační prostředek

Zdá se, že změny v intracelulárním redoxním stavu regulují několik důležitých buněčných procesů. Podle některých studií nejsou ROS jen škodlivými vedlejšími produkty, ale cílenými produkty některých enzymů, které se podílejí na řízení procesů v buňce.

ROS se podílí na regulaci buněčného růstu, zahajování a udržování změn buněčných fází, programované buněčné smrti a stárnutí. Jakým způsobem signalizace probíhá, není známo. Receptory růstových faktorů potřebují produkci ROS na některé aspekty „downstream“ signalizace (Dröge, 2002). Existují i příklady ROS zahrnuté do signálních drah inzulinu, cytokinů (tumor nekrosis faktorů α - TNF α , interleukinu β – IL-1 β) (Mahadev a spol., 2001; Xu a spol., 2002).

Další kandidát pro buněčnou signalizaci je protein tyrozin fosfát (PTP), jelikož obsahuje velké množství cysteinu na aktivní straně – přístupné k oxidantům (cystein je k oxidaci citlivý). Oxiduje se tedy již při nízké hladině oxidantů a jeho výhodou je návratnost do původního neoxidovaného stavu enzymatickou reakcí, což by splňovalo redoxní požadavky pro ROS signalizaci (Finkel, 2003).

Upevňuje se i pomyslná vazba mezi buněčnou odpovědí na oxidační stres a mechanismy regulujícími dlouhověkost. Existují studie u tří genových produktů spojených se stárnutím („forkhead“ transkripční faktor, histon deacetyláza Sir2, p66Shc), které regulují množství intracelulárního ROS v savčích buňkách nebo zvyšují rezistenci k oxidačnímu stresu (Finkel, 2003).

1.1.1.9 ROS a nemoci lidí

Oxidativní stres vede u lidí ke vzniku mnoha nemocí, např. ALS (amyotrofická laterální skleróza), ateroskleróza, Alzheimerova choroba, Parkinsonova nemoc, Freindreichova ataxie, rakovina a další (Roberts a spol., 2009). Zároveň však nedostatek v produkci superoxid dismutázy v neurofilech vede ke snížené schopnosti bojovat proti infekcím. Tato porucha je častá u lidí postižených Downovým syndromem, kteří mají nadbytečnou kopii genu pro SOD (Voorhies, 2001).

1.2 Stárnutí a endokrinní soustava

V současné době dochází k většímu pochopení regulace dlouhověkosti. Poznávají a popisují se molekulární mechanismy ovlivňující stárnutí. Významná data získáváme z modelových organismů *C. elegans*, *D. melanogaster*, *M. musculus* a dalších. Mutace v genech hormonů nebo molekul z jejich signálních drah, považovaných za iniciátory procesu přežití za nepříznivých podmínek, prodlužují přežívání, aniž by došlo k environmentálním příčinám. Proces přežití je antagonistou procesu stárnutí, a proto pomáhá odhalit buněčné a molekulární příčiny stárnutí. Dlouhověcí mutanti pomohli odhalit mnoho genů zahrnutých v endokrinní signalizaci, které jsou univerzální v rámci eukaryot, např. hlavní signální dráhu inzulinu/ „inzulin-like growth“ faktoru 1 (IGF-1) a následná kaskáda, zachovávající si svou funkci napříč organismy. Proto můžeme využívat modelových organismů k poznání univerzálních mechanismů stárnutí, ale musíme mít na paměti, že nevíme, jestli signální dráhy působí u různých druhů stejně.

I přesto, že došlo k poznání četného množství signálních drah, není jasné, jakým způsobem spolu komunikují a interagují. Zajímavým aspektem signálních drah ovlivňujících dlouhověkost je, že nejednají neautonomně. Mutace jedné buňky vede ke změnám v celém organismu. Můžeme tedy říci, že endokrinní signalizace koordinuje stárnutí mezi jednotlivými tkáněmi a buňkami. Poznání toho, že mutace jednoho genu může vést ke zvýšení délky života celého organismu, bylo překvapující. Tyto mutace ukazují, že stárnutí je proces, který podléhá regulaci, nejedná se o proces náhodný, jak by se mohlo zdát. U bezobratlých považujeme endokrinní regulaci spojenou se stárnutím za adaptivní, protože stejné hormony regulují schopnost organismu přežít v průběhu stádií spojených se sníženým metabolismem, pozastaveným vývojem a zvýšenou stresovou rezistencí.

1.2.1 Snížená Inzulin/IGF-1 signalizace (IIS) a diapauza

IIS dráha hraje významnou roli v řízení energetického metabolismu, růstu, reprodukce a dlouhověkosti u *Caenorhabditis elegans*, hlodavců a *Drosophila melanogaster* (Tu a spol., 2005)

a) *Caenorhabditis elegans*

U háďátka *Caenorhabditis elegans* přecházejí jedinci nepříznivé podmínky (nedostatek potravy, velká hustota jedinců) pozastavením vývoje, nazvaného dauer larva. Mutanti v genech dauer formace (Daf) vykazují nezvyklou dlouhověkost. Slabé alelické projevy Daf mutantů v genech *age-1* a *daf-2* (homolog inzulin/IGF-1 jaderného receptoru), které kódují

komponenty inzulin/IGF signální dráhy, vedou k překročení stádia dauer larvy a přeměnu v dlouhověké dospělce, kteří jsou stres rezistentní a délka života je u nich navýšena až o 200% (Guarente a Kenyon, 2000). Proces je řízený geny *daf-16* a primárně inzulin/IGF-1 signalizací (Larsen a spol., 1995).

Hád'átka produkuje kolem 32 inzulin-like ligandů. Po navázání ligandu na inzulin-like receptor (DAF-2), se spustí kinázová kaskáda (PI3-kináza/PDK/Akt dráha) vedoucí k fosforylaci DAF-16 (forkhead transcription factor-FOX), který je uvolněn do hemolymfy. Následuje rychlá reprodukční vyspělost a stárnutí. Pokud nedojde k popsané aktivaci, spouští DAF-16 diapauzu a dlouhověkost. DAF-16 je klíčový regulátor resistance k oxidačnímu stresu, metabolismu, reprodukci i stárnutí. Pokud jsou podmínky příznivé, dochází spíše k růstu a reprodukci, nežli k údržbě organismu a opravám, navíc délka života je kratší. DAF-16 je za příznivých podmínek lokalizován v cytoplasmě. V opačném případě, za stresových podmínek, je DAF-16 lokalizován v jádře. Reprodukce a růst jsou potlačeny a dochází spíše k opravám a údržbě organismu, než k růstu a reprodukci (Henderson a Johnson, 2001).

DAF-16 můžeme považovat za molekulární přepínač v „trade-off“ mezi reprodukcí a délkou života. Inzulin/IGF signalizace negativně reguluje *daf-16*, následně dochází ke zvýšení délky života a resistance ke stresu. Současné snížení metabolismu, reprodukce a zvýšení resistance ke stresu řízené inzulin/IGF-1 signalizací může být důvodem ke zpomalení stárnutí (Tatar a spol., 2003). Existují ale důkazy, že pozitivní vliv na stárnutí může být odloučen od negativního vlivu reprodukce, protože zastavení exprese DAF-2 (*C.elegans* homolog InR) RNA interferencí během vývoje vedlo ke snížení plodnosti, ale u dospělců stejný zásah nevedl ke snížení plodnosti za současného zvýšení délky života (Dillin a spol., 2002). Odnětí celých gonád (buňky zárodečné linie a somatické tkáně) zastavilo produkci vajíček, ale neovlivnilo délku života. Odstranění buněk zárodečné linie samotných způsobilo prodloužení délky života, které je závislé na IIS a DAF-16 (Hsin a Kenyon, 1999).

Odnětí buněk zárodečné linie u hád'átka prodlužuje délku života. Prodloužení délky života a odnětí buněk zárodečné linie závisí např. na DAF-9 (homolog cytochromu P450), DAF-12 (homolog jaderného receptoru) a DAF-16. Přítomnost a dělení buněk zárodečné linie má negativní vliv na stárnutí (Arantes-Oliveira a spol., 2002). Data naznačují existenci signální dráhy, ve které se steroidní hormon, syntetizovaný z cholesterolu v procesu vyžadujícím DAF-9 a DAF-36, váže na DAF-12 a aktivuje DAF-16, což vede k prodloužení délky života. Produkce steroidního hormonu je potlačena dělením buněk zárodečné linie.

Odnětí buněk zárodečné linie prodlouží dobu života dlouhověkých mutantů *daf-2*. Znamená to, že reprodukční signální dráha působí paralelně k IIS dráze v řízení dlouhověkosti (Arantes-Oliviera a spol., 2003). Do dnešní doby byly identifikovány dva steroidní hormony působící na reprodukci a délku života. Jsou jimi pregnenolon a „bile-acid like cholestenoidic acid“ (Motola a spol., 2006).

Inzulin/IGF-1 signalizace, „transforming growth factor- β “ (TGF- β) a signální dráha serotoninu působí na jediného příjemce signálu – hormonální receptor jádra DAF-12 (Antebi a spol., 2000). Mutanti v genu pro *daf-2*, který řídí vznik dauer larvy a stárnutí, pomáhají objevit mechanismus působení sekundárních hormonů, kterými jsou: ligand pro jaderný receptor DAF-12, DAF-9 a cytochrom P450.

Příjem živin řídí inzulin/IGF a TGF- β dráhy stimulující produkci DAF-12 ligandu přes DAF-9, který indukuje reprodukci a stárnutí. Někteří mutanti v genu *daf-9* přežívají o 25% déle než divoký typ (Jin a spol., 2002). Mutanti *daf-9* dále prodlužují délku života *daf-2* mutantům, kdy signální dráha vede přímo přes *daf-12*. Je pravděpodobné, že DAF-9 signální dráha funguje paralelně s inzulin/IGF signalizací.

b) Hmyz

i) Juvenilní hormon

Podobně jako háďátko i hmyz se brání nepříznivým podmínkám vstupem do stavu se sníženým metabolismem, tzv. diapauza. U dospělců se diapauza projevuje pozastavením vývoje reprodukčních orgánů, včetně pářícího chování a dlouhověkostí (Tatar a Yin, 2001). Reprodukční diapauza je známa u mnoha druhů hmyzu, např. brouků, rovnokřídlých a u některých druhů much a motýlů. U některých druhů hmyzu se podařilo navodit reprodukční diapauzu odnětím corpora allata (CA). Odstranění CA indukuje diapauzu a zároveň prodlužuje délku života *Drosophila* o více než 100% (Tatar a Yin, 2001). Stejná situace je i u rovnokřídlých (Pener, 1972), ploštice *Pyrrhocoris apterus* (Hodková 2008), kdy chirurgické odnětí CA výrazně prodlužuje délku života oproti kontrolním jedincům. Endokrinní žlázy CA produkují a uvolňují juvenilní hormon (JH) pod vlivem vnějších podmínek, kterými jsou teplota, potrava, fotoperioda, koordinovaně se signály vnitřními (Hartfelder, 2000).

JH ovlivňuje mnoho životních procesů hmyzu (metamorfózu, chování, reprodukci). Jedná se o „lipid-like“ hormon sesquiterpenoidní povahy. U dospělců indukuje vitelogenezi a potlačuje diapauzu. Stimuluje syntézu a sekreci žloutkového proteinu tukovým tělesem

a jejich spotřebu do oocytů (Nijhout, 1994). JH je znám jako „downstream“ efektor inzulinové signální dráhy (Flatt a spol., 2005).

Buňky pars intercerebralis (PI) mozku jsou hlavními producenty inzulin-like proteinů (ILP) u dospělců *D. melanogaster*, které jsou uvolňované do protecerebra, do corpora cardiaca (CC), a do hemolymfy. *Drosophila* produkuje několik typů ILP v neurosekrečních buňkách PI, které se váží na „inzulin-like receptor (InR) v cílových tkáních, jako jsou gonády a tukové těleso (Tatar a spol., 2005). Jiné typy neurosekrečních buněk produkují biogenní aminy, kterými jsou serotonin a dopamin (neurotransmitery a neuromodulátory) (Monastirioti, 1999).

Částečné genetické odstranění neurosekrečních buněk produkujících ILP redukuje expresi *ilp* – RNA a vede ke zvýšení délky života u samic i samců. Octomilky s odstraněnými neurosekrečními buňkami jsou rezistentnější k oxidačnímu stresu a hladovění. Vykazují také sníženou plodnost. Proces by mohl být řízen snížením IIS aktivity (Broughton, 2005). U *Pyrrhocoris apterus* vede odnětí PI a CA k aditivnímu navýšení délky života, tedy není zprostředkováno pouze JH signalizací, jak bylo naznačeno u *Drosophily* (Hodková, 2008).

IIS dráha reguluje u *Drosophila* i velikost těla, protože zvířata nesoucí mutaci v IIS dráze jsou malá („dwarf“). Mutanti v homologu savčího inzulin- receptor-substrát protein (IRS) Chico, který se spojuje s receptorem aktivujícím kinázovou signální dráhu (PI3 kináza), se u *Drosophila* nazývají *chico*. „Null“ mutanti *Drosophila* v IRS homologu *chico*, vykazují až o 45% vyšší délku života a zároveň mají normální velikost těla a plodnost. Zvýšenou délku života mají i mutanti genu kódujícího inzulin-like receptor (*InR*), ekvivalent k *daf-2* u háďátka (Clansy a spol., 2001). Heterozygotní mutanti se dvěma odlišnými mutacemi v inzulin/IGF-1 receptoru a žijí až o 85% déle, nežli kontroly (Tatar a spol., 2001). Prodloužení délky života mutacemi *InR* a *chico* podléhá nedostatku JH, protože syntéza JH je u *InR* „dwarf“ nepatrná a po aplikaci methoprenu (analogu JH) se zahájí vitelogeneze a obnoví normální délka života (Tu a spol., 2002). Z výše uvedených zjištění můžeme označit JH jako „pro-aging“ hormon. Z výše uvedeného vyplývá, že nemusí existovat spojitost mezi zvýšenou délkou života a sníženou reprodukcí zvýšením IIS u *Drosophila*, podobně ani u háďátka (Gems a spol., 1998).

Klíčovým transkripčním faktorem IIS u octomilek je FOXO, homolog DAF-16 u háďátka, který je vysoce konzervovaným savčím „forkhead“ transkripčním faktorem. Reguluje buněčný cyklus, apoptózu, opravy DNA, metabolismus a rezistenci k oxidačnímu

stresu (Partridge a Brüning, 2008). IIS dráha negativně reguluje FOXO fosforylací přes konzervovanou kinázovou kaskádu s PI3K a protein kinázou B (PKB), která zabraňuje přesunu FOXO k jádru. Pokud je IIS zablokována, vstupuje nefosforylovaný FOXO z hemolymfy do jádra, kde reguluje transkripci genů (včetně genů ovlivňujících oxidační stres), čímž způsobí zvýšenou resistenci ke stresu a dlouhověkost. Zvýšená exprese dFOXO v tukovém tělese dospělců octomilky zvyšuje délku života a zároveň snižuje reprodukci u samiček, ale nemá žádný vliv na délku života samců (Giannakou a spol., 2004).

Zároveň, při sníženém kalorickém příjmu, což vede ke snížení IIS, dojde k zvýšení transkripce *Inr* a připravení buněk na změnu v potravních podmínkách (Puig a spol., 2003). Podobnou regulaci nacházíme i u savců (Puig a Tjian, 2005). Současné studie označují FOXO jako hlavní faktor v organizaci transkripční odpovědi na příjem potravy. Mitochondriální biogeneze spojená se zvýšeným příjmem potravy je spojena s IIS ztrátou FOXO zprostředkovanou represí „peroxisome-proliferator γ “ koaktivátor 1 (PCG-1) (Gershman a spol., 2007).

Existuje několik kandidátů na receptor JH. Prvním z nich je MET. Gen pro MET je X-vazebný *Metopren-tolerant* (*Met*, nebo *Resistance to Juvenile Hormon*, *Rst(1)JH*), který je členem rodiny transkripčních regulátorů. Druhým kandidátem je UPS, viz níže. Bez navázaného ligandu se MET vyskytuje jako neaktivní homodimer. Protein MET obsahuje základní helix-loop-helix (bHLH)strukturu následovanou dvěma Per-Arnt-Sim (PAS) doménami (Ashok a spol., 1998). Po navázání ligandu (JH nebo homologů) na PAS-B specificky vazebnou doménu MET dojde ke strukturním změnám a homodimer se rozpadne na jednotlivé MET. To umožní navázání Taimanu, protein podobný savčímu steroidnímu receptoru koaktivátoru 1 (SRC-1)/NCoA-1/p160. Dimer MET-Taiman by mohl být aktivní JH receptor (Charles a spol., 2011). Zdá se, že pleiotropní působení JH je způsobeno genetickou různorodostí vazby JH na receptor (Flatt a Kawecki, 2004), ale mechanismus není znám.

Při zvýšení délky života u mutantů mušky v IIS dráze, stejně tak u podobných mutantů háďátka, bývá snížena reprodukce. Situace je obdobná reprodukční diapauze. Snížená reprodukce je považována za nejběžnější „trade-off“ u populací dlouhověkých octomilek (Stearns a spol., 2000). Mutanti *Drosophila* v receptoru inzulin/IGF-1 jsou sterilní a jejich ovária se podobají ováriím diapauzních jedinců divokého typu a vykazují snížený titr JH. Po podání methoprenu započala těmto mutantům vitelogeneze a obnovila se normální délky života. Což znamená, že IIS stimuluje tvorbu JH v CA, a vzájemně reguluje délku život

a reprodukční diapauzu. JH však pravděpodobně nebude jediným hormonem ovlivňujícím dlouhověkost, protože jsou známi i mutanti, kteří nesou mutaci v IIS a přesto žijí stejně dlouho jako divoký typ mušek (Tatar a spol., 2001).

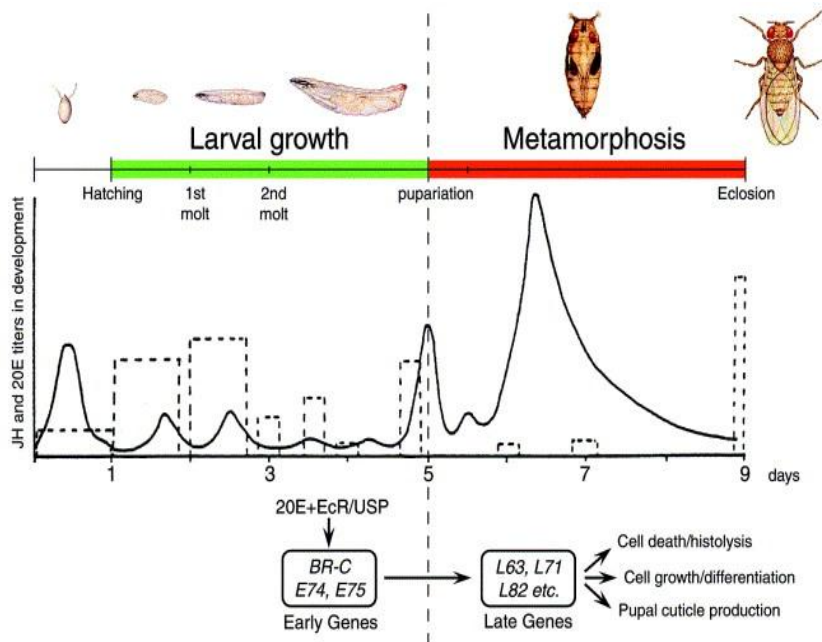
Odnětí reprodukčních tkání bylo považováno za další faktor prodlužující délku života. Nicméně odnětí buněk zárodečné linie v brzkém stupni vývoje nevede k prodloužení délky života u octomilek (Barnes a spol., 2006), ale odnětí buněk v pozdějších vývojových fázích zvyšuje dlouhověkost a je spojeno s vlivem IIS (Flatt a spol., 2008). U ruměnice pospolné nemá odnětí ovárií žádný vliv na délku života (Hodková, 2008).

Řízení dlouhověkosti a stárnutí není vůbec jednoduché vysvětlit, protože existují i výjimky, které dokáží vyvrátit mnohé hypotézy. Délka života nezávisí na velikosti těla, protože heterozygotní mutanti v *chico* null/+ dosahují normální velikosti, ale žijí déle (~35%) než kontroly. Ani snížená plodnost pravděpodobně nezpůsobuje dlouhověkost, protože *chico* (-) samičky s mutací odstraněnými ovárii žijí déle než *chico* (+) kontroly, kterým analogicky chybí ovária (Clancy a spol., 2001). IIS interaguje s nejméně dvěma vnitrobuněčnými kaskádami: 1) „amino-acid-sensing Target of Rapamycin“ (TOR) dráhou a 2) „stress-sensing Jun NH₂“ (JKN) dráhou. Obě dvě jsou součástí kontroly stárnutí u háďátka a octomilek (Giannakou a Partridge, 2007).

ii) *Ekdyzon*

Dalším kandidátem na regulaci stárnutí u hmyzu je steroidní hormon ekdyzon, ovlivňuje vývoj, metamorfózu a u dospělců oogenezi či spermatogenezi (Obr.3) (Kozlova a Thummel, 2000). Klíčovým signálem k produkci ekdyzonu je neuropeptid zvaný prothoracikotropní hormon (PTTH). PTTH je syntetizován ve dvou velkých neurosekrečních buňkách nacházejících se v dorzolaterálním regionu mozkových hemisfér. Tyto neurony inervují endokrinní žlázy hmyzu: corpora allata (CA), u některých druhů hmyzu corpora cardiaca (CC) (Bollenbacher a spol., 1980). PTTH je uvolňován z neurohemálních orgánů (CA, CC) pod složitou kontrolou různých signálů do hemolymfy. Mechanismus regulace hladiny PTTH stále není známý (Thummel, 2001), ale je ovlivněn environmentálními stimuly, jako je fotoperioda – cirkadiální rytmy (Truman, 1972) a teplota, tak stimuly vnitřními, např.: velikost těla, váha a příjem živin (Truman a Riddiford, 1974). Produkci podněcuje i JH, jak bylo zjištěno v předposledním instaru larvy u motýlů (Mizoguchi, 2001). PTTH je peptidický hormon neschopný vstoupit do buněk prothorakálních žláz, syntetizujících z cholesterolu ekdyzon. Jeho funkce závisí na receptorech spojených s G-

proteinem, jehož aktivací stoupne hladina „druhého posla“ (Ca²⁺) v buňce. Přes Ca²⁺-calmodulin závislou adenylát cyklázu se spouští cAMP, který aktivuje cestu protein kinázy, ta fosforyluje a aktivuje enzymy biosyntetických procesů vedoucích k buněčné odpovědi – syntéze a sekreci ekdyzonu (Klowden, 2007). U dospělců se z ekdyzonu tvoří, převážně v periferních tkáních a ve folikulárních buňkách (ovaria, testes), aktivní forma ekdyzonu, metabolit 20-OH-ekdyzon (20E). 20E produkovaný v ováriích bývá ukládán do vajíček a po vykladení využíván embryem (Gilbert a spol., 2002).



Obrázek 3 Titry juvenilního hormonu a 20-hydroxyekdyzonu během vývoje *Drosophila*. Rovnováha mezi 20E (souvislá čára) a JH (přerušovaná čára) v jednotlivých fázích vývoje (značeno nad grafem). Všechny vývojové přechody jsou zahajovány 20E (larva-larva, larva-kukla, kukla-dospělec) a ukončovány JH. Kuklení a růst se vyskytují za přítomnosti vysokého titru JH. Na konci vývoje poklesne titr JH a 20E zahájí tak kuklení. Od třetího instaru, pod grafem, vidíme genetické řízení metamorfózy (podle Dubrovsky 2005).

Sekvenčně specifická transkripce řízená ekdyzonem je zprostředkována dvěma jadernými receptory: ekdyzon receptorem - EcR a Ultraspiraklem – UPS (homologem retinoid X receptoru obratlovců). EcR a UPS spolu vytváří heterodimerní komplex, který může aktivovat nebo inhibovat transkripci. Aktivní metabolit 20-OH-ekdyzon (20E) je exportován do tukového tělesa, kde funguje jako aktivační ligand pro EcR. Ligandem pro UPS může být JH, který po navázání na UPS vykazuje supresivní efekt na ekdyzon dependentní aktivaci transkripce, pravděpodobně aktivací histone deacetylázového komplexu s inhibičními účinky na transkripci – zvyšuje pozitivní náboj histonů (Maki a spol., 2004). Avšak nevykazuje plně afinitní vazbu typickou pro vazbu hormon receptor (Dubrovsky, 2005). Po navázání ekdyzonu na EcR se komplex naváže na koaktivátory, které aktivují enzymy histon acetyltransferázy – snižují kladný náboj histonů a umožní uvolnění DNA, čímž se uvolní pro transkripci „early genes“: *Broad-Complex* (BR-C), *E74* a *E75*,

každý kóduje několik izoform proteinů, DNA vazebných transkripčních regulátorů (Thummel, 2001). Proteiny vyprodukované „early genes“ ovlivňují produkci velké skupiny „late genes“: L63, L71, L82 atd., které se přímo či nepřímo podílejí na metamorfologických procesech, jakými jsou buněčná smrt staré larvální tkáně, buněčné proliferace, diferenciace imaginálních tkání a tvorba kutikuly kukly (Thummel, 2002). Komplex EcR/USP se stává funkčním až po navázání chaperonového heterokomplexu (Hsc70 a Hsp 90) (Arbeitman a Hogness, 2000). Při absenci ekdysonu EcR/USP komplex interaguje s jedním nebo více korepresorními proteiny např.: alien a SMRTER. SMRTER je strukturně rozdílný, ale funkčně podobný jadernému korepresoru obratlovců SMRT a N-CoR (Simon a spol., 2003). SMRTER stejně jako alien zprostředkuje represi interakcí se Sin3A, represorem známým utvářením komplexu s histon deacetylázou Rpd3/HDAC. Asociace SMRTER s Sin3A naznačuje, že existují základní mechanismy represe jadernými receptory, které jsou evolučně konzervované mezi obratlovcí a *Drosophila* (Tsai a spol., 1999).

Zvýšená tvorba chaperonů u *D. melanogaster* zvyšuje délku života, stejně jako u *C. elegans* (Tatar a spol., 1997). Stejný účinek má i mutace v genu pro Rpd3 u *Drosophila* (Rogina a spol., 2002). Ekdyzon může být gonádami řízený signál, přes který inzulin způsobuje stárnutí organismu. Potlačení syntézy ekdyzonu nebo mutace pro EcR u *D. melanogaster* působilo prodloužení průměrné délky života (u samců i samic o 40-50%) spolu se zvýšenou odolností vůči stresu a velmi překvapivě se zvýšenou pohybovou aktivitou (Simon a spol., 2003). Neplatí tedy, že snížená aktivita vede k větší dlouhověkosti. Heterozygotní mutanti v EcR nevykazují ani žádné defekty oogeneze (Carney a Bender, 2000), naopak, plodnost u mutantů byla věkově specificky větší než u kontrol (Simon a spol., 2003).

I přesto, že steroidy a inzulinové signální dráhy mají rozdílné účinky na organismus, je patrné, že spolu interagují (Tu a spol., 2002). Stále není jasné, jakým způsobem JH ovlivňuje geny, ale existují dva modely, první říká, že JH upravuje genovou expresi genů aktivovaných 20E a druhý, že 20E přímo ovlivňuje genovou expresi, buď pozitivně, nebo negativně (Dubrovski, 2005). Více je prosazovaný první model. Možnost, jakým JH ovlivňuje 20E transkripční aktivitu je receptorový komplex EcR/UPS nebo řízením BR-C (Dubrovski, 2004). Gen *E75* vykazuje dvojí hormonální regulaci, může být aktivován jak JH, tak 20E. Znamená to, že *E75* může dělat prostředníka mezi dvěma signálními drahami. Během larválního svlékání, 20E narůstá v přítomnosti vysokého titru JH s pozitivním vlivem na *E75A* RNA, která se objeví před transkripcí „early genes“. Později, za přítomnosti JH,

E75A začne koordinovaně „downregulovat“ expresi „early genes“. Na konci larválního vývoje poklesne hladina JH a E75A se stane méně citlivým k 20E. Na počátku třetího instaru larvy, jeden nebo několik nízkých titrů E20 v absenci JH, aktivuje skupinu „early genes“ (*EcR-B*, *E74B* a *BR-C*). Když je BR-C aktivován, nemůže být odstraněn působením JH ani E75A a dochází k tvorbě kukly (Sullivan a Thummel, 2003).

Na závěr můžeme říci, že JH má mimo jiné i úlohu v regulaci ekdyzonu (Riddiford a spol., 2003).

c) Savci

U savců je vztah mezi dlouhověkostí a inzulin/IGF-1 signalizací složitější, kvůli funkčnímu rozdílu inzulinu a IGF-1. Zásadní narušení inzulinové signalizace, která u savců ovlivňuje metabolismus, vede k metabolické nerovnováze a zkrácení života (Russel a Khan, 2007). U savců nacházíme několik receptorů pro inzulin/IGF-1, na rozdíl od mušky a háďátka, kde je jen jeden. Dlouhověkost myši může být způsobena, ať už náhodně či spontánně, mutací zasahující do biosyntézy nebo činnosti GH, IGF-1 nebo inzulinu. GH ovlivňuje sekreci IGH-1.

První pozorování dlouhověkosti způsobené pozměněním IIS dráhy u myši bylo u „Ames dwarf“ mutantů (nesou mutaci v PROP1 – transkripční faktor potřebný k vývoji hypofýzy). „Ames dwarf“ myši postrádají GH a mají sníženou hladinu cirkulujícího IGF-1. Vykazují delší průměrnou dobu života oproti divokému typu kontrol. Zároveň však postrádají prolaktin a hormony štítné žlázy (Brown – Borg a spol., 1996). „Snell dwarf“ myši nesoucí mutaci v PIT (další transkripční faktor nezbytný pro vývoj hypofýzy) mají podobný fenotyp jako „Ames dwarf“ mutantů. „Snell dwarf“ mutantů žijí déle oproti divokému typu (až o 45%) i po podání hormonů štítné žlázy a GH (Vergara a spol., 2004). Myši s odstraněným „GH-receptor/binding protein“(GHR/BP) nebo „GH releasing hormone receptor“ také vykazují nižší hladiny GH a IGF-1 a delší dobu života (Flurkey a spol., 2001).

Mutace v genech pro IGF receptor *Ig1r* (analogy receptorů InR u *Drosophila* a DAF - 2 *C.elegans*) v homozygotním uskupení *Ig1r*^{-/-} způsobují úhyn. Heterozygoti *Ig1r*^{+/-} žijí v průměru o 26% déle, než kontroly divokého typu. Heterozygotní samičky žijí o 33% déle, než kontroly, ale u heterozygotních sameček je nárůst délky života jen 16%. Dlouhověcí *Ig1r*^{+/-} mutantů nevykazují žádné změny ve srovnání s kontrolami v růstu, v pohlavní vyspělosti, plodnosti, metabolismu a jsou rezistentnější k oxidačnímu stresu (Holzenberger a spol., 2003).

Dalším faktorem prodlužující život myši je tukově specifické odstranění genu pro inzulinový receptor. Myši po zásahu normálně přijímají potravu, ale udržují se štíhlé a tolerantní na glukózu (Blüher a spol., 2003). Inzulin v tukových tkáních může ovlivnit stárnutí vlivem na hormony či regulaci metabolismu. U myši vede odstranění receptorů pro GH nebo odstranění GH k sekundárnímu potlačení IGF-1 a inzulinu, tím k prodloužení délky života (mediální i maximální) a zpomalení stárnutí. I přímé odstranění IGF 1 signalizace vede k prodloužení dlouhověkosti, nicméně účinnost je nižší než u GH nedostatečnosti. Navíc působí povětšinou jen na samičky (Bartke, 2011). Vyšší rezistence ke stresu je spojena s menší fosforylací stresem aktivovaných protein kináz (ERK 1 a 2) ovlivňujících expresi genů (Sun a spol., 2009).

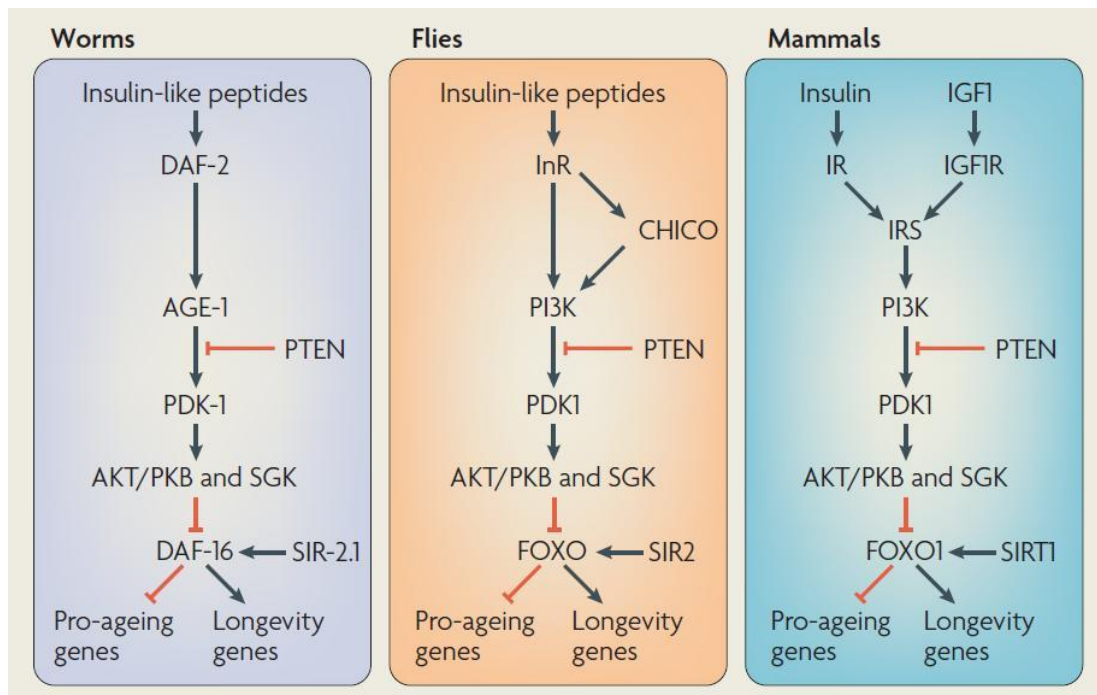
Inzulinová rezistence je na rozdíl od háďátka a octomilky prekurzorem pro s věkem spojované nemoci u jinak zdravých a ne obézních lidí (Facchini a spol., 2001). Omezený kalorický příjem („caloric restriction“ - CR) zvyšuje u hlodavců délku života a stejně působí i u primátů a pravděpodobně i u lidí (Kirwan a spol., 2001). CR u savců je spojováno s poklesem hodnot inzulinu a normální či sníženou hladinou glukózy, z čehož vyplývá pozitivní korelace mezi délkou života a citlivostí na inzulin (Masoro, 2005). Snížených hodnot inzulinu a tuku lze dosáhnout i bez CR, jak dokazuje další mutace pozitivně ovlivňující délku života u myši: „fat-specific insulin-receptor knockout“ (FIRKO). Myši s touto mutací mají podstatně rozdílný fenotyp ve srovnání s ostatními tkáňově specifickými mutacemi pro inzulinový receptor. Adipocyty FIRKO myši jsou rezistentní na inzulin, ale myši jsou štíhlé a ochráněné před s věkem spojovanou obezitou a metabolickými změnami, přestože je jejich kalorický příjem normální (Blüher a spol., 2003). Stále není jasné, jakým způsobem CR ovlivňuje délku života. CR může jednat přímo tím, že dojde ke zvýšení účinnosti metabolismu, zároveň ke snížení produkce volných radikálů či aktivaci histon deacetyláz a tím znemožnění genové transkripce (Lin a spol., 2002). Případně může CR jednat nepřímo. Signály z buněk o příjmu živin, např. přes leptin, adiponektin či resistin, mohou být shromažďovány v hypothalamu, který zpětně řídí příjem potravy a endokrinní signalizaci (Schwartz a spol., 2000). Dlouhodobé CR může navodit endokrinní řízení vedené k programu „údržby buněk“. V tomto případě by omezení inzulin/IGF-1 signalizace během CR bylo nezbytné (Tatar a spol., 2003).

Omezení syntézy hormonů štítné žlázy je dalším příkladem zásahu do řízení hypofýzy, které pozitivně ovlivňuje stárnutí myši (Ooka a spol., 1983). Hormony štítné žlázy působí na vývoj hlodavců řízením produkce GH. Navozená hypotyreóza u krys navozuje

sníženou produkci volných radikálů a zmenšení škod, způsobených volnými radikály (Lopez-Torres a spol., 2000). Receptor pro hormony štítné žlázy patří do rodiny jaderných receptorů zahrnujících DAF-12 *C.elegans* a EcR *D.melanogaster* (Chawla a spol., 2001).

V souvislosti s inzulínovou signální drahou a dlouhověkostí se spojují i proteiny Sirtuins a FoxO (u savců FOXO1, FOXO3, FOXO4 a FOXO6), které jsou homologní k DAF-16 a FOXO. Proteiny jsou regulovány AKT/PBK fosforylací a tedy IIS. Účinky FoxO závisí na tkáních, ale obecně jsou antagonistou inzulínu (Puijg a Tjian, 2005). A zpětně aktivita FoxO je negativně regulována inzulínem skrze AKT/PBT fosforylací, která způsobí translokaci z jádra do cytoplazmy. Není zatím známo, jak zvýšená hladina FoxO proteinů reguluje dlouhověkost. Sirtuiny byly prvně definovány u kvasinek, ve kterých zvýšená exprese Sir2 prodlužuje délku života. Zvýšená exprese Sir2 homologu SIR-2.1 u háďátka a SIR2 u octomilky působí stejně (Longo a Kennedy, 2006). U savců bylo nalezeno sedm sirtuinů (SIRT1-7), kdy SIR1 je nejbližším homologem Sir2. Metabolický efekt SIR1, podobně jako FOXO1, je protichůdný inzulínové signalizaci, převážně v játrech a tukové tkáni (Rodgers a spol., 2005).

Potencionálním mediátorem mezi tkáněmi by mohl být KLOTHO, transmembránový protein, podobný β -glykosidáze. *Klotho* je syntetizován převážně v mozku a ledvinách. Myši, které vykazují zvýšenou expresi *Klotho*, žijí déle než kontroly (samice o 19%, samci o 31%), což dokazuje, že gen má efekt na délku života (Kurosu a spol., 2005). Na fyziologické a molekulární úrovni způsobuje KLOTHO resistenci k inzulínu jak u samců, tak samic. Pravděpodobně se nejedná o soutěžení s inzulínem o navázání se na receptor. KLOTHO inhibuje autofosforylací inzulínu a IGF-1 receptoru, podobně jedná i v případě „downregulovaných“ signálů. Protein KLOTHO blokuje autofosforylací IGF-1 receptorů, jako odpověď na IGF-1 stimulaci a zpustí defosforylací dříve aktivovaného inzulínu a IGF-1 receptorů, což podporuje domněnku, že KLOTHO působí pozitivně na dlouhověkost, protože alespoň částečně inhibuje IIS (Russel a Kahn, 2007).



Obrázek 4 Inzulinové signální dráhy v regulaci stárnutí

Paralelní signální dráhy *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* a *Mus musculus* regulují aktivitu „forkhead box“ transkripčních faktorů (DAF-16, FOXO a FOXO1). Muška a hád'átko mají jeden receptor pro savčí homolog inzulinu a IGF-1 receptoru tyrozin kinázy (DAF2, resp. InR). Po navázání jednoho z ligandů „inzulin-like“ rodiny dojde k aktivaci tyrozinové kinázy a fosforylaci fosfatidylinositol 3-kinázy (PI3K). U mušek InR substrát (CHICO), který je analogem savčího inzulinového receptoru (IR) substrátových proteinů (IRS), usnadňuje interakci InR-PI3K. Fosforylovaný PI3K syntetizuje fosfatidylinositol -3,4,5- trifosfáty (PtdIns (3,4,5)P3) a PtdIns(3,4)P2, které následně aktivují PDK1. PDK1 aktivuje AKT/protein kinázu B (PKB) a „serum/glukokortikoid-regulated“ kinázu (SGK). Tyto kinázy zablokují FoxO transkripční aktivitu. Inhibice IIS nechá FoxO pozitivně regulovat expresi genů proti stárnutí a negativně genů přispívajících ke stárnutí. DAF-16 pozitivně reguluje expresi dalších genů (podle Russel a Khan, 2007)

Výsledky pokusů s octomilkami, hád'átkem a myšmi naznačuje, že role IIS (u savců IGF-I) v regulaci dlouhověkosti je evolučně konzervovaná (Obr.4) (Clansy a spol., 2001).

Role IIS ovšem není zcela jasná, protože ne všechny mutace v této signální dráze vedou k dlouhověkosti, některé, naopak, život zkracují. Může to být způsobeno tím, že ne všechny jednotky signální dráhy souvisí s řízením délky života, ale tvoří součást základních jednotek důležitých pro život.

1.3 Diapauza, metabolismus, oxidační stres a stárnutí

Spojitosť mezi metabolismem a délkou života objevil již v roce 1908 Max Rubner, který měřil metabolismus pěti domácích zvířat. Určil, že i přes rozdílné chronologické délky života mají všichni měření savci stejný výdej energie na gram. Myšlenku, že využití energie je klíčový determinant rychlosti stárnutí, rozvinul Pearl v roce 1928. Jeho hlavními návrhy bylo, že život je funkcí dvou proměnných veličin: 1) geneticky podmíněná konstituce jedince neboli „vitalita“ a 2) průměrná rychlost metabolismu během života. Druhá složka se

dá vyjádřit obecně tak, že délka života je nepřímou úměrou vydaného množství energie, která vešla do povědomí jako teorie pod názvem „Rate of living“ (ROL) (Pearl, 1928). Teorii ROL dále rozšířil Harman v roce 1956 na teorii volných radikálů.

Pokud bychom teorii ROL rozšířili o další proměnnou - reprodukci, dostáváme základní „trade-off“ mezi reprodukcí a údržbou buněk (Kirkwood, 1981). Při reprodukci jistě dochází ke zvýšení metabolismu, dochází k úbytkům zásob energie, zvýšené produkci ROS a zrychlení stárnutí. Naopak při reprodukční diapauze dochází k úsporám energie, nebo k jejímu využití na údržbu organismu, pravděpodobně je snížena i produkce ROS (Tatar a Yin, 2001).

Vztah mezi rychlostí metabolismu (na hmotnost) a dlouhověkostí napříč zvířecí říší ukazuje, že malí živočichové mají vyšší rychlost metabolismu a kratší dobu života než větší živočichové. Jednoduché vysvětlení tohoto jevu je takové, že při vyšším metabolismu vzniká více ROS (Voorhies, 2001). Práce na poikilotermních živočiších, kterým byla prodloužena délka života (snížením teploty, inaktivací enzymů, snížením fyzické aktivity), ukázala na zmenšení metabolismu a s ním spojenou sníženou produkci ROS (Sohal, 2002). Potvrzovala tedy teorii „rate of living“. Experimenty na savcích nepotvrdily, že faktory zvyšující rychlost metabolismu vedou k následnému snížení délky života (Holloszy a spol., 1985). Možným důvodem je to, že metabolické manipulace se savci jsou omezené, vzhledem k jejich stále a poměrně vysoké míře metabolismu (Voorhies, 2001). Nicméně i u některých druhů savců existuje příklad prodloužení délky života. Jedním z nich je křeček, jehož délka života může být prodloužena navozením hibernace (Lyman a spol., 1981).

Další důkazy potvrzující teorii volných radikálů jsou založeny na biochemii aerobní respirace, oxidační fosforylace a ze studií, kde zvýšený obsah antioxidantů zvyšoval délku života. Jako příklad můžeme uvést zvýšení exprese superoxid dismutázy u *Drosophila* (Sun a Tower, 1999) a *C. elegans* (Melov a spol., 2000). Dlouhověkost u hád'átka s formací dauer a dlouhověkých mutantů je často spojována se zvýšenou resistencí ke stresu. Nicméně zvýšený obsah antioxidantů může mít menší vliv na dlouhověkost, než snížená rychlost karbonylace proteinů (Sohal, 1993). Situaci dále komplikují hlodavci rypoši lysí, kteří vykazují vysokou dlouhověkost ve srovnání se stejně velkými myšmi. Pokusy na rypoších ukázaly, že nemají signifikantně zvýšené množství antioxidantů, ale zároveň mají průkazně vyšší množství oxidačně poškozených makromolekul, jak DNA, tak proteinů. U rypošů vyvstává hypotéza, že existuje jiný mechanismus, vedoucí k dlouhověkosti, než snížený oxidační stres (Andziak a spol., 2006).

Diapauza je programované pozastavení vývoje spojené s fyziologickými změnami, které pomáhají živočichovi přečkat nepříznivá období. Vstup do diapauzy může nastat v libovolné fázi vývoje (vajíčko, larva, kukla, dospělec), buď v jedné, nebo v několika, což záleží na druhu (Tatar a Yin, 2001). U dospělců se vyskytuje tzv. reprodukční diapauza, která umožní jedinci únik v čase, vyžaduje somatickou údržbu a vede k pozastavení stárnutí (Danks, 1987).

Reprodukční diapauza se dá charakterizovat: 1) sníženým metabolismem, 2) pozastavením oogeneze, páření a produkce vajíček, 3) zvýšením rezistence ke stresu, 4) zvýšenou délkou života (Tu a spol., 2005). Octomilka prochází reprodukční diapauzou, při které se zvýší rezistence ke stresu a zpomaluje proces stárnutí. Věkově specifická rychlost stárnutí postdiapauzních jedinců je stejná jako u mladých. Naopak, reprodukce u postdiapauzních jedinců klesá s dobou strávenou v diapauze, kde může docházet k „trade-off“ mezi údržbou somatických buněk a reprodukcí (Tatar a spol., 2001). Na druhou stranu, ani snížený metabolismus nemusí hrát roli v dlouhověkosti, protože u mutantů receptoru inzulin/IGF-1 nacházíme normální rychlost metabolismu (Tatar a spol., 2001). Dále u několika druhů *Drosophila*, které se liší v délce života, neexistuje jasná korelace mezi délkou života a rychlostí metabolismu (Hulbert a spol., 2004).

Víme, že IIS mutace prodlužují délku života u háďátka i octomilky, což často souvisí se zvýšenou rezistencí ke stresu, jak bylo prokázáno v několika studiích. Například, zásah do IIS dáhy u *Drosophila*, kdy dojde ke zvýšení exprese dFOXO, způsobí vyšší rezistenci k paraquat (Hwangbo a spol., 2004). Podobně u dlouhověkých mutantů v InR nebo po odnětí neurosekrečních buněk produkujících ILP došlo ke zvýšení rezistence k oxidačnímu stresu (Tatar a spol., 2001b, Broughton a spol., 2005). IIS mutanti vykazují i nižší titry v hladině JH a 20E, je možné, že JH a 20E negativně ovlivňují stresovou odpověď u octomilek (Tu a spol., 2006). Aplikace analogu JH, methoprenu, zvýšila reprodukci, ale snížila délku života a rezistenci k oxidačnímu stresu (Salmon a spol., 2001). Zdá se tedy, že vysoká hladina JH a 20E zvyšuje reprodukci na úkor délky života a rezistenci ke stresu (Tu a spol., 2006).

Výše uvedená hypotéza neplatí všeobecně, protože například včelí královny (*Apis mellifera*) vykazují mnohem delší dobu života než dělnice a přitom jsou reprodukčně aktivní a dělnice nikoliv. Zároveň jsou královny resistantnější k oxidačnímu stresu než dělnice. U královen byla zjištěna mnohem větší exprese vitelogeninu, žlutkového proteinu syntetizovanému v tukovém tělese, než u dělnic. JH ovlivňuje expresi vitelogeninu a IIS

dráhu v opačném trendu. Existuje hypotéza, že vitellogenin hraje úlohu antioxidantu, který zvyšuje délku života u včel, protože královny postrádají geny pro intracelulární antioxidanty (Corona a spol., 2007). U octomilky bylo zjištěno, že *chico* (homolog savčího inzulin receptor substrátu) mutanti sice žijí déle, ale nejsou rezistentnější k paraquatů než kontroly. Což by znamenalo, že dlouhověkost nemusí být vůbec spojena se zvýšeným obsahem antioxidantů (Clancy a spol., 2001).

1.4 Pohybová aktivita a stárnutí

Reprodukční diapauza je charakterizována mimo jiné i změnou buněčného metabolismu a pozměněným chováním u obou pohlaví. Avšak diapauzní dospělci některých druhů přijímají potravu a jsou aktivní (Pener, 1992).

Motýli monarchové v reprodukční diapauze cestují 2000 km na přezimování do Nového Mexika. Doba přežívání je u nich až 6x vyšší než u reprodukčně aktivního letního typu (Herman, 1985). Z čehož se dá usoudit, že pohybová aktivita neomezila negativně dobu života.

U kobylek je situace podobná. Alatektomovaní samci žijí dvakrát déle, než jejich neoperované resp. "sham operated" kontroly. Je možné, že alatektomie navozuje nižší spotřebu kyslíku (Joly, 1968), ale v pokusu, ve kterém byli alatektomovaní samci (stimulovaní k letu a v klidu) porovnáváni s kontrolami (stimulovaní k letu a v klidu), žili létající alatektomovaní samci podobně dlouho jako nelétající a o 100% déle, nežli obě skupiny kontrol (Pener, 1972). Zdá se tedy, že pohyb sám o sobě nemá vliv na délku života u alatektomovaných samců rovnokřídlých.

U mouchy *Musca domestica* vede zamezení létání k prodloužení délky života až trojnásobně na rozdíl od much s umožněným létáním. Zajímavé je, že průměrná spotřeba kyslíku byla u průměrné délky života much s normální pohybovou aktivitou stejná jako u těch, které nemohly létat. Délka života je podle těchto výsledků spíše funkcí rychlosti spotřeby energie či kyslíku, než průběhu času. Produkce peroxidu mitochondriemi byla u aktivních much vyšší po celou dobu života, což by potvrzovalo škodlivý vliv ROS (Yan a Sohal, 2000). Podobné výsledky získáváme u octomilek s umožněným létáním, kde se délka života oproti kontrolám snížila. Hladina ROS u mušek s vysokou aktivitou se však příliš nelišila oproti muškám kontrolním (Magwere a spol., 2006).

Zjistilo se, že oxidace proteinů je vysoce selektivním procesem. Jediné oxidované proteiny, v mitochondriích z létacích svalů much, byly dva enzymy: akotináza a adenin nukleotid translokáza (Yan a spol., 1997).

Aspekt ovlivňující stárnutí může být i rytmicita pohybové aktivity. Existují studie, kde působení oxidačního stresu na octomilky přispívá ke změnám v rytmech a spánku podobných při stárnutí (Koh a spol., 2006).

1.5 *Pyrrhocoris apterus*

Ploštici *Pyrrhocoris apterus* můžeme považovat za vhodný modelový organismus pro experimenty zaměřené na stárnutí, protože dokážeme pozitivně ovlivňovat délku života buďto fotoperiodou nebo chirurgickým zásahem do endokrinního systému (Hodková 2008), aniž by došlo ke změně genotypu či larválního vývoje. Navíc ploštice prochází poměrně silnou reprodukční diapauzou, při které je snížena rychlost metabolismu a zvýšena schopnost čelit nepříznivým podmínkám. Krátká fotoperioda („short day“ – SD) navozuje reprodukční diapauzu i při dosti vysokých teplotách a prodlužuje délku života. Ploštice držené v dlouhém dnu („long day“ – LD) jsou reprodukčně aktivní a žijí kratší dobu než diapauzní jedinci. Efekt fotoperiody je zprostředkován skrze corpus allatum (CA), endokrinní žlázu produkující juvenilní hormon (JH). Odnětí CA (alatektomie) prodlužuje život reprodukčně aktivních ploštic, ale ne tolik jako diapauza (Hodková 2008, Blažková a spol., 2011).

Vliv fotoperiody na reprodukci samic je zprostředkován PI – CA signalizací (Hodková, 1976; Hodková a spol., 2001). PI zprostředkovává stimulaci reprodukce u LD a naopak inhibici reprodukce u SD (Hodková, 1976). U reprodukčně aktivních ploštic je stimulace vedena od PI skrze CA a dalšími drahami, kde PI pravděpodobně stimuluje růst a sekreci CA u nediapauzních samic ploštice (Hodková a spol., 2001). Pokud vystavíme ploštice bez PI analogu JH, dosáhneme dozrání oocytů v prvním reprodukčním cyklu, ale nedojde k navýšení celkové plodnosti na normální úroveň. U diapauzních ploštic je CA inhibováno skrze PI, čímž je zamezeno vitelogenezi. Po odnětí PI vymizí jak inhibiční, tak indukční signály, což vede k nízké plodnosti u obou fotoperiod (Hodková, 1976). Reprodukce může být zastavena kompletně odstraněním CA (Sláma, 1964b).

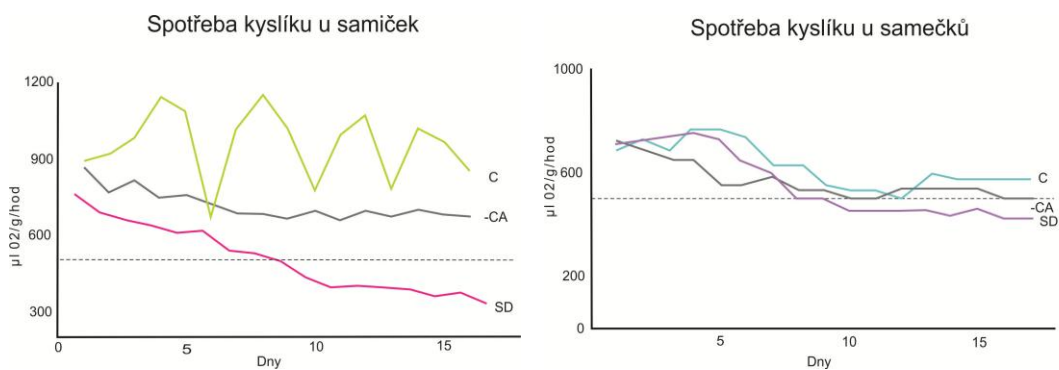
Odnětí PI v LD vede k prodloužení života, ale u SD k jeho zkrácení, což naznačuje, že PI má pozitivní i negativní vliv na dlouhověkost v závislosti na fotoperiodě (Hodková, 2008). PI a CA působí na délku života aditivním způsobem, protože současné odnětí PI-CA zvýší délku života až o 96%, kdežto samotné odnětí PI prodlužuje život o 32% u samic a odnětí CA o 60% (Hodková, 2008). Délka života a reprodukce jsou řízeny signalizací z PI a CA, ale - na rozdíl od všeobecně přijímaného názoru - produkce vajíček a signalizace z gonád nesnižují délku života samic ploštice. Dráhy ovlivňující délku života a reprodukci u samic ploštice jsou alespoň částečně rozdílné. Pakliže by CA signalizace měla ovlivňovat

dlouhověkost skrze reprodukci, musela by působit jinými cestami než přes ovária (Hodková, 2008).

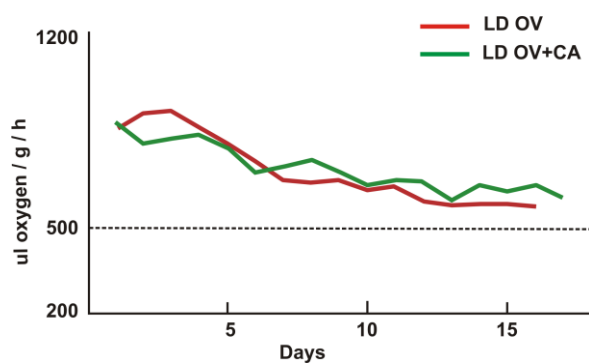
Stejně jako u jiných druhů hmyzu řídí JH syntézu žloutkových proteinů v tukovém tělese a jejich ukládání do vyvíjejících se vajíček (Wyatt, 1997). Alatektomie u samiček ploštice zamezuje syntéze i využití žloutkového proteinu. Kastrace vede pouze k zabránění příjmu žloutkového proteinu (Socha a spol., 1991). Navíc tukové těleso hypertrofuje u alatektomovaných i kastrovaných samiček a liší se i zásobní látky. Alatektomované samičky ukládají více glykogen než lipidy a kastrované samičky opačně (Němec, 1981).

Zdá se, že ani metabolismus nemá vliv na dlouhověkost, protože klidový metabolismus určený spotřebou kyslíku je stejný u reprodukčně aktivních, alatektomovaných i diapauzních samců *P. apterus* (Sláma 1964a). A to přesto, že alatektomovaní samečci žijí mnohem déle než reprodukčně aktivní (Blažková a spol., 2011). U reprodukčně aktivních samiček je klidový metabolismus vyšší oproti diapauzním a alatektomovaným samičkám (Sláma, 1964b), nepřímo úměrně s délkou života. Odnětí ovárií sníží spotřebu kyslíku na úroveň alatektomovaných samiček (Sláma, 1964b), ale tato operace neprodluží délku života (Hodková, 2008). Existují však pochybnosti, zda je klidový metabolismus správným ukazatelem spotřeby energie (Speakman, 2005). Pokusy využívající k měření dlouhověkosti aktivní metabolismus korespondují s tímto pohledem.

Ploštice *P. apterus* je nelétající hmyz, ale vykazuje běhací aktivitu, která se dá lehce měřit. *P. apterus* patří do skupiny hmyzu s polymorfizmem křídel, kdy ale ani jedna z forem (brachypterní a makropterní) nelétá (Socha a Zemek, 2000). Respirace diapauzního hmyzu hodně záleží na množství aktivní svalové hmoty. Respirace izolovaných létacích svalů z dospělého švába se po alatektomii zvýšila (Samuels, 1956). Ale u ploštice *P. apterus* zůstává klidová spotřeba kyslíku stejná i po odnětí CA či v diapauze (Sláma, 1965). Proto by hrudní svaly ploštice mohly být dobrým ukazatelem oxidačního poškození v důsledku pohybové aktivity.



Obrázek 5. Spotřeba kyslíku u samiček a samečků v různých fotoperiodách a po odnětí CA (podle Sláma 1964a,b)
 C- kontroly v dlouhém dnu (reprodukčně aktivní), SD – diapauzní jedinci v krátkém dnu, -CA – jedinci v dlouhém dnu po odnětí CA



Obrázek 6. Spotřeba kyslíku u samiček po odnětí ovárií či odnětí jak corpora allata, tak ovarii (podle Sláma 1964b).
 LD – dlouhý den, OV – odnětí ovárií, OV+CA odnětí ovárií a corpora allata

2 CÍLE PRÁCE

V diplomové práci se zabývám vztahem mezi stárnutím a oxidačním stresem (indikovaným karbonylovanými proteiny hrudních svalů) pod vlivem různých fotoperiod a endokrinního řízení žlázy corpora allata u modelového organismu ploštice *Pyrrhocoris apterus*.

Dalším zkoumaným aspektem byl vztah mezi délkou života a pohybovou aktivitou ploštice.

2.1 Vliv fotoperiody a corpora allata na délku života

- Ověření již dříve publikovaných výsledků o délce života *P.apterus* v proreprodukčním dlouhém dnu , diapauzu indukujícím krátkém dnu a po odnětí endokrinní žlázy corpora allata, zdroje juvenilního hormonu.

Hypotéza:

Diapauza by měla pozitivně ovlivňovat délku života, stejně by mělo působit i odstranění corpora allata (inhibice IIS dráhy) a naopak negativně by na délku života měla působit reprodukce („trade-off“ mezi údržbou a reprodukcí).

2.2 Vztah mezi délkou života a množstvím karbonylovaných proteinů (indikátoru oxidačního poškození) v hrudních svalech

- Vliv různě dlouhověkých fenotypů na množství karbonylovaných proteinů

Hypotéza:

- S věkem by měla narůstat akumulace oxidačně poškozených proteinů
- Dlouhověké fenotypy by měly mít snížený obsah karbonylovaných proteinů oproti krátkověkým fenotypům

2.3 Vztah mezi pohybovou aktivitou a délkou života

- Zjistit, zda má pohybová aktivita vliv na délku života
- Zjistit, zda pravidelnost pohybových rytmů ovlivňuje délku života

Hypotéza:

- Pokud pohybová aktivita zkracuje život, měly by dlouhověké fenotypy (diapauza, alatektomie) souviset se snížením intenzity pohybové aktivity

- Pakliže pravidelnost (síla) rytmů pozitivně ovlivňuje dlouhověkost, měly bychom při stejné pohybové intenzitě nalézt silnější rytmy u dlouhověkých fenotypů

2.4 Vztah mezi pohybovou aktivitou a obsahem karbonylovaných proteinů v hrudních svalech

- Zjistit, zda má vyšší intenzita pohybové aktivity vliv na množství karbonylovaných proteinů v hrudních svalech ploštice

Hypotéza:

- Vyšší pohybová aktivita by měla způsobit nárůst v produkci ROS a tím zvětšit oxidační poškození proteinů v hrudních svalech ploštice. Pokud pohybová aktivita zkracuje život prostřednictvím oxidačního poškození proteinů, mělo by prodloužení délky života alatektomií či diapauzou vést k současnému snížení jak pohybové aktivity, tak ke snížení množství karbonylovaných proteinů

3 METODIKA

3.1 Modelový organismus

Modelovým organismem pro diplomovou práci byla ploštice ruměnice pospolná, *Pyrrhocoris apterus* (L.). Jedná se o hojně rozšířený palearktický heteropterní druh ploštice, vyznačující se polymorfismem křídel (brachypterní a makropterní). V dnešní době si na výzkumných pracovištích získává stále větší oblibu pro svůj snadný chov a možnosti fyziologických zákroků bez využití genové manipulace, ale přímými chirurgickými zásahy. Ploštice se začala pro výzkum využívat při objevu juvenilního hormonu v 60. letech 20. století. Ploštice prochází reprodukční diapauzou. Chov ploštic použitých k pokusům pochází z Chelčic nebo Oldřichovce. Ploštice byly chovány v termostatech s konstantní teplotou 26 ± 1°C. Ploštice byly drženy ve sklenicích uzavřených průdušným silonem, na lipových semínkách ad libidum a vodě. Podle fotoperiody se rozlišují dvě skupiny ploštic. Fotoperioda dlouhého dne (=long day, LD), 18 hodin světla a 6 hodin tmy, navozuje proti-diapauzní (pro reprodukční) chování a fotoperioda krátkého dne (=short day, SD), 12 hodin světla a 12 hodin tmy, indukuje diapauzu.

Doba larválního vývoje trvala přibližně jeden měsíc. Průměrná váha imag v režimu SD je u samic 61,1 mg a u samců 56,4 mg. V režimu LD se váha samic mění podle reprodukčního cyklu, průměrná váha je 58,4 mg a u samců 41,6 mg.

Extirpace corpus alatum probíhala po narkotizaci ve vodě (po dobu cca 15 min.) skrze krční membránu. Operace byla vykonávána ve fyziologickém roztoku Ringer.

Oxidační stres byl navozován neselektivním herbicidem paraquat (N, N'-dimethyl - 4,4'-bipyrimidinium dichlorid). Paraquat byl injikován Hemiltonovou jehlou do postranní části hrudníku (pod křídlo) v objemu 0,2 ul různého ředění.

3.2 Příprava vzorků

Desekce thoraxů bez použití pufru, okamžité zamrazení na suchém ledu, skladování při -80°C. Vzorek obsahuje 10 thoraxů zbavených tuku a střeva. Homogenizace probíhá skleněným homogenizátorem v pufru (1000 µl K-PO₄ pufru pro spektrofotometrické metody nebo v 600 µl Tris-EDTA pufru pH 7,3 pro western).

Další homogenizace je sonikátorem 2x 10 sec. při 20-90 Mhz. K vzorku se přidává 10% streptomycin pro vysrážení nukleových kyselin ze vzorku, se kterým se vzorek nechává při pokojové teplotě 15 min. inkubovat. Následuje sonikace 10 sec. při 20-90 Mhz. Vzorky se

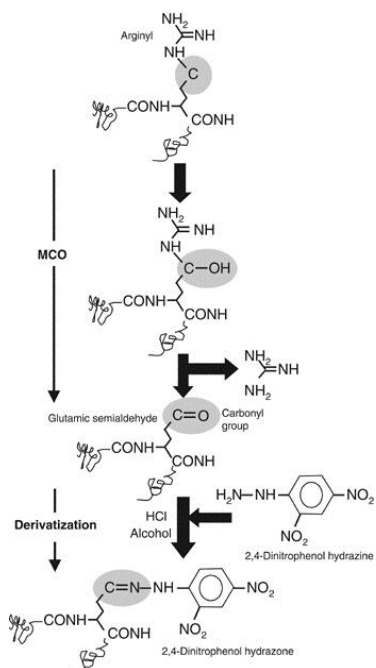
stočí při 3000g/10min/4°C a odebere se supernatant (cca 500 µl). Dále je postup pro každou metodu odlišný a bude popsán u jednotlivých metod.

3.3 Metodika stanovení karbonylovaných proteinů

Existuje několik způsobů, kterými lze měřit proteinové karbonyly. Citlivou metodou se ukázala být reakce karbonylové skupiny proteinu s 2,4 dinitrohydrofenylhydrazinem (DNPH), což vede ke vzniku stabilního dinitrofenylhydrazonu (DNP), který může být detekován několika různými způsoby (spektrofotometricky, Western blot, ELISA). Metoda byla zavedena Levinem v roce 1990. Při měření svých vzorků jsem používala především spektrofotometrický postup detekce, ale zkoušela jsem i detekci pomocí Western blotu.

3.3.1 Spektrofotometrická detekce

Při reakci karbonylované skupiny s DNPH vzniká DNP (Obt.7), který sám o sobě pohlcuje ultrafialové světlo. Tím dává možnost detekce spektrofotometrickým způsobem. Nevýhodou této metody je, že můžete detekovat pouze celkové množství proteinových karbonylů z tkáně či hemolymfy.



Obrázek 7. Kovem katalyzovaná oxidace peptidické vazby argininu za vzniku semialdehydu kys.glutamové a jeho následná derivatizace s DNPH (podle Nyström, 2005).

Reagencie

- 1) Pufir 50mM K-PO₄ s 1mM EDTA
 - 340 mg monobasické KH₂PO₄/100ml H₂O
 - 871 mg dibasické KH₂PO₄/100mlH₂O

- přidáváme monobasický roztok k dibasickému dokud nedosáhneme pH 7.0; na závěr přidáme 41,6 mg EDTA (tetrasodium)/100 ml roztoku

- 2) 7mM DNPH v 2M HCl
- 3) 6M guanidine hydrochlorid (ve vodě)
- 4) 28% a 5% TCA

Postup

Vzorek připravíme homogenizací v 1000 µl pufru K-PO₄ (doporučená koncentrace pro proteinový vzorek je 1-10 mg/ml) a následnou sonikací 2x10 sec (20-90Mhz). Přidáme 100 µl 10% streptomycin sulfátu - > vortex – 15 min inkubace v RT (při pokojové teplotě – RT). Opět vzorek sonikujeme 1x10 sec (20-90Mhz). Dále jej centrifugujeme při 3000g/10 min/ 4°C. Část vzorku odebereme na určení množství proteinů metou BCA (viz. níže). Dále odebereme 200 µl vzorku do dvou 2ml zkumavek typu ependorf, jedna bude kontrolou a druhá vzorkem. Přidáme 800 µl DNPH do vzorků a 800 µl 2M HCl ke kontrolám. Inkubujeme vzorky ve tmě po dobu 1 hodina v RT za občasného promíchání vortexem. Po inkubaci přidáme do každé zkumavky 1 ml 28% TCA a inkubujeme na ledu 5 min. Následuje centrifugace 10000g/10min/4°C. Po centrifugaci odsraníme supernatant, resuspendujeme pelet v 5% TCA a necháme inkubovat na ledu 5 min. Centrifugujeme 10000g/10min/4°C. Odsraníme supernatant, resuspendujeme pelet v 1 ml směsi ethanol/ethyl acetátu (1:1), inkubujeme na ledu 5 min., sonikujeme 10 sec., opět centrifugujeme 12000g/10min/4°C (krok s etaholem zopakujeme 2x). Odstraníme supernatant a necháme vypařit zbytek ethanol/ethyl acetátu. Pelet rozpustíme v 500 µl 6mM guanidin hydroxychloridu (sonikace 10 sec.). Následuje centrifugace 3000G/5min/4°C. Po centrifugaci přeneseme 200 µl (2x) od kontrol i vzorků na mikrotitrační destičku. Absorbanci měříme při 370 nm na přístroji Synergy 4 (Biotek).

Vypočteme průměrné absorbance u kontrol i vzorků. Od průměrných hodnot kontrol odečteme průměrné hodnoty vzorků, čímž získáme vlastní absorbanci (tzv. corrected absorbance - CA). Koncentraci karbonylů vypočteme vložení hodnoty CA do vzorce:

proteinové karbonyly (nmol/ml) = $[(CA)/(0,011 \mu\text{M}/\text{cm})]*(500\mu\text{l}/200\mu\text{l})$.

*tato hodnota je přepočtem k danému roztoku z koeficientu DNPH při 370 nm a 22000 M-1 Cm-1.

3.4 Metoda BCA

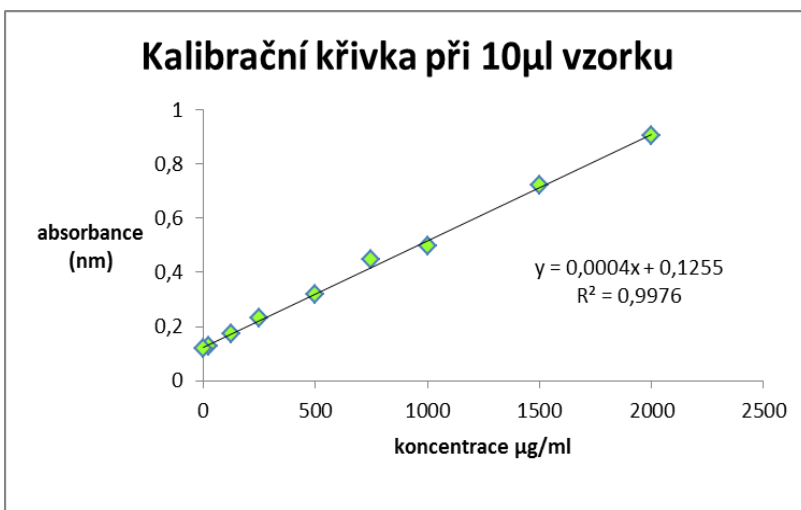
Metoda BCA (pojmenované podle kyseliny bicinchoniové) se využívá ke zjištění koncentrace proteinů ve vzorku, známa od roku 1985. Jedná se o metodu velmi citlivou 0,5 mg/ml, kde její citlivost není ovlivněna složením aminokyselin proteinu.

Metoda je založena na reakci přeměny Cu(II+) na Cu(I+) proteinem v alkalickém prostředí (biuretická reakce). Kdy se Cu (II+) naváže na peptidickou vazbu a uvolní Cu(I+) , tyto Cu(I+) ionty jsou komplexovány právě bicinchoniovou kyselinou v poměru 2 BCA: 1 Cu(I+) . Zbarvení reakce je způsobeno chelatačními vlastnostmi komplexu. Tento ve vodě rozpustný komplex vykazuje silnou absorbanci při 562 nm. Na barevné reakci se podílí jak množství peptidických vazeb, makromolekulární struktura, tak i aminokyselinové (AK) složení (především přítomnost 4 AK: cysteinu, cystinu, tryptofanu a tyrozinu).

Proteinová koncentrace je stanovena vzhledem ke standardu běžných proteinů, zde bovinímu séru albuminu (BSA). Před vlastním měřením si připravíme známou koncentrační řadu roztoků albuminu v pufru K-PO_4 . Z naměřených absorbcí určíme rovnici kalibrační křivky pro přepočítání hodnot absorbance neznámého vzorku.

Postup (dle Pierce BCA Protein Assay Kit)

Připravíme pracovní roztok (WR) smícháním reagensů A a B v poměru 1: 50, A (uhlíčan sodný, hydrogenuhličitan sodný, kyselinu bicinchoniovou a vinan sodný v 0,1M hydroxydu sodném), B (4% síran měďnatý). Dále připravíme albuminový standard z ampulky (BSA 2mg/ml v 0,9% fyziologickém roztoku a 0,05% azidu sodném) ředěný v pufru K-PO_4 . Od každého vzorku a standardu nanášíme $3 \times 10 \mu\text{l}$ na mikrotitrační destičku a přidáváme $200 \mu\text{l}$ WR. Inkubujeme 2 hodiny při pokojové teplotě. Zbarvení měříme na spektrofotometru Spectra Max 340 PC (Port East) při vlnové délce 562 nm. Ze standardů vytvoříme kalibrační křivku (poměr vzorku: WR je 1:20 \Rightarrow rozsah citlivosti 125 – 2000 $\mu\text{g/ml}$).



Rovnice:

$$y = 0,0004x + 0,1255$$

=>

$$x = (y - 0,1255) / 0,0004$$

3.5 Jednorozměrná elektroforéza a Western blot

Provedení metody se může lišit v načasování derivatizace s DNPH. Proteiny mohou být derivatizovány s DNPH již před elektroforézou nebo až po přenesení na membránu. Převážně starší metody využívaly derivatizace před elektroforézou, kdy může dojít k ovlivnění mobility proteinu, čemuž se vyvarujeme derivatizací až po přenesení proteinů na membránu.

Základ je ale u obou způsobů stejný. Proteiny se prvně rozdělí podle velikosti SDS PAGE elektroforézou a přebíhají se na membránu. Zviditelnění probíhá díky protilátkám proti DNP.

Při některých pokusech jsem zkoušela zároveň a Westernem měřit i množství proteinů metodou BCA a množství proteinových karbonylů spektrofotometrickou metodou.

3.5.1 SDS-PAGE Elektroforéza

Reagencie

1) separační gel - spodní

Pufr A (0,1% SDS; 0,375 M/l Tris-HCl pH 8,8)

- 22,75 g Tris, pH upravíme koncentrovanou HCl na 8,8)
- přidáme 5 ml 10% SDS ve vodě
- doplníme vodou na 500 ml

Polymerační roztok A (30% akrylamid, 0,8% BIS v pufru A)

- 30 g akrylamidu s 0,8 g BIS/ 100 ml v pufru A

2) Velkopórový gel – spodní

Pufr B (0,1% SDS, 0,125 M/l Tris-HCl pH 6,8)

- 5,25 g Tris, pH upravíme koncentrovanou HCl na 6,8
- přidáme 3,5 ml 10% SDS ve vodě

- doplníme vodou na 350 ml
 - přidáme bromfenolovou modř
- Polymerační roztok B (30% akrylamid, 0,8% BIS v pufru B)
- 30 g akrylamidu s 0,8 g BIS/ 100 ml v pufru B
- 3) Elektroodový pufr (0,1% SDS, 0,192 M/l glycin, 0,025 M/l Tris pH 8,3)
- 72 g glycin
 - 15,1 g Tris
 - 5 g SDS
 - koncentrovaným roztokem Tris upravíme pH přesně n 8,3
 - doplníme vodou na 1000ml
- 4) Vzorkový pufr (2% SDS, 10% glycerol, 0,063 M/l Tris-HCl pH 6,8, 0,003% bromfenolová modř; pokud se jedná o redukující vzorkový pufr, přidáme 5% 2-merkaptoethanol)
- 25 ml pufr B
 - 5 ml glycerol
 - 10 ml 10% SDS ve vodě
 - 1,5 g bromfenolová modř
 - 2,5 ml 2-merkaptoethanolu
- 5) Vzorkový pufr redukující koncentrovaný 4x
- 1,514g Tris-HCl pH 6,8
 - 4 g SDS
 - 20 ml glycerol
 - 10 ml 2-merkaptoethanolu
 - 2mg bromfenolová modř
 - doplnit vodou na 50 ml
- 6) Barvicí lázeň (0,25% Coomassie brilliant blue R-250, 50% ethanol, 10% kys. octová)
- 1,25 g barviva rozpustíme ve 230 ml ethanolu, zfiltrujeme
 - 46 ml koncentrované kys. octové
 - doplnit vodou na 500 ml
- 7) Odbarvovací lázeň (ethanol : kys. octová : voda – 25 : 10 : 65) 1000 ml
- 250 ml ethanol
 - 200 ml kys. octová

3.5.2 Western Blot

Reagencie

(Protein Carbonyls Western Blot Detection Kit, Cosmo Bio Co, Ltd.)

- 1) Primární protilátka: Rabbit anti-DNPH (10mM Tris-pH 7,6; 0,14 M NaCl)
králičí polyklonální protilátka proti 2,4 dinitrofenylu IgG (očistěné IgG frakce)
- 2) Sekundární protilátka: Goat anti-Rabbit (Thermo Scientific)
- 3) Roztok DNPH (10x2,4-Dinitrofenylhydrazin)

- 4) Oxidovaný protein (oxidované BSA v SDS-PAGE pufru - 2% SDS, 5% 2merkптоethanol, 10% glycerol, 0,05% brofenolová modř, 62,6 mM Tris-HCl - pH 6,8)
- 5) TBS (10mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,14M NaCl)
- 6) TBST (10mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,14M NaCl, 0,1% Tween 20)
- 7) Chemoluminiscence (SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate – Pierce)

Postup

(od kroku 6. dle Protein Carbonyls Western Blot Detection Kit, Cosmo Bio Co, Ltd.)

Připravíme gely: separační 10% (6ml pufr A, 3 ml polymerační pufr A, 7,5 µl TEMED, persíran - špetka) a horní gel 3% (3,375 ml pufr B, 0,0375 polymeračního roztoku B, 3,75 µl TEMED, persíran). Dále připravíme vzorky: homogenizace vzorku v 600 µl pufru Tris-EDTA pH 7,3 a sonikace vzorku 2x10 sec (20-90Mhz). K vzorku přidáme 60 µl 10% streptomycin sulfátu - > vortex – 15 min inkubace v RT (při pokojové teplotě – RT) a sonikace vzorku 1x10 sec (20-90Mhz). Dále vzorek centrifugujeme při 3000g/10 min/ 4°C. Po centrifugaci odebereme supernatant cca 500 µl (100 µl na western blot(W) a 400 µl na spektrofotometrickou metodu (S) Vzorky naředíme: W: 34 µl vzorkovým pufrům koncentrovaným 4x (nejnižší koncentrace a další ředíme na stejnou koncentraci), S: 200 µl K-PO₄ pufrům. W vzorek povaříme 10 min., centrifugujeme 10 min/3000g/4°C. S vzorek dále podle spektrofotometrické metody. DNPH deprivatizace: ponoření PVDF membrány na 1 min do 100 % methanolu; promytí membrány v 20 % methanolu – 80 % TBS 5 min.; promytí v 2M HCl 5 min.; inkubace membrány v 1xDNPH roztoku na 5 min.; promytí membrány v 2MHCl 3x 5 min.; promytí membrány 100 % methanolem 7x 5 min.; promytí membrány v TBS 5 min. Imunoreakce: blokování v nízkotučném kozím mléce 5% /TBST 1hod v RT za stálého míchání; inkubace s primární protilátkou ředěnou 1:2000 (5 µl) v 10ml 5% nízkotučného kozího mléka/TBST přes noc ve 4°C; promytí membrány 3x 5 min v TBST; inkubace se sekundární protilátkou ředěnou 1:1000 (5 µl) v 10 ml 5% nízkotučného kozího mléka/ TBST 1 hod v RT; promytí membrány 3x 5 min v TBST. Detekce: příprava chemoluminiscenčních roztoků; inkubace s membránou 5 min.; přenesení na folii; detekce CCD kamerou, programem Las 3000 a Image Quant 5.2.

3.6 Měření pohybové aktivity

Při měření pohybové aktivity jsou ploštice drženy samostatně v Petriho miskách. Monitorování probíhalo při konstantní teplotě 26±1°C. Semínka a pitíko jsou připevněny, tak aby nezasahovali do laserového parsku, který miskou horizontálně prochází a zaznamenává

počet přeběhů za 12 min (nastavitelná hodnota). Počítač zaznamenává hodnoty v binech, kdy 1 bin = počet přeběhů/12 min.

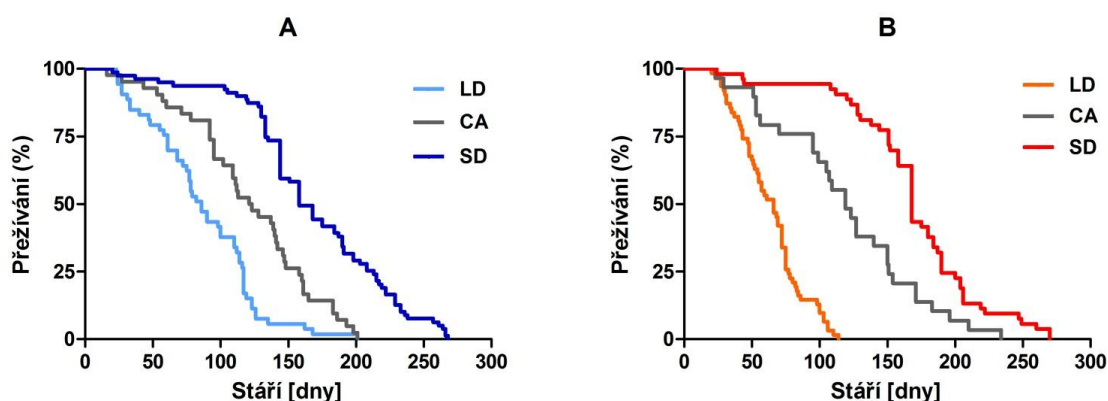
3.7 Statistické hodnocení

Statistické hodnocení bylo prováděno programy GraphPad Prism a Bioclock. V grafech je vyobrazen průměr a SEM. Rozdíly mezi průměrnými hodnotami byly prováděny pomocí jednocestné ANOVA a Tukey Post-testem. Přežívání bylo hodnoceno a porovnáváno Long rang testem. Síla rytmu (Qp) vypočtená v programu Bioclock byla hodnocena pomocí chi-square periodogram analýzy (Refinetti, 2000). Intenzita pohybové aktivity byla vypočítána jako aritmetický průměr všech hodnot (mezorů).

4 VÝSLEDKY

4.1 Vliv diapauzy a corpus allatum na délku života

Z úvodu je patrné, že diapauza a nepřítomnost JH pozitivně ovlivňují dlouhověkost. Skutečnost, že tato fakta platí i u plošnice *Pyrrhocoris apterus*, byla zjištěna už dříve. Následující pokus ověřil a porovnal délku života u reprodukčně aktivních ploštic, diapauzních a po odnětí corpora allata (CA) – zdroje juvenilního hormonu (JH).



Obrázek 8 Vliv fotoperiody a corpus allatum na délku života u samců a samic *Pyrrhocoris apterus*

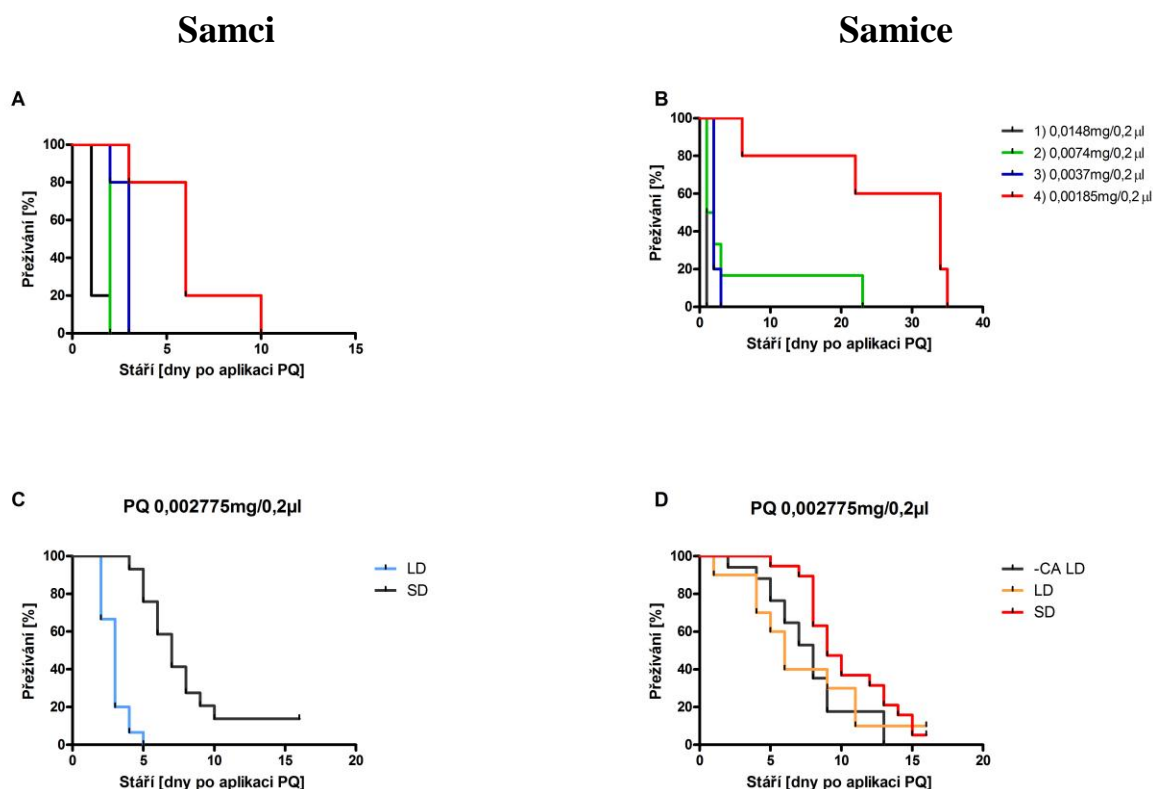
LD – dlouhý den (reprodukce), SD – krátký den (diapauza), CA – dlouhý den, alatektomie.

(A) Střední délka života samců (medián): LD=86 dnů (N=53); CA=122 dnů (N=42); SD=158 dnů (N=79). Srovnání křivek přežívání Log-Rank (Mantel-Cox) Test: LD vs. SD $P < 0,001$; LD vs. CA $P = 0,0006$; SD vs. CA $P < 0,0001$. (B) Střední délka života samic (medián): LD=66 dnů (N=62); CA=119 dnů (N=29); SD=168 dnů (N=53). Srovnání křivek přežívání Log-Rank (Mantel-Cox) Test: LD vs. SD $P < 0,001$; LD vs. CA $P = 0,0006$; SD vs. CA $P < 0,0001$.

Obr. 8 znázorňuje dobu přežívání jednotlivých skupin u samců (A) a samic (B). Nejkratší život mají reprodukčně aktivní ploštice v dlouhém dnu (LD). Odstranění CA (alatektomie), zabránilo produkci vajíček a prodloužilo život jak samicím, tak samcům. Maximální prodloužení života bylo dosaženo u diapauzních ploštic obou pohlaví v krátkém dnu. Skutečnost, že život diapauzních ploštic je delší než život alatektomovaných ploštic, ukazuje, že nepřítomnost JH přispívá k prodloužení života, ale nestačí na prodloužení života na diapauzní úroveň.

4.2 Vliv oxidačního stresu na délku života

Zvýšení oxidačního stresu je považováno za příčinu urychlující proces stárnutí. Zda oxidační stres snižuje délku života i u plošnice *Pyrrhocoris apterus* ověřuje následující pokus. Oxidační stres byl zvýšen herbicidem paraquatem (PQ), který katalyzuje tvorbu volných radikálů (superoxidů).



Obrázek 9 Vliv oxidačního stresu na délku života u samců a samic *Pyrrhocoris apterus* pod různou fotoperiodou a po odnětí corpora allata

LD – dlouhý den (reprodukce), SD – krátký den (diapauza), CA – dlouhý den, alatektomie

(A) Střední délka života samců (medián):PQ 0,0148mg/0,2µl = 1(N=5); PQ 0,0074mg/0,2µl = 2 (N=5); PQ 0,0037mg/0,2µl = 3 (N=5); PQ (0,00185mg/0,2µl) = 6 (N=5); Statistická analýza: Log-rang (Mantel-Cox) Test: 1) vs. 2) P=0,0143; 1) vs. 3) P=0,0047; 1) vs. 4) P=0,0016; 2) vs. 3) P=0,0143; 2) vs. 4) P=0,0027; 3) vs. 4) P=0,0145; (B) Střední délka života samic (medián):PQ 0,0148mg/0,2µl = 1(N=5); PQ 0,0074mg/0,2µl = 1,5 (N=5); PQ 0,0037mg/0,2µl = 2 (N=5); PQ (0,00185mg/0,2µl) = 34 (N=5); Statistická analýza: Log-rang (Mantel-Cox) Test: 1) vs. 2) P=0,0771(NS); 1) vs. 3) P=0,0027; 1) vs. 4) P=0,0024; 2) vs. 3) P=0,8925(NS); 2) vs. 4) P=0,0123; 3) vs. 4) P=0,0031

(C) Střední délka života samců (medián) po aplikaci PQ (c= 0,002775mg/0,2µl): LD = 3 dnů (N=15), SD = 7 dnů (N=25),

Statistická analýza Log-rang (Mantel-Cox) Test: LD vs. SD P<0,0001; (D) Střední délka života samic (medián) po aplikaci PQ (c= 0,002775mg/0,2µl): LD = 6 dnů (N=9), SD = 9 dnů (N=18), CA = 8 (N=17), Statistická analýza Log-rang (Mantel-Cox) Test: LD vs. SD P=0,1988(NS);LD vs. -CA P=0,9328(NS); SD vs. -CA P=0,0201;

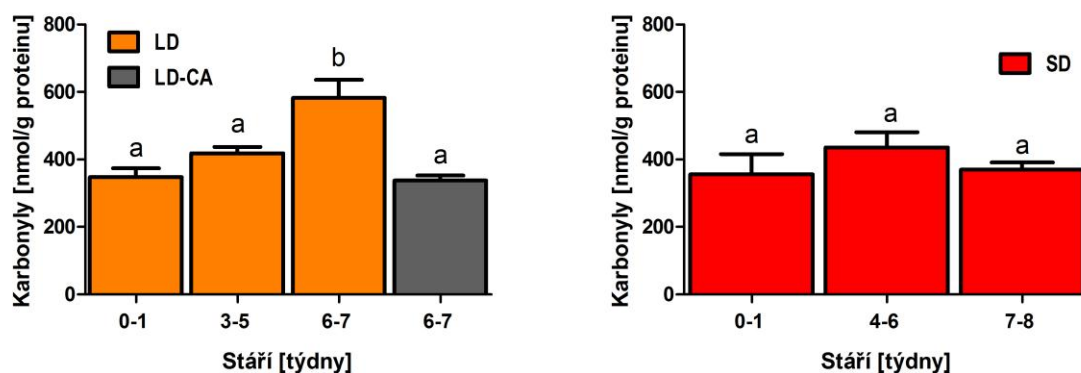
Na Obr. 9 A a B je porovnáván vliv různých koncentrací PQ na přežívání samců a samic po aplikaci na čerstvá imaga. Koncentrace vyšší než 0,0074 mg/0,2 μ l vedla k rychlému úmrtí u samic i samců. Po podání nižší koncentrace se délka života prodloužila především u samic, které se zdají být rezistentnější k oxidačnímu stresu. Na Obr. 9. C a D vidíme vliv fotoperiody a odnětí corpora allata (JH) na rezistenci vůči oxidačnímu stresu. Použitá koncentrace byla podle výsledků předchozího pokusu zvolena tak, aby předpokládaná doba života byla vyšší než několik dní (0,002775 mg/0,2 μ l). Samci (Obr 9 C) v diapauze jsou signifikantně rezistentnější k oxidačnímu stresu než reprodukčně aktivní jedinci. Což může být v důsledku vyšší váhy diapauzních samců. U samic (Obr 9 D) zvyšuje alatektomie rezistenci k oxidačnímu stresu, ale ne tak signifikantně jako diapauza.

4.3 Obsah karbonylovaných proteinů a celkových proteinů v hrudních svalech

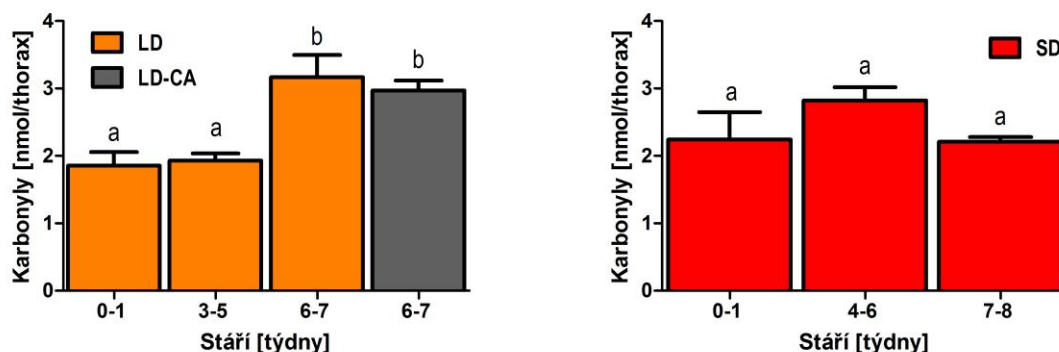
Z předchozího pokusu můžeme říci, že experimentálně zvýšený oxidační stres snižuje délku života ploštice, ale protože se jedná o nepřírozený zásah do organismu, který poměrně dramaticky snižuje dobu života. Rozhodli jsme se zjistit změny v poškození oxidačním stresem během života u ploštice bez experimentálně navýšeného oxidačního poškození v diapauze, po odnětí CA a u reprodukčně aktivních jedinců.

4.3.1 Samice – karbonylované proteiny

A- Relativní obsah karbonylů (samice)



B - Absolutní obsah karbonylů (samice)



Obrázek 10 Změny v obsahu karbonylů v hrudních svalech samic *Pyrrhocoris apterus* pod vlivem fotoperiody, corpora allata a věku.

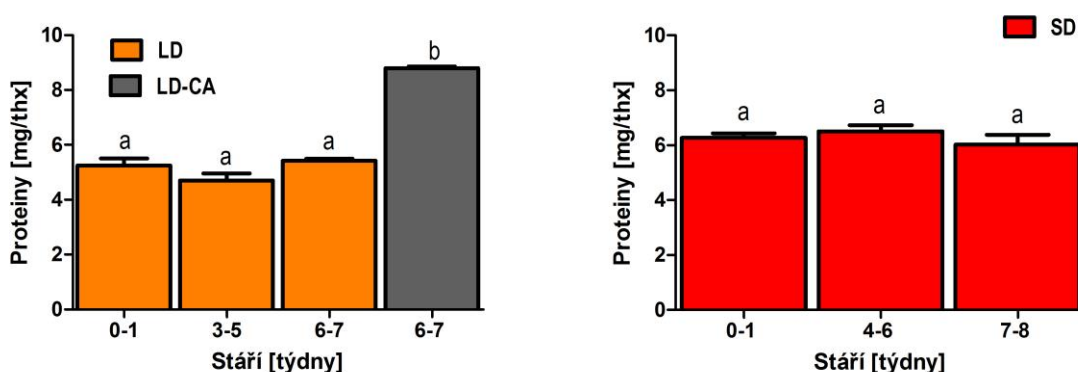
LD - dlouhý den, LD-CA – dlouhý den, alatektomie, SD – krátký den; N=3-5 (10 thoraxů/vzorek) (A) Relativní obsah karbonylů (nmol/g proteinu). Rozdíl mezi průměry: Jednocestná ANOVA: Tukey Post Test (Signifikantně odlišné hodnoty jsou značeny různými písmeny nad sloupci). P (LD)=0,0018; 0-1 vs. 6-7 P<0,005; 3-5 vs. 6-7 P<0,05; 6-7 vs. 6-7-CA P<0,005; (B) Absolutní obsah karbonylů (nmol/ thorax). Rozdíl mezi průměry: Jednocestná ANOVA: Tukey Post Test (Signifikantně odlišné hodnoty jsou značeny různými písmeny nad sloupci). P (LD)=0,0014; 0-1 vs. 6-7 P<0,005; 0-1 vs. 6-7-CA P<0,05; 3-5 vs. 6-7 P<0,005; 3-5 vs. 6-7-CA P<0,05;

Na Obr 10 (A, B) jsou znázorněny změny v obsahu karbonylů s věkem pod vlivem různých fotoperiod a alatektomie. U reprodukčně aktivních samic stoupá jak relativní, tak

absolutní obsah karbonylů s věkem. U diapauzních samic se relativní i absolutní hladina karbonylovaných proteinů s věkem nemění. Alatektomie příliš nemění absolutní množství karbonylovaných proteinů (Obr 10 B), zároveň však zvyšuje množství celkových proteinů (Obr 11), takže dochází ke snížení množství relativního obsahu karbonylů (Obr 11 A). Můžeme tedy říci, že dlouhověkost (navozena diapauzou či alatektomií) je spojena s udržením nižšího relativního obsahu karbonylovaných proteinů. Nízké absolutní a relativní množství karbonylů souvisí se snížením pohybové aktivity pouze u diapauzních samic (Obr 10).

4.3.2 Samice – celkové proteiny

Absolutní obsah proteinů (samice)



Obrázek 11 Změny v obsahu proteinů v hrudních svalech samic *Pyrrhocoris apterus* pod vlivem fotoperiody, corpora allata a věku.

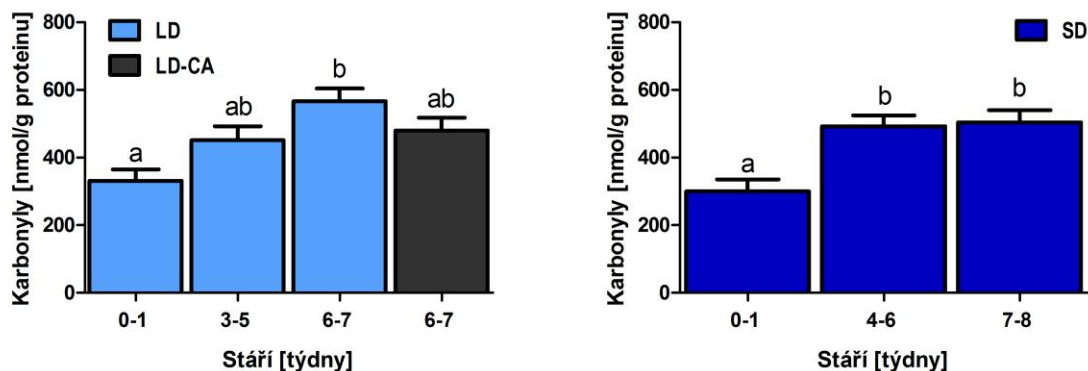
LD - dlouhý den, LD-CA – dlouhý den, alatektomie, SD – krátký den; N=2-5 (8-10 thoraxů/vzorek)

Rozdíl mezi průměry: Jednocestná ANOVA: Tukey Post Test (Signifikantně odlišné hodnoty jsou značeny různými písmeny nad sloupci). P(LD)<0,0001; 0-1,3-5, 6-7 vs. 6-7-CA P<0,0001; P(SD)

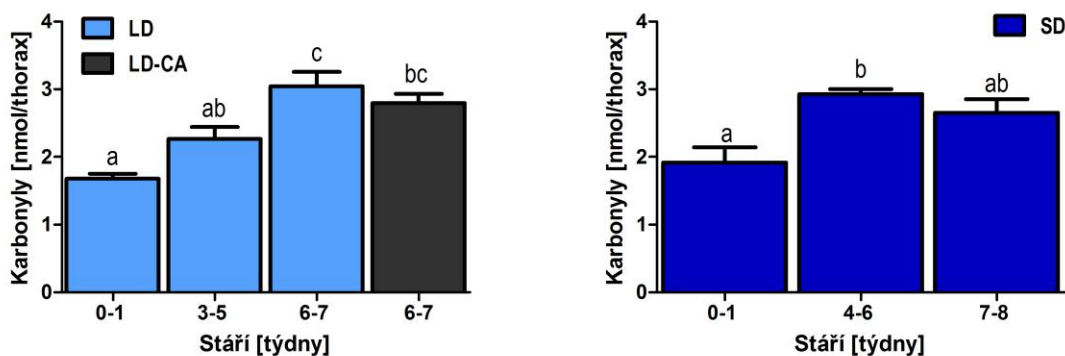
Obsah celkových proteinů se u reprodukčně aktivních ploštic s věkem nemění, stejně jako u diapauzních, pouze alatektomie obsah proteinů zvyšuje (Obr 11).

4.3.3 Samci – karbonylované proteiny

A - Relativní obsah karbonylů (samci)



B - Absolutní obsah karbonylů (samci)

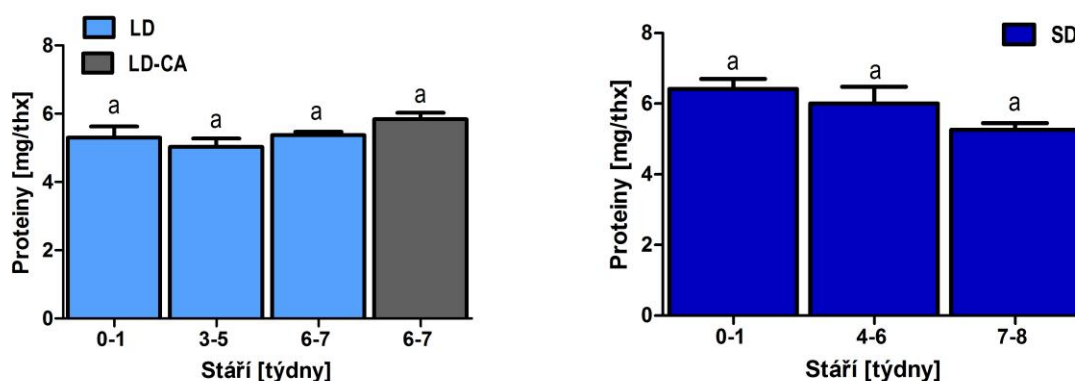


Obrázek 12. Změny v obsahu karbonylů v hrudních svalech samců *Pyrrhocoris apterus* pod vlivem fotoperiody, corpora allata a věku.

LD - dlouhý den, LD-CA – dlouhý den, alatektomie, SD – krátký den; N=3-6 (8-10 thoraxů/vzorek) (A) Relativní obsah karbonylů (nmol/g proteinu). Rozdíl mezi průměry: Jednocestná ANOVA: Tukey Post Test (Signifikantně odlišné hodnoty jsou značeny různými písmeny nad sloupci). P (LD)=0,0043; 0-1 vs. 6-7 P<0,005; P(SD) = 0,0053; 0-1 vs. 4-6 P<0,05; 0-1 vs. 7-8 P<0,005; (B) Absolutní obsah karbonylů (nmol/thorax). Rozdíl mezi průměry: Jednocestná ANOVA: Tukey Post Test (Signifikantně odlišné hodnoty jsou značeny různými písmeny nad sloupci). P (LD)=0,0001; 0-1 vs. 6-7 P<0,0001; 0-1 vs. 6-7-CA P<0,005; 3-5 vs. 6-7 P<0,05; P(SD)=0,0178; 0-1 vs. 4-6 P<0,05

Na Obr. 12 vidíme změny v relativním (A) a absolutním (B) obsahu karbonylů u samců. U reprodukčně aktivních samců stoupá s věkem relativní i absolutní hodnota karbonylovaných proteinů, u diapauzních samců je vzestup podobný. Alatektomie mírně snižuje množství karbonylovaných proteinů u starších samců, ale tento rozdíl není signifikantní. Na rozdíl od samic, u samců nemá alatektomie vliv na celkový obsah proteinů, který zůstává stejný jako u mladých samců (Obr 11 a 13). V rozporu s výsledky samic (Obr 10) nemůžeme u samců potvrdit hypotézu, že prodloužení délky života souvisí s nižší hladinou karbonylovaných proteinů.

4.3.4 Samci – celkové proteiny



Obrázek 13 Změny v obsahu proteinů v hrudních svalech samic *Pyrrhocoris apterus* pod vlivem fotoperiody, corpora allata a věku.

LD - dlouhý den, LD-CA – dlouhý den, alatektomie, SD – krátký den; N=3-4 (8-10 thoraxů/vzorek)

Rozdíl mezi průměry: Jednocestná ANOVA: Tukey Post Test (Signifikantně odlišné hodnoty jsou značeny různými písmeny nad sloupci).

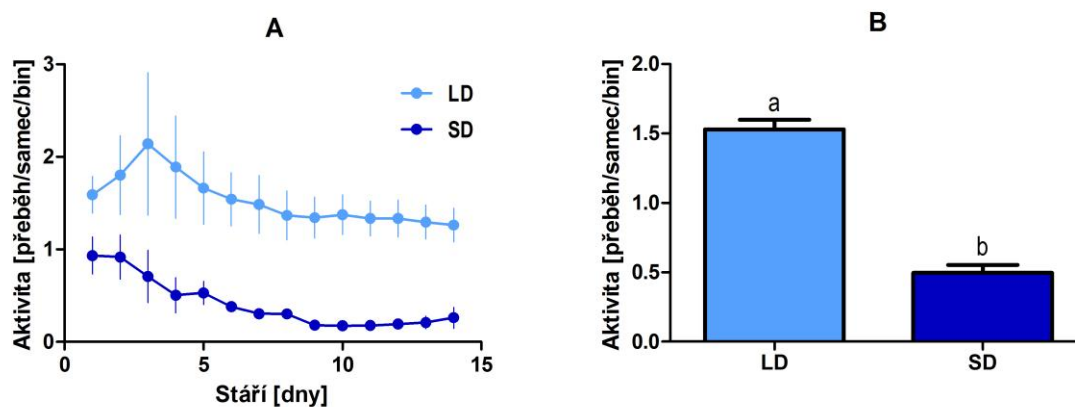
Na Obr. 13 je patrné, že množství celkových proteinů se u samců pod vlivem fotoperiody příliš nemění a zůstává podobné i v průběhu života.

4.4 Pohybová aktivita

Pokus ověřuje, zda je prodloužení délky života diapauzou či alatektomií spojeno se snížením pohybové aktivity a/nebo se změnou charakteru denního rytmu v pohybové aktivitě.

4.4.1 Pokus 1 – Reprodukční a diapauzní plošnice

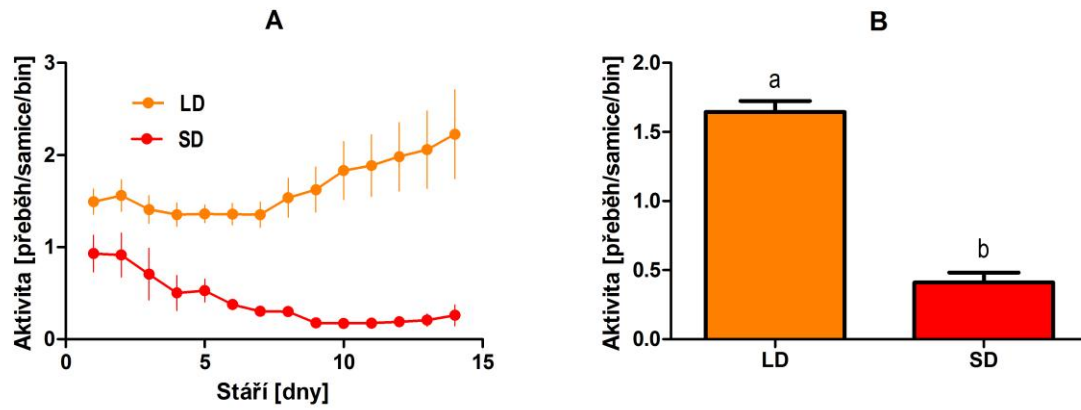
Na Obr. 14 a 15 vidíme, že intenzita pohybové aktivity byla podstatně snížena diapauzou jak u samců, tak samic. Diapauzní jedinci nevykazují v denních rytmech význačnou periodicitu. Naopak denní rytmus reprodukčních plošnic vykazuje periodicitu zřetelnou (Obr 16). Sílu rytmu reprodukčně aktivních a diapauzních ploštic lze velmi těžko srovnávat vzhledem k velmi rozdílné intenzitě pohybové aktivity u těchto dvou skupin.



Obrázek 14 Intenzita pohybové aktivity samců *Pyrrhocoris apterus* při různé fotoperiodě

LD – dlouhý den (N=15), SD – krátký den (N=13); 1 bin = 12min.

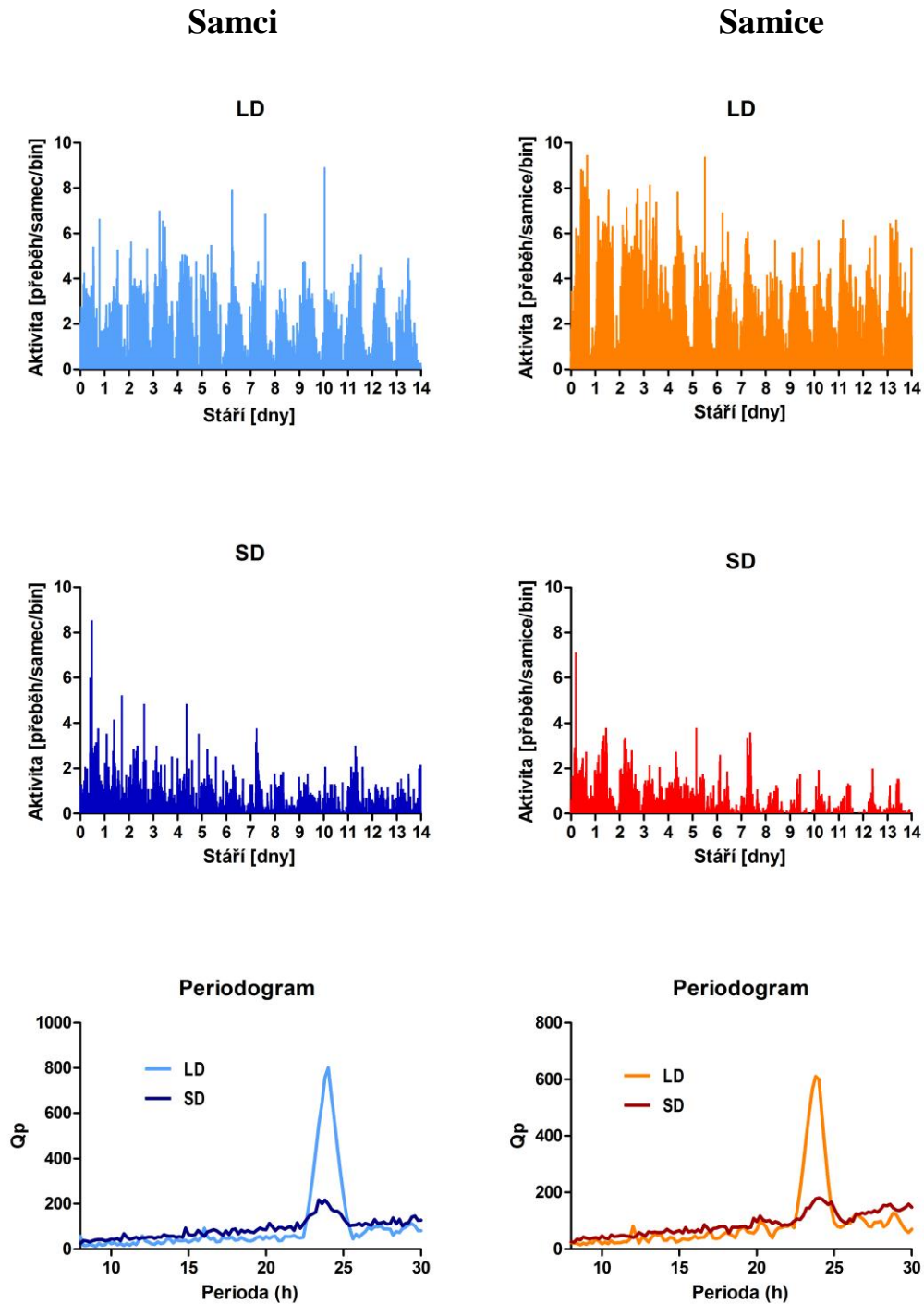
(A) Jednodenní průměry, (B) Průměr za celou dobu měření (14dnů). Rozdíl mezi průměry: t-test (signifikantně odlišné hodnoty jsou značeny různými písmeny nad sloupci):. $P < 0,0001$; LD vs. SD $P < 0,0001$



Obrázek 15 Intenzita pohybové aktivity samic *Pyrrhocoris apterus* při různé fotoperiodě

LD – dlouhý den (N=13), SD – krátký den (N=14); 1 bin = 12 min.

(A) Jednodenní průměry, (B) Průměr za celou dobu měření (14dnů). Rozdíl mezi průměry: t-test (Signifikantně odlišné hodnoty jsou značeny různými písmeny nad slupci): $P < 0,0001$; LD vs. SD $P < 0,0001$



Obrázek 16 Denní rytmus pohybové aktivity samců a samic plošnice *Pyrrhocoris apterus* v různých fotoperiodických režimech.

Samců a) za dlouhého dne (LD) N=15 a c) krátkého (SD) N=13 nebo u samic v režimu b) dlouhého dne (LD) N=13 a d) krátkého dne (SD) N=14; 120 binů = 24h.

Síla rytmy (Qp) hodnocena pomocí chi-square periodogram analysis (Refinetti 2000); (Samci) maximální Qp: LD – 800/24h., P<0,011, SD – 217/23,4h., P<0,011; (Samice) maximální Qp: LD -610/23,8h., P<0,011, SD – 180/24h., P>0,05 n.s.;

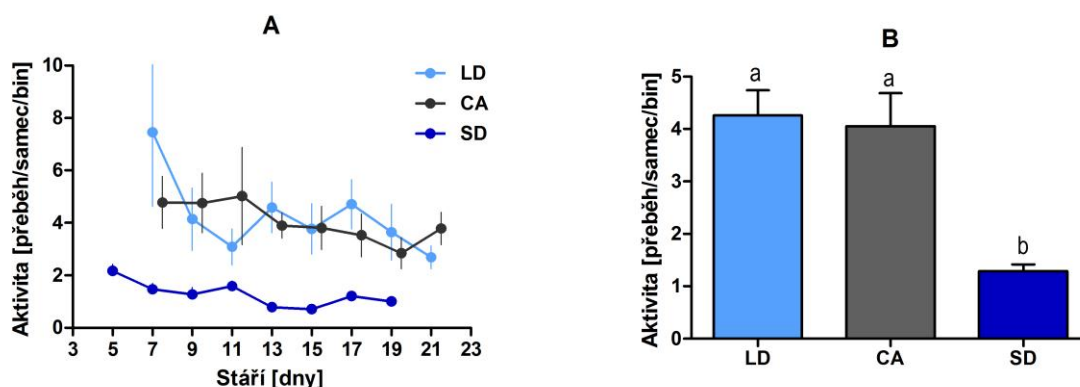
4.4.2 Pokus 2 – Reprodukční, alatektomované a diapauzní plošnice

Druhý pokus rozšiřuje předchozí výsledky o alatektomované plošnice. Byl zúžen infračervený paprsek, což zvýšilo počty přerušení paprsku přeběhem plošnice.

4.5 Intenzita pohybové aktivity

Podobně jako v předchozím pokuse byla pohybová aktivita diapauzních jedinců nižší než u reprodukčně aktivních u obou pohlaví (Obr 14 a 15). Naproti tomu odstranění CA nemělo signifikantní vliv na intenzitu pohybové aktivity (Obr 17 a 18). Srovnání reprodukčně aktivních ploštic s diapauzními podporuje hypotézu, že snížení pohybové aktivity přispívá k prodloužení života. Zároveň je zřejmé, že dlouhověkost zapříčiněná nepřítomností CA (JH) není důsledkem snížené pohybové aktivity.

Samci

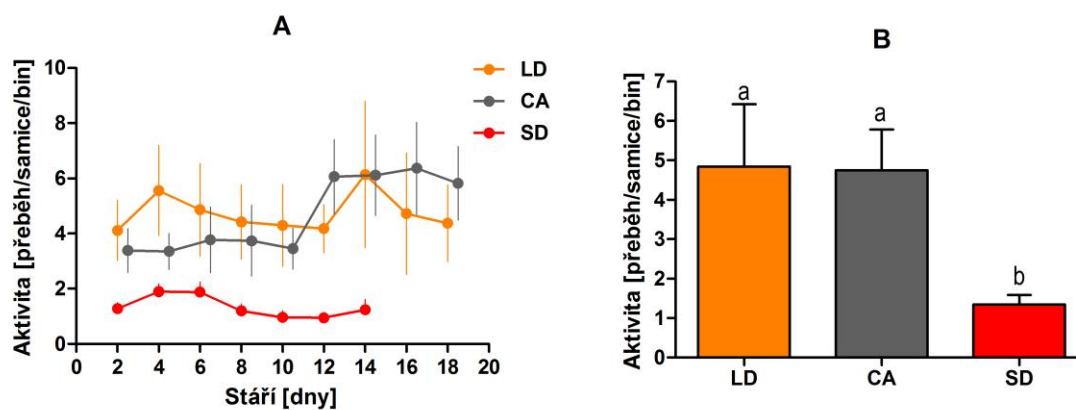


Obrázek 17 Intenzita pohybové aktivity při různé fotoperiodě a nepřítomnosti corpora allata u samců *Pyrrhocoris apterus*

LD – dlouhý den (N=6), CA – dlouhý den, alatektomie (N=8), SD – krátký den (N=14). 1bin = 12 min.

(A) Dvoudenní průměry. (B) Průměr za celou dobu měření (16 dnů); Rozdíl mezi průměry: Jednocestná ANOVA: Tukey Post Test (Signifikantně odlišné hodnoty jsou značeny různými písmeny nad sloupci). P(B) < 0,0001; LD vs. SD P < 0,001; CA vs. SD P < 0,001

Samice



Obrázek 18 Intenzita pohybové aktivity při různé fotoperiodě a nepřítomnosti corpora allata u samic *Pyrrhocoris apterus*

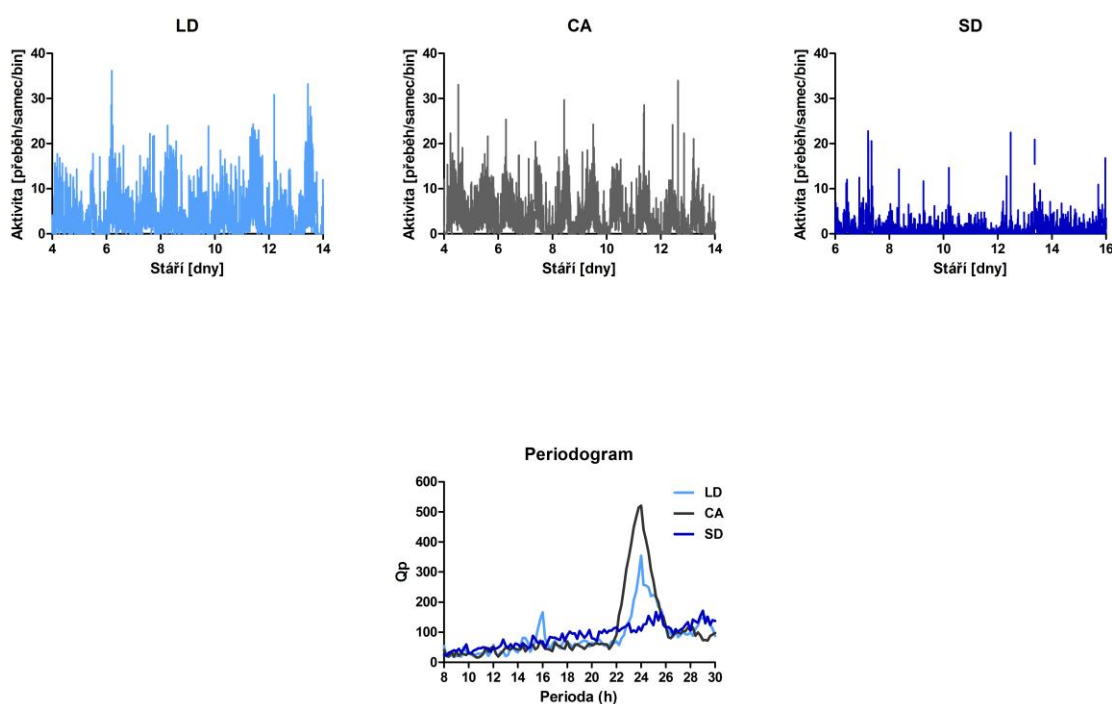
LD – dlouhý den (N=6), CA – dlouhý den, alatektomie (N=7), SD – krátký den (N=16). 1bin = 12 min.

(A) Dvoudenní průměry. (B) Průměr za celou dobu měření (16 dnů); Rozdíl mezi průměry: Jednocestná ANOVA: Tukey Post Test (Signifikantně odlišné hodnoty jsou značeny různými písmeny nad sloupci). P(B)=0,0017; LD vs. SD P<0,01; CA vs. SD P<0,01

4.6 Rytmus v pohybové aktivitě

Intenzita pohybové aktivity je u reprodukčně aktivních ploštic podobná jako u alatektomovaných, avšak denní rytmus je silnější u alatektomovaných než u reprodukčně aktivních ploštic (Obr 19 a 20). Tento rozdíl je dobře viditelný hlavně u samic (Obr 20), kde má nepřítomnost CA za následek prodloužení period s nízkou aktivitou (spánková konzolidace?) a snížení fragmentace rytmu. Což podporuje hypotézu, že silné rytmy pozitivně jorelují s délkou života.

Samci

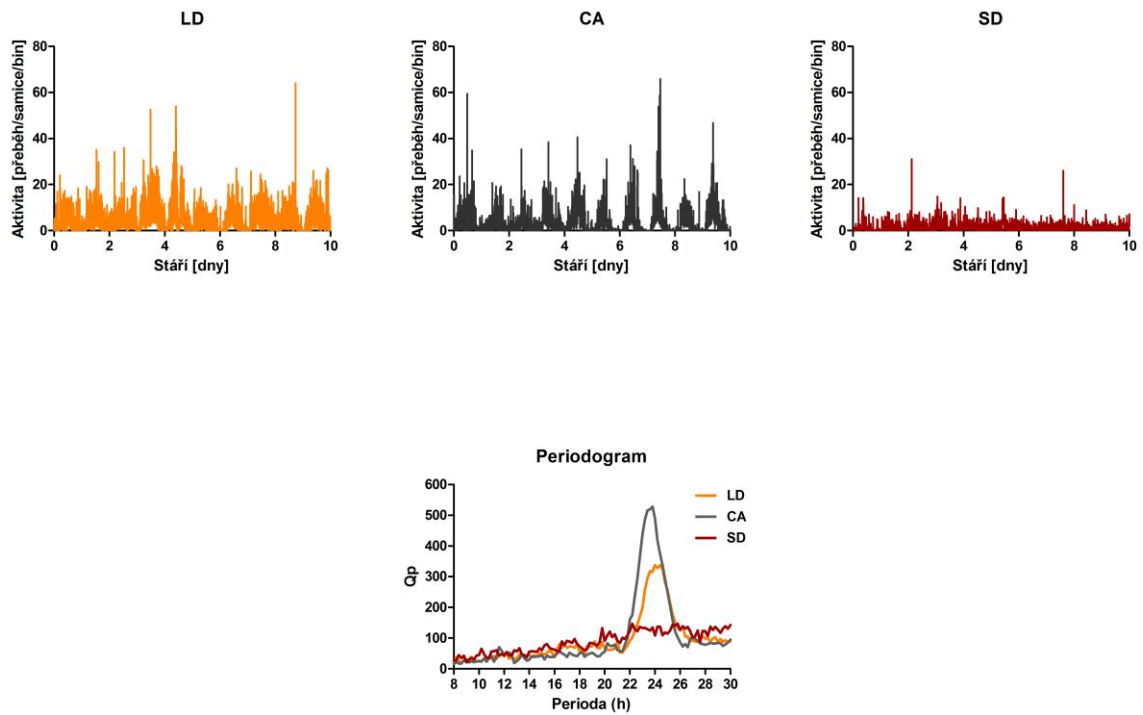


Obrázek 19 Denní rytmus v pohybové aktivitě samců *Pyrrhocoris apterus* při různé fotoeriodě a nepřítomnosti corpora allata

LD – dlouhý den (N=6), CA – dlouhý den, alatektomie, SD – krátký den (N=14). 120 binů = 24 h.

Síla rytmů (Qp) byla hodnocena pomocí chi-square periodogram analysis (Refinetti 2000); maximální Qp: LD – 354/24h., $P < 0,011$; CA -521/24h., $P < 0,011$; SD – 144/29h., n.s.

Samice



Obrázek 20 Denní rytmus v pohybové aktivitě samic *Pyrrhocoris apterus* při různé fotoeriodě a nepřítomnosti *corpora allata*

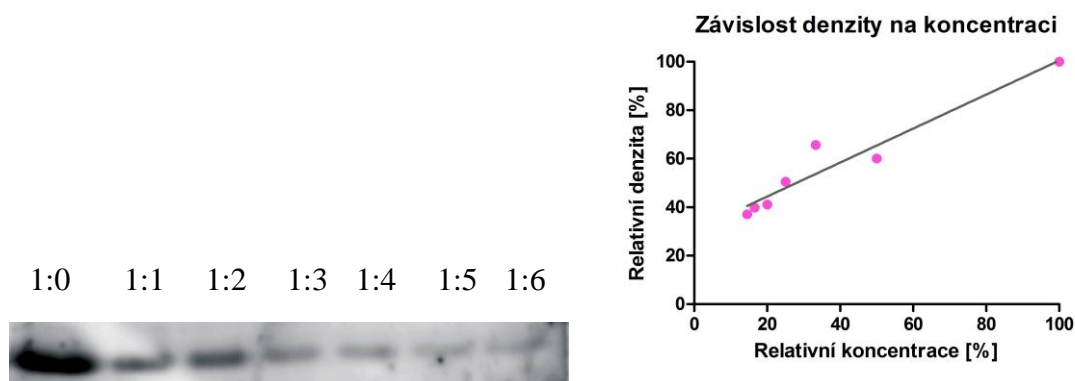
LD – dlouhý den (N=6), CA – dlouhý den, alatektomie (N=7), SD – krátký den (N=1). 120 binů = 24 h.

Síla rytmi (Qp) byla hodnocena pomocí chi-square periodogram analysis (Refinetti 2000); maximální Qp: LD – 337/24h., $P < 0,011$; CA – 528/23,8h., $P < 0,011$; SD – 146/29h., n.s.

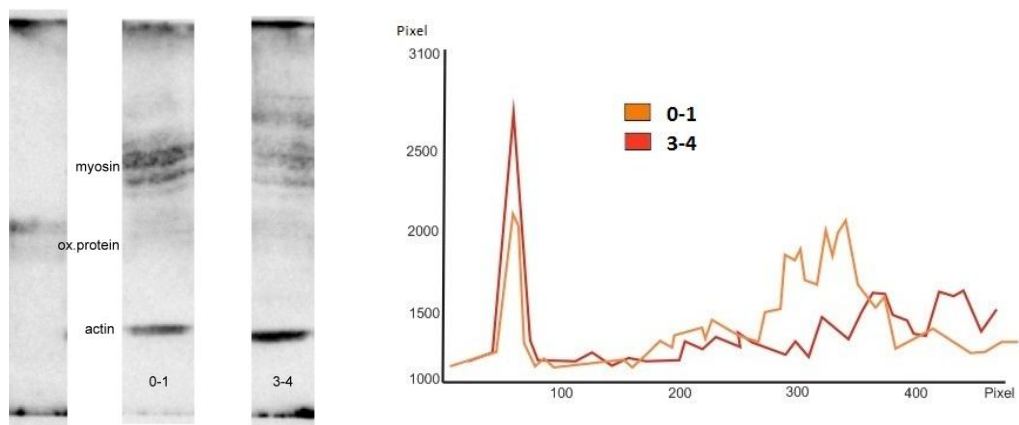
4.7 Použití metody Western Blot

Pro určení nejvhodnější koncentrace proteinů na detekci karbonylovaných proteinů metodou Western blot, byly použity hrudní svaly reprodukčně aktivních samic plošnice *Pyrrhocoris apterus* stáří 2-3 týdnů o různém ředění (Obr. 21). Výchozí, neředěný vzorek, obsahoval 10 thoraxů/500 μ l Tris-EDTA pufru. Ředění je v posloupnosti se vzorkovým pufrem 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6. Na membráně vidíme proužky molekulovou velikosti odpovídající aktinu (cca 40kDa). Vidíme, že ředění odpovídá relativní koncentraci vzorku.

Na Obr. 22 je srovnáno množství karbonylovaných proteinů mladých u (0-1týden) a starých (3-4týdny) samic LD. Vzorek obsahoval 3 thoraxy/100 μ l vzorkového pufru. Standard oxidovaného proteinu 5 μ l/10 μ l vzorkového pufru. Na Obr. 22 jsou vidět dvě sekce proužků, jedna v úrovni molekulové hmotnosti aktinu a druhá myosinu. U mladých samic je karbonylován především proužek odpovídající myosinu. U starých ploščic nestoupila karbonylace všech proteinů, ale jen v proužku odpovídajícímu aktinu. Zajímavé je, že klesla karbonylace v oblasti myosinu. Změna v kvalitě karbonylovaných proteinů může mít za následek nevypovídající závěr z kvantitativního hodnocení celkových karbonylovaných proteinů.



Obrázek 21 Western blot karbonylované proteiny hrudních svalů samic plošnice *Pyrrhocoris apterus* v LD při postupném ředění. (Derivatizace karbonylů s DNPH). Proteiny o molekulové hmotnosti cca 40kDa (aktin?)



Obrázek 22 Western blot karbonylované proteiny hrudních svalů samic ploštic *Pyrrhocoris apterus* v LD ve stáří 0-1 týden a 3-4 týdny. Označené proužky odpovídají molekulové hmotnosti aktinu a myosinu. Lineární závislosti koncentrace vzorku na membráně vytvořena programem Image Quant 5.2.

5 DISKUZE

V diplomové práci jsem z několika pohledů testovala hypotézy ověřující vliv oxidačního stresu na stárnutí. Jedním z nich byl vliv fotoperiody a corpora allata, dalším množství karbonylovaných proteinů a to vše v souvislosti s pohybovou aktivitou plošnice *Pyrrhocoris apterus*.

Ve studiích stárnutí se při mezidruhovém porovnávání často využívá maximální délky života a pro metabolismus „resting metabolic rate“ (RMR). Podle Speakmana (2005) nejsou výše uvedené parametry vhodné pro porovnávání stárnutí. Vhodnější by podle něj bylo použití „daily energy expenditure“, než RMR, které by udávalo množství energie na gram za den v závislosti na velikosti organismu. Zvířata vydávají značné množství energie na různé procesy a funkce. Na bazální metabolismus u malých savců připadá jen 40% z celkového výdeje energie. Zdá se tedy, že zahrnutí pohybové aktivity do studií o stárnutí znamená důležitý pokrok.

5.1 IIS signalizace a délka života

Pozorování na háďátku, octomilce i savcích ukazují, že IIS dráhy regulují délku života (Kang a spol., 2008). Juvenilní hormon je jedním z činitelů IIS dráhy (Flatt a spol., 2005). Výsledky získané na plošnici ukázaly, že po odstranění zdroje juvenilního hormonu, corpora allata, dojde k prodloužení života. Podobný vliv má i diapauza, kde je však délka života ještě vyšší než u alatektomovaných ploštic. Reprodukce má negativní vliv na délku života. Výsledky jsou v souladu s dřívějšími zjištěními (Hodková, 2008 a Blažková a spol., 2011).

5.2 Pohybová aktivita a délka života

U hmyzu byl prokázán vztah mezi pohybovou aktivitou a délkou života u mouchy *Musca domestica* (Yan a Sohal, 2000) a octomilky (Megware a spol., 2006). Létání je u hmyzu energeticky velmi náročná činnost (Wegener, 1996), během které se rychlost metabolismu oproti bazální rychlosti metabolismu mnohánásobně zvyšuje (Megware a spol., 2006). Vzhledem k velikosti těla je i chůze pro hmyz velmi náročná, např. chůze u octomilky je 470x náročnější než let a pro kobyliku 40x náročnější (Price, 1997). Proto usuzuji, že podobně jako let by měla být chůze energeticky náročnou činností u nelétajícího hmyzu jako je plošnice *Pyrrhocoris apterus*.

Mouchy *Musca domestica* se zvýšenou pohybovou aktivitou mají kratší délku života ve srovnání s nelétajícími kontrolami (Yan a Sohal, 2000). Podobně je tomu u octomilek,

kde vyšší pohybová aktivita souvisí s kratší dobou života a naopak nižší pohybová aktivita s delším životem (Megware a spol., 2006). Podobné výsledky najdeme i u diapauzních ploštic, které mají sníženou pohybovou aktivitu a delší život. Potvrzení však nenacházíme u ploštic alatektomovaných, kde je dlouhý život doprovázen vysokou pohybovou aktivitou. Rozdíl v délce života alatektomovaných a diapauzních ploštic by mohl souviset právě se sníženou pohybovou aktivitou diapauzních samic. Rozdíl v pohybové aktivitě u alatektomovaných a diapauzních ploštic může být způsoben buňkami pars intercerebralis (PI), producenty „inzulin-like“ peptidů. Jejich odnětí snižuje intenzitu pohybové aktivity u alatektomovaných ploštic na úroveň ploštic diapauzních (Hodková, unpublished). Po odnětí PI se u ploštice prodlužuje život, při současném odnětí CA a PI dochází k aditivnímu prodloužení života na úroveň diapauzních ploštic (Hodková, 2008). Odnětí PI u octomilky také zvyšuje délku života, jak průměrnou, tak maximální a navíc bylo zjištěno, že zvyšuje resistenci k oxidačnímu stresu (Broughton a spol., 2005). Prodloužení života zamezením produkce inzulínových ligandů důsledkem odnětí produkujících buněk bylo prokázáno i u háďátka. Ovšem u savců vede zamezení IIS signalizace k cukrovce a snížení délky života (Murphy a spol., 2003).

Jedním z dalších aspektů pohybové aktivity je rytmus. U octomilek bylo prokázáno, že s věkem slábne síla v rytmech spánku a bdění. Délka života byla manipulována teplotou, kdy nejnižší teplota vedla k nejdelšímu životu a zároveň nejsilnějšímu rytmu. Změny v síle rytmu souvisí spíše s fyziologickým než chronologickým stárnutím. Všechny teplotní skupiny vykazovali stejnou pohybovou aktivitu a dobu spánku. Navíc bylo prokázáno, že zvýšený oxidační stres navozuje stejné změny v rytmech bdění octomilek jako vysoký věk (Koh a spol., 2006). Tuto hypotézu podporují výsledky u alatektomovaných ploštic, které mají silnější rytmus a delší život než reprodukčně aktivní ploštice. U diapauzních ploštic nemůžeme srovnávat sílu rytmů, protože jejich pohybová aktivita je velmi nízká.

5.3 Oxidační stres, metabolismus a pohybová aktivita

Pokles intenzity metabolismu snížením teploty vede u některých druhů ke snížení oxidačních škod a zvýšení délky života. Je tomu tak u poilkilotermních živočichů, kde pokles metabolismu souvisí s delším životem a zároveň se sníženým oxidačním poškozením (Sohal a Weindruch, 1996). Potvrzení této teorie nacházíme i u hmyzu, kdy snížená pohybová aktivita a souvisí s nižší tvorbou ROS, jak bylo potvrzeno u mouchy *M. domestica* (Yan a Sohal., 2000). To však nebylo potvrzeno na octomilkách, kde zvýšená pohybová aktivita nezvyšovala množství ROS ve srovnání s kontrolami (Megware a spol., 2006).

V souvislosti s nižší tvorbou ROS nacházíme u mouchy *M.domestica* nižší množství oxidačně poškozených proteinů. Testování hypotézy, zda zvýšení pohybové aktivity ovlivňuje délku života tím, že dochází ke zvýšení oxidačně poškozených proteinů, nepřineslo ani u ploštice jednoznačné závěry. U samců ploštice je pohybová aktivita vyšší u reprodukčně aktivních a alatektomovaných než u diapauzních skupin, ale obsah karbonylů je u všech skupin podobný. Z toho vyplývá, že u samců nemůžeme potvrdit vztah mezi pohybovou aktivitou a relativním ani absolutním množstvím karbonylovaných proteinů. U samic záleží na vztažné jednotce. Nacházíme vztah mezi absolutním obsahem karbonylovaných proteinů a pohybovou aktivitou, protože alatektomované a reprodukčně aktivní samice mají podobně vyšší množství poškozených proteinů oproti diapauzním samicím, což odpovídá jejich vyšší lokomoční aktivitě. Ale v relativním množství karbonylovaných proteinů souvislost s pohybovou aktivitou samic nenacházíme, protože pohybová aktivita je podobná u reprodukčně aktivních i alatektomovaných ploštic, ale relativní množství karbonylů alatektomovaných ploštic je signifikantně nižší než u reprodukčně aktivních samic.

5.4 Stárnutí a množství oxidačně poškozených proteinů

V mnoha studiích bylo prokázáno, že s věkem vzrůstá množství oxidačně poškozených makromolekul, lipidů, DNA a proteinů v různých tkáních. Oxidační poškození proteinů indikované proteinovými karbonyly se neukázalo být jednoznačným ukazatelem v procesu stárnutí u ploštice. Naprosto odlišnou situaci nacházíme u samic a samců. U samců dochází s věkem k akumulaci oxidačního poškození proteinů u všech skupin, ale u samic se stejný trend potvrdil pouze u reprodukčně aktivních samic. Vzestup karbonylovaných proteinů s chronologickým věkem je jeden pohled na situaci, ale druhý pohled řeší vztah fyziologického stárnutí a karbonylace proteinů v porovnání různě stárnoucích fenotypů. Očekávali bychom, že pomaleji stárnoucí fenotypy budou mít menší obsah karbonylovaných proteinů, jak prokázali některé práce na háďátku, i myších. Ale mnohé důkazy byly nepřímého charakteru, jako je zvýšený obsah antioxidantů či zvýšená resistance k oxidačnímu stresu (Peréz a spol., 2009).

Pokusy na ploštici nepotvrdily jednoznačně vztah mezi dlouhověkostí a zvýšeným obsahem oxidačně poškozených proteinů. Výsledky byly rozdělené u samců a samic. U samců nenacházíme žádný vztah mezi množstvím oxidačně poškozených proteinů a délkou života, protože u různě dlouhověkých fenotypů jsme nenašli významné rozdíly v množství karbonylů. U samic hypotézu potvrzuje relativní množství karbonylovaných

proteinů, které je nižší u dlouhověkých fenotypů, ale absolutní množství karbonylovaných proteinů hypotézu nepotvrzuje, protože dlouhověké alatektomované plošnice mají stejné absolutní množství oxidačně poškozených proteinů jako krátkověké reprodukčně aktivní samice. Nižší relativní množství karbonylovaných proteinů u alatektomovaných samic je způsobeno zvýšeným obsahem celkových proteinů alatektomovaných samic. Důvodem může být nepřítomnost juvenilního hormonu, protože v některých pracích bylo prokázáno, že vysoký titr juvenilního hormonu má za následek relokaci energie ze svalů do vajíček, čímž dochází k histolýze svalů. Stejně tak u makropterní formy plošnice, kde bylo prokázáno, že analog juvenilního hormonu urychluje histolýzu létacích svalů (Socha a Šula, 2008). Ale u cvrčků se tato hypotéza plně nepotvrdila. Juvenilní hormon se účastní „trade –off“ mezi údržbou svalů a růstem vajíček, ale je potřeba i dalších faktorů (Zera a Cisper, 2001). Také u diapauzních ploštic pouhá nepřítomnost juvenilního hormonu nemá za následek vzestup obsahu proteinů. Rozdíl mezi alatektomovanými a diapauzními plošticemi by mohl souviset s pohybovou aktivitou a aktivitou PI.

Pohlavně vázané rozdíly se vyskytují možná proto, že samičky investují velké množství energie do tvorby vajíček. Pokud se podíváme na klidovou spotřebu kyslíku, viz. Obr. 5 (úvod), vidíme, že u samců nejsou znatelné rozdíly u reprodukčně aktivních, alatektomovaných či diapauzních jedinců (Sláma, 1964a). U samic ovlivňuje respiraci reprodukční cyklus a po odstranění corpora allata či v diapauze dochází ke snížené spotřebě kyslíku, je tedy pod hormonální regulací (Sláma, 1964b). Snížení spotřeby kyslíku by mohla mít za následek sníženou produkci ROS a sníženou karbonylaci proteinů. Juvenilní hormon ovlivňuje respiraci prostřednictvím aktivity ovárií. CA nemá přímý vliv, jak vidíme na Obr. 6 (úvod), ale odstranění ovárií neprodlužuje život (Hodková, 2008).

Spotřeba kyslíku u samic je o třetinu až polovinu vyšší než u samců. Tento rozdíl odpovídá i průměrné délce života, reprodukčně aktivní samečci se dožívají o třetinu déle, než reprodukčně aktivní samice, ale množství karbonylovaných proteinů je podobné. Dále by bylo zapotřebí změřit spotřebu kyslíku u různě stárnoucích fenotypů ve starším věku, protože je možné, že dochází k nějakým změnám v průběhu života. Vysvětlení není ideální ani proto, že u hrudních svalů je hladina bazálního metabolismu stejná u samců i samiček a není pod přímým hormonálním vlivem (Sláma, 1965).

Rozdílné výsledky získané od samců a samiček mohou být i proto, že samice procházejí hlubší reprodukční diapauzou, než samci. Po přidání aktivních samiček k diapauzním samcům se u samců do 14 dnů obnoví reprodukční aktivita, ale při stejném

pokusu u samicěk k obnovení reprodukční aktivity nedojde (Hodková a spol., 1991). Ať již je vysvětlení jakékoliv, zdá se, že množství karbonylovaných proteinů v hrudních svalech není spolehlivým indikátorem stárnutí u ploštic.

Dalším faktorem, kterým by mohla pohybová aktivita ovlivňovat délku života v souvislosti s oxidačním stresem, jsou změny ve složení buněčné membrány. U octomilek bylo prokázáno, že pohybová aktivita souvisí se změnami v zastoupení lipidů v buněčné membráně (Magwere a spol., 2006). Octomilky s vyšší pohybovou aktivitou mají vyšší podíl nenasycených mastných kyselin a větší počet dvojných vazeb. Rozdíl v délce života u octomilek se zvýšenou aktivitou by tedy mohl být způsoben i vyšší náchylností membránových lipidů k oxidaci. Ve studii na háďátku se zjistilo, že náchylnost k oxidaci nezáleží pouze na nasycenosti, ale i na délce řetězce mastných kyselin. Zjistilo se, že náchylnost je zvýšena v membráně s vyšším zastoupením mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Naopak déle žijící fenotypy (mutanti v IIS) mají vyšší zastoupení řetězců kratších, méně náchylných k oxidaci (Shmooklers a spol., 2011). Podobné vysvětlení by mohlo platit i u ploštice, protože zastoupení mastných kyselin v membráně je odlišné ve svalech a tukové tkáni u diapauzních a alatektomovaných ploštic ve srovnání s reprodukčně aktivními (Hodková a spol., 2002). Zdá se, že produkty lipoperoxidace se zvyšují řetězovou reakcí a způsobují tím vážné poškození funkčnosti buňky (Zimniak, 2008).

5.5 Pochybnosti o teorii oxidačního stresu

Teorie oxidačního stresu stárnutí se stala hlavní teorií vysvětlující stárnutí na molekulární úrovni. I přesto, že existuje velké množství dat podporujících tuto teorii, velká většina z nich je korelačního rázu (např. korelace mezi délkou života a množstvím oxidačního poškození, atd.). Přímé důkazy, že oxidační poškození ovlivňuje stárnutí, však chybí (Peréz a spol., 2009).

I přesto, že se zdá, že existuje reverzní vztah mezi rychlostí metabolismu a délkou života, ukázalo se, že situace není tak jednoduchá. Měření u savců prokázala, že zvýšená rychlost metabolismu nevede ke kratšímu životu (Holloszy a spol., 1985). U lidí dokonce zvýšená rychlost metabolismu naznačuje pozitivní korelaci s délkou života (Lee a spol., 1995). U ektodermů se zdá být situace snazší, protože není takový problém v manipulaci s rychlostí metabolismu jako u endotermů (Van Voohries, 2001). Ale existuje i několik prací, které nepotvrzují vztah mezi délkou života a rychlostí metabolismu, např. u octomilky (Promislow a Haselkorn, 2002 a Van Voories a spol., 2004).

Jedním z důvodů, proč nenacházíme negativní korelaci mezi rychlostí metabolismu a délkou života vždy, může být to, že rychlost spotřeby kyslíku mitochondrií nemusí přesně předpovídat množství vyprodukovaných ROS (Loft a spol., 1994). V některých případech dokonce mitochondrie při vyšším metabolismu produkuje méně ROS (Speakman, 2005). Na druhou stranu existují studie, kde je prokázáno, že vysoká pohybová aktivita vede k produkci tak velkého množství ROS, že překoná antioxidační obranu (Ji, 1995). Komplikace nastávají i při měření metabolismu, kdy standardní měření neodlišuje různé respirační fáze mitochondrie, které se liší v produkci ROS podle závislosti na ADP. Je možné, že ptáci využívají více respirační stav-3, ve kterém dochází k nižší produkci ROS (Herrero a Barja, 1998). Rychlost metabolismu je důležitým faktorem ovlivňujícím stárnutí, ale je zřejmé, že existuje i mnoho dalších faktorů, které jsou důležité v určování dlouhověkosti. Navíc ROS nemají pouze škodlivé funkce, ale jsou potřeba při stimulaci transkripčních faktorů zahrnutých v mitóze (Halliwell, 2000), formaci paměti a při kontrole iontové signalizace (vápníku) (Suzuki a spol., 1997).

Současné práce na antioxidantech velmi zpochybňují roli oxidačního stresu v procesu stárnutí. U háďátka vedlo odstranění mitochondriálních SOD RNA interferencí ke zvýšené citlivosti na oxidační stres, ale nemělo žádný vliv na délku života, v některých případech došlo dokonce k prodloužení života. Žádný vliv nemělo odstranění SOD ani u prodloužení délky života snížením IIS regulace. Podobné závěry byly zjištěny u SOD produkovaných v cytoplasmě či extracelulárně (Van Raamsdonk a Hekimi, 2009). U komára vedlo zvýšené množství inzulinu dodávané v potravě ke snížení tvorby SOD a délky života, což by naznačovalo, že inzulinem snížená délka života je ve vztahu s oxidačním stresem (Kang a spol., 2008). Opačné závěry dostáváme u octomilky a myši, kde odstranění jedné izoformy SOD vede k vážným poruchám či smrti (Van Raamsdonk a Hekimi, 2009). U diapauzního komára a *Lutzomyia longipalpis* zamezení tvorby katalázy RNA interferencí vedlo ke zvýšené úmrtnosti (Sim a Denlinger, 2011 a Diaz-Albiter a spol., 2011). SOD u myši je však jediným prokázaným antioxidantem, který prodlužuje život. Žádný další z 18 testovaných antioxidantů neměl vliv na délku života myši (Pérez a spol., 2009).

Komplex 1 mitochondriálního elektronového transportního řetězce (ubichinon oxidoreduktáza) je považován za největšího producenta ROS. Dosud nebylo možné jej přímo manipulovat, protože je složen u mnoha podjednotek. Recentně došlo k objevu složení NADH-ubichinon oxidoreduktázy u háďátka, která je složena pouze z jednoho polypeptidu, čímž umožňuje přímou manipulaci s mitochondriální aktivitou a většímu pochopení vztahu

mezi respirační aktivitou, produkcí ROS a stárnutím (Partridge, 2011). Nemůžeme tedy s jistotou tvrdit, že oxidační stres je příčinou stárnutí. Ani výsledky této diplomové práce jednoznačně nepotvrdili ani nevyvrátily vztah mezi pohybovou aktivitou, délkou života a množstvím oxidačně poškozených proteinů. Pouze u diapauzních samic souvisela zvýšená dlouhověkost se sníženou pohybovou aktivitou a obsahem karbonylovaných proteinů.

6 ZÁVĚRY

1. Vliv fotoperiody a corpora allata na délku života *P. apterus*

- Diapauza a odstranění corpora allata prodlužuje délku života u samic i samců.

2. Srovnání množství oxidačně poškozených proteinů (karbonylovaných proteinů – KP) v hrudních svalech ploštic u různě stárnoucích fenotypů

- Změny v obsahu KP s věkem:

♂ Samci: U všech měřených fenotypů VZRŮSTÁ ABSOLUTNÍ i RELATIVNÍ obsah KP s věkem

♀ Samice:

- a. Diapauza - NEMĚNÍ se ABSOLUTNÍ ani RELATIVNÍ obsah KP
- b. Alatektomie - VZRŮSTÁ ABSOLUTNÍ, ale ne RELATIVNÍ obsah KP
- c. Reprodukce - VZRŮSTÁ ABSOLUTNÍ i RELATIVNÍ obsah KP

- Obsah karbonylovaných proteinů u starších jedinců je různý u samců a samic různě dlouhověkých fenotypů:

♂ Samci: Množství KP je podobné u všech zkoumaných fenotypů

♀ Samice:

- a. Diapauza – nízký RELATIVNÍ i ABSOLUTNÍ obsah KP
- b. Alatektomie – nízký RELATIVNÍ obsah, ale vysoký ABSOLUTNÍ obsah KP
- c. Reprodukce – vysoký RELATIVNÍ i ABSOLUTNÍ obsah KP

3. Srovnání pohybové aktivity u různě stárnoucích fenotypů

- Diapauza u samců a samic SNIŽUJE intenzitu pohybové aktivity
- Alatektomie samců i samic ZVYŠUJE sílu rytmu pohybové aktivity

4. Srovnání pohybové aktivity a obsahu karbonylovaných proteinů v hrudních svalech ploštic u různě stárnoucích fenotypů

♀ RELATIVNÍ obsah KP samic: NENÍ korelace s lokomoční aktivitou

♀ ABSOLUTNÍ obsah KP samic: ZJIŠTĚNA korelace s lokomoční aktivitou

♂ U samců NENÍ vztah mezi intenzitou pohybové aktivity a RELATIVNÍM ani ABSOLUTNÍM obsahem KP

Výsledky jednoznačně nepodporují hypotézu, že prodloužení života souvisí se snížením pohybové aktivity a množstvím karbonylovaných proteinů v hrudních svalech plošnice. Rozdílné výsledky jsme získali u samců a samic. Zásahy, které prodlužují život (alatektomie a diapauza) mají odlišné důsledky na pohybovou aktivitu a množství karbonylovaných proteinů. Pouze u diapauzních samic souvisela zvýšená dlouhověkost jak se sníženou pohybovou aktivitou, tak s obsahem karbonylovaných proteinů.

7 LITERATURA

- Agarwal, S., and Sohal, R.S., 1993. Relationship between aging and susceptibility to protein oxidative damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 194 (3): 1203-1206.
- Andziak, B., O'Connor, T.P., Qi, W., DeWaal, E.M., Pierce, A., Chaudhuri, A.R., Van Remmen, H., and Buffenstein, R., 2006. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell* 5 (6): 463-471.
- Antebi, A., Yeh, W.-H., Tait, D., Hedgecock, E.M., and Riddle, D.L., 2000. Daf-12 encodes a nuclear receptor that regulates the Dauer diapause and developmental age in *C. elegans*. *Genes & Development* 14 (12): 1512-1527.
- Arantes-Oliveira, N., Apfeld, J., Dillin, A., and Kenyon, C., 2002. Regulation of life-span by germ-line stem cells in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 295 (5554): 502-505.
- Arantes-Oliveira, N., Berman, J.R., and Kenyon, C., 2003. Healthy animals with extreme longevity. *Science* 302 (5645): 611-611.
- Arbeitman, M.N., and Hogness, D.S., 2000. Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell* 101 (1): 67-77.
- Ashok, M., Turner, Ch., and Wilson, T.G., 1998. Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (6): 2761-2766.
- Avery, S., 2011. Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal* 434: 201–210.
- Barnes, A.I., Boone, J.M., Jacobson, J., Partridge, L., and Chapman, T., 2006. No extension of lifespan by ablation of germ line in *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273 (1589): 939-947.
- Bartke, A., 2011. Growth hormone, insulin and aging: The benefits of endocrine defects. *Experimental Gerontology* 46 (2–3): 108-111.

- Berlett, B.S., and Stadtman, E.R., 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* 272 (33): 20313 -20316.
- Bjorksten, J., 1968. Crosslinkage theory of aging. *Journal of American Geriatric Society* 16: 408-27
- Blazkova, H., Provaznik, J., and Hodkova, M., 2011. Novel roles for the corpus allatum hormone in the cost of sexual interactions in the linden bug *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Insect Physiology* 57 (4): 529-535.
- Bluher, M., Kahn, B.B., and Kahn, C.R., 2003. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299 (5606): 572-574.
- Bollenbacher, W.E., Agui, N., Granger, N.A., and Gilbert, L.I., 1979. In Vitro activation of insect prothoracic glands by the prothoracicotropic hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76 (10): 5148-5152.
- Boveris, A., and Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal* 134 (3): 707-716.
- Broughton, S.J., Piper, M.D.W., Ikeya, T., Bass, T.M., Jacobson, J., Drieger, Y., Martinez, P., et al., 2005. Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (8): 3105-3110.
- Brown-Borg, H.M., Borg, K.E., Meliska, Ch.J., and Bartke, A., 1996. Dwarf mice and the ageing process. *Nature* 384 (6604): 33.
- Carney, G.E, and Bender, M., 2000. The *Drosophila* ecdysone receptor (EcR) gene is required maternally for normal oogenesis. *Genetics* 154 (3): 1203-1211.
- Clancy, D.J., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., Leivers, S.J., and Partridge, L., 2001. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 292 (5514): 104 -106.
- Cornelius, E. A., 1972. Increased incidence of lymphomas in thymectomized mice - evidence for an immunological theory of aging. *Experientia* 28 (4): 459-459.

- Corona, M., Velarde, R.A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K.A., and Robinson, G.E., 2007. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (17): 7128-7133.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., and Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329 (1-2): 23-38.
- Danks, H.V., 1987. *Insect Dormancy: an Ecological Perspective*. Biological Survey of Canada, Ottawa.
- Diaz-Albiter, H., Mitford, R., Genta, F.A., Sant'Anna, M.R.V., and Dillon, R.J., 2011. *Plos One* 6 (3): e17486.
- Dillin, A., Crawford, D.K., and Kenyon, C., 2002. Timing requirements for insulin/IGF-1 signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298 (5594): 830-834.
- Dreyfus, J.C., Kahn, A., and Schapira, F., 1978. Posttranslational modifications of enzymes. *Current Topics in Cellular Regulation* 14: 243-297.
- Dröge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82 (1): 47 -95.
- Dubrovsky, E.B., 2005. Hormonal cross talk in insect development. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 16 (1): 6-11.
- Dubrovsky, E.B., Dubrovskaya, V.A., and Berger, E.M., 2004. Hormonal regulation and functional role of *Drosophila* E75A orphan nuclear receptor in the juvenile hormone signaling pathway. *Developmental Biology* 268 (2): 258-270.
- Dukan, S., Farewell, A., Ballesteros, M., Taddei, F., Radman, M., and Nyström, T., 2000. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (11): 5746 -5749.
- Dunlop, R.A., Brunk, U.T., and Rodgers, K.J., 2009. Oxidized proteins: Mechanisms of removal and consequences of accumulation. *Life* 61 (5): 522-527.

- Esterbauer, H., Schaur, R.J., and Zollner, H., 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine* 11 (1): 81-128.
- Facchini, F.S., Hua, N., Abbasi, F., and Reaven, G.M., 2001. Insulin resistance as a predictor of age-related diseases. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 (8): 3574-3578.
- Finkel, T., 2003. Oxidant signals and oxidative stress. *Current Opinion in Cell Biology* 15 (2): 247-254.
- Finkel, T., and Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408 (9): 239-247.
- Flatt, T., and Kawecki, T.J., 2004. Pleiotropic effects of *methoprene-tolerant*(*Met*), a gene involved in juvenile hormone metabolism, on life history traits in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 122 (2): 141-160.
- Flatt, T., Min, K.-J., D'Alterio, C., Villa-Cuesta, E., Cumbers, J., Lehmann, R., Jones, D.L., and Tatar, M., 2008. *Drosophila* germ-line modulation of insulin signaling and lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (17): 6368-6373.
- Flurkey, K., Papaconstantinou, J., Miller, R.A., and Harrison, D.E., 2001. Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (12): 6736-6741.
- Friguet, B., Stadtman, E.R., and Szweda, L.I., 1994. Modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Formation of cross-linked protein that inhibits the multicatalytic protease. *Journal of Biological Chemistry* 269 (34): 21639-21643.
- Garrison, W.M., 1987. Reaction mechanisms in the radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chemical Reviews* 87 (2): 381-398.
- Gems, D., Sutton, A.J., Sundermeyer, M.L., Albert, P.S., King, K.V., Edgley, M.L., Larsen, P.L., and Riddle, D.L., 1998. Two pleiotropic classes of *Daf-2* mutation affect larval

- arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 150 (1): 129-155.
- Gensler, H.L., and Bernstein, H., 1981. DNA damage as the primary cause of aging. *The Quarterly Review of Biology* 56 (3): 279-303.
- Gershman, B., Puig, O., Hang, L., Peitzsch, R.M., Tatar, M., and Garofalo, R.S., 2007. High-resolution dynamics of the transcriptional response to nutrition in *Drosophila*: A key role for dFOXO. *Physiological Genomics* 29 (1): 24-34.
- Giannakou, M. E., Goss, M., Jünger, M.A., Hafen, E., Leevers, S.J., and Partridge, L., 2004. Long-lived *Drosophila* with overexpressed dFOXO in adult fat body. *Science* 305 (5682): 361-361.
- Giannakou, M.E., and Partridge, L., 2007. Role of insulin-like signalling in *Drosophila* lifespan. *Trends in Biochemical Sciences* 32 (4): 180-188.
- Gilbert, L.I., Rybczynski, R., and Warren, J.T., 2002. Control and biochemical nature of the ecdysteroidogenic pathway. *Annual Review of Entomology* 47 (1): 883-916.
- Guarente, L., and Kenyon, C., 2000. Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408: 255-262.
- Halliwell, B., 2000. The antioxidant paradox. *The Lancet* 355 (9210): 1179–1180.
- Harman, D., 2002. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Science of Aging Knowledge Environment* 2002 (37): 14.
- Hartfelder, K., 2000. Insect juvenile hormone: from ‘status quo’ to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33 (2): 157-177.
- Van Heemst, D., Beekman, M., Mooijaart, S.P., Heijmans, B.T., Brandt, B.W., Zwaan, B.J., Slagboom, P.E., and Westendorp, R.G.J., 2005. Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging Cell* 4 (2): 79-85.
- Henderson, S.T., and Johnson, T.E., 2001. daf-16 integrates developmental and environmental inputs to mediate aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Current Biology* 11 (24): 1975-1980.

- Herman, W.S., 1985. Hormonally mediated events in adult monarch butterflies. In: *Migration: mechanisms and adaptive significance* 27: 799-815, Austin, TX: University of Texas Marine Sciences Institute.
- Herrero, A., and G Barja, 1998. H₂O₂ production of heart mitochondria and aging rate are slower in canaries and parakeets than in mice: sites of free radical generation and mechanisms involved. *Mechanisms of Ageing and Development* 103 (2): 133–146.
- Hill, R.W., Wyse, G.A., and Anderson, M., 2008. *Animal Physiology*, Second Edition, Sinauer Associates, Inc.
- Hodkova, M., 1976. Nervous inhibition of corpora allata by photoperiod in *Pyrrhocoris apterus*. *Nature* 263 (5577): 521-523.
- Hodkova, M., 2008. Tissue signaling pathways in the regulation of life-span and reproduction in females of the linden bug, *Pyrrhocoris apterus*. *Journal of Insect Physiology* 54 (2): 508-517.
- Hodková, M., Berková, P., and Zahradníčková, H., 2002. Photoperiodic regulation of the phospholipid molecular species composition in thoracic muscles and fat body of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) via an endocrine gland, corpus allatum. *Journal of Insect Physiology* 48 (11): 1009–1019.
- Hodkova, M., Okuda, T., and Wagner, R., 2001. Regulation of corpora allata in females of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) (A mini-review). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 37 (9): 560-563.
- Holloszy, J.O., Smith, E.K., Vining, M., and Adams, S., 1985. Effect of voluntary exercise on longevity of rats. *Journal of Applied Physiology* 59 (3): 826-831.
- Holzenberger, M., Dupont, J., Ducos, B., Leneuve, P., Géløën, A., Even, P.C., Cervera, P., and Le Bouc, Y., 2002. IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421 (6919): 182-187.
- Hsin, H., and Kenyon, C., 1999. Signals from the reproductive system regulate the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 399 (6734): 362-366.

- Hulbert, A.J., Clancy, D.J., Mair, W., Braeckman, B.P., Gems, D., and Partridge, L., 2004. Metabolic rate is not reduced by dietary-restriction or by lowered insulin/IGF-1 signalling and is not correlated with individual lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology* 39 (8): 1137-1143.
- Hwangbo, D.S., Gersham, B., Tu, M.-P., Palmer, M., and Tatar, M., 2004. *Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body. *Nature* 429 (6991): 562-566.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* 59 (3): 527 -605.
- Charles, J.-P., Iwema, T., Epa, V.Ch., Takaki, K., Rynes, J., and Jindra, M., 2011. Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, methoprene-tolerant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (52): 21128-21133.
- Chawla, A., Repa, J.J., Evans, R.M., and Mangelsdorf, D.J., 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: Opening the X-files. *Science* 294 (5548): 1866-1870.
- Ji, L., 1995. Oxidative Stress During Exercise: Implication of Antioxidant Nutrients. *Free Radical Biology and Medicine* 18 (6): 1079–1086.
- Jia, K., Albert, P.S., and Riddle, D.L., 2002. DAF-9, a cytochrome P450 regulating *Caenorhabditis elegans* larval development and adult longevity. *Development* 129 (1): 221-231.
- Jin, K., 2010. Modern biological theories of aging. *Aging and Disease* 1 (2): 72.
- Joly, P., 1968. *Endocrinologie des Insectes. Collection les grands problemes de la biologie* 7. Masson, Paris.
- Kang, M.-A., Mott, T.M., Tapley, E.C., Lewis, E.E., and Luckhart, S., 2008. Insulin Regulates Aging and Oxidative Stress in *Anopheles Stephensi*. *Journal of Experimental Biology* 211 (5): 741–748.
- Kirkwood, T.B.L., 1981. Repair and its evolution: survival versus reproduction. In: Townsend, C.R., Calow, P. (Eds.). *Physiological Ecology: an Evolutionary Approach to Resource Use*. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 165-189.

- Kirwan, J.P., Krishnan, J.K., Weaver, J.A., Del Aguila, L.F., and Evans, W.J., 2001. Human aging is associated with altered TNF- α production during hyperglycemia and hyperinsulinemia. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* 281 (6): E1137-E1143.
- Klowden, M.J., 2007. *Physiological Systems in Insects*. Academic Press.
- Koh, K., Zheng, X., and Sehgal, A., 2006. JETLAG resets the *Drosophila* circadian clock by promoting light-induced degradation of TIMELESS. *Science* 312 (5781): 1809-1812.
- Kozlova, T., and Thummel, C.S., 2000. Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 11 (7): 276-280.
- Kristal, B.S., and Yu, B.P., 1992. An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and maillard reactions. *Journal of Gerontology* 47 (4): B107 -B114.
- Ku, H.-H., Brunk, U.T., and Sohal, R.S., 1993. Relationship between mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide production and longevity of mammalian species. *Free Radical Biology and Medicine* 15 (6): 621-627.
- Kurosu, H., Yamamoto, M., Clark, J.D., Pastor, J.V., Nandi, A., Gurnani, P., McGuinness, O.P., et al. 2005. Suppression of aging in mice by the hormone klotho. *Science* 309 (5742): 1829-1833.
- Larsen, P. L., Albert, P.S., and Riddle, D.L., 1995. Genes that regulate both development and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 139 (4): 1567-1583.
- Lee, B.Ch., Dikiy, A., Kim, H.-Y., and Gladyshev, V.N., 2009. Functions and evolution of selenoprotein methionine sulfoxide reductases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1790 (11): 1471-1477.
- Lee, I.-M., Hsieh, Ch.-Ch., and Paffenbarger, R.S., 1995. Exercise Intensity and Longevity in Men The Harvard Alumni Health Study. *The Journal of the American Medical Association* 273 (15): 1179–1184.
- Levine, R.L., 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology and Medicine* 32 (9): 790-796.

- Lin, J., Wu, H., Tarr, P.T., Zhang, Ch.-Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L.F., et al. 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* 418 (6899): 797-801.
- Loft, S., Astrup, A., Buemann, B., and Poulsen, H.E., 1994. Oxidative DNA Damage Correlates with Oxygen Consumption in Humans. *The FASEB Journal* 8 (8): 534–537.
- Longo, V.D., and Kennedy, B.K., 2006. Sirtuins in aging and age-related disease. *Cell* 126 (2): 257-268.
- López-Torres, M., Romero, M., and Barja, G., 2000. Effect of thyroid hormones on mitochondrial oxygen free radical production and DNA oxidative damage in the rat heart. *Molecular and Cellular Endocrinology* 168 (1–2): 127-134.
- Lyman, C. P., O'Brien, R.C., Greene, G.C., and Papafrangos, E.D., 1981. Hibernation and Longevity in the Turkish hamster *Mesocricetus brandti*. *Science* 212 (4495): 668-670.
- Magwere, T., Pamplona, R., Miwa, S., Martinez-Diaz, P., Portero-Otin, M., D Brand, M., and Partridge, L., 2006. Flight activity, mortality rates, and lipoxidative damage in *Drosophila*. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 61 (2) (February 1): 136-145.
- Mahadev, K., Wu, X., Zilbering, A., Zhu, L., Lawrence, J.T.R., and Goldstein, B.J., 2001. Hydrogen peroxide generated during cellular insulin stimulation is integral to activation of the distal insulin signaling cascade in 3T3-L1 adipocytes. *Journal of Biological Chemistry* 276 (52): 48662-48669.
- Maki, A., Sawatsubashi, S., Ito, S., Shirode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K., and Kato, S., 2004. Juvenile hormones antagonize ecdysone actions through co-repressor recruitment to EcR/USP heterodimers. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 320 (1): 262-267.
- Masoro, E.J., 2005. Overview of caloric restriction and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development* 126 (9): 913-922.

- McCord, J.M., and Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 244 (22): 6049 -6055.
- Medicherla, B., and Goldberg, A.L., 2008. Heat shock and oxygen radicals stimulate ubiquitin-dependent degradation mainly of newly synthesized proteins. *The Journal of Cell Biology* 182 (4): 663-673.
- Medvedev, Z.A., 1990. An attempt at a rational classification of theories of ageing. *Biological Reviews* 65 (3): 375-398.
- Melov, S., Ravenscroft, Malik, S., Gill, M.S., Walker, D.W., Clayton, P.E., Wallace, D.C., Malfroy, B., Doctrow, S.R., and Lithgow, G.J., 2000. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science* 289 (5484): 1567-1569.
- Mizoguchi, A., 2001. Effects of juvenile hormone on the secretion of prothoracicotropic hormone in the last- and penultimate-instar larvae of the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* 47 (7): 767-775.
- Monastirioti, M., 1999. Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microscopy Research and Technique* 45 (2): 106-121.
- Motola, D.L., Cummins, C.L., Rottiers, V., Sharma, K.K., Li, T., Li, Suino-Powell, K., et al., 2006. Identification of ligands for DAF-12 that govern dauer formation and reproduction in *Caenorhabditis elegans*. *Cell* 124 (6): 1209-1223.
- Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., and Van Remmen, H., 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology and Medicine* 43 (4): 477-503.
- Murphy, C.T., McCarroll, S.A., Bargmann, C.I., Fraser, A., Kamath, R.S., Ahringer, J., Li, H., Kenyon, C., and others, 2003. Genes That Act Downstream of DAF-16 to Influence the Lifespan of *Caenorhabditis Elegans*. *Nature* 424 (6946): 277-283.
- Nemec, V., 1981. Effect of different hormonal conditions on saccharide metabolism in various organs of adult *Pyrrhocoris apterus*. *Acta Entomologica Bohemoslovaca* 78: 145-151.
- Nijhout, H., 1994. *Insect Hormones*, Princeton, NJ: Princeton University Press.

- Nyström, T., 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO Journal* 24 (7): 1311–1317.
- Ooka, H., Fujita, S., and Yoshimoto, E., 1983. Pituitary-thyroid activity and longevity in neonatally thyroxine-treated rats. *Mechanisms of Ageing and Development* 22 (2): 113-120.
- Pan, M., Maitin, V., Parathath, S., Andreo, U., Lin, S.X., St. Germain, C., Yao, Z., Maxfield, F.R., Williams, K.J., and Fisher, E.A., 2008. Presecretory oxidation, aggregation, and autophagic destruction of apoprotein-B: A pathway for late-stage quality control. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (15): 5862 -5867.
- Partridge, L., 2010. Some highlights of research on aging with invertebrates. *Aging Cell* 10 (1): 5–9.
- Partridge, L., and Bruning, J.C., 2008. Forkhead transcription factors and ageing. *Oncogene* 27 (16): 2351-2363.
- Pearl, R., 1928. *Rate of Living*. University of London Press, London.
- Pener, M.P., 1972. The corpus allatum in adult acridids: the inter-relation of its functions and possible correlations with life cycle. In: Hemming C.F., Taylor, T.H.C. (Eds.), *Proceedings of the International Study Conference on the Current and Future Problems of Acridology*. Centre for Overseas Pest Research, London, pp. 135-147.
- Pener, M.P., 1992. Environmental cues, endocrine factors, and reproductive diapause in male insects. *Chronobiology International* 9 (2): 102-113.
- Pérez, V.I., Bokov, A., Remmen, H.V., Mele, J., Ran, Q., Ikeno, Y., and Richardson, A., 2009. Is the Oxidative Stress Theory of Aging Dead? *Biochimica Et Biophysica Acta -General Subjects* 1790 (10): 1005–1014.
- Prinzinger, R., 2005. Programmed ageing: the theory of maximal metabolic scope. *EMBO Reports* 6 (S1): S14-S19.
- Promislow, D.E.L., and Haselkorn, T.S., 2002. Age-specific Metabolic Rates and Mortality Rates in the Genus *Drosophila*. *Aging Cell* 1 (1): 66–74.

- Puig, O., and Tjian, R., 2005. Transcriptional feedback control of insulin receptor by dFOXO/FOXO1. *Genes & Development* 19 (20): 2435-2446.
- Puig, O., Marr, M.T., Ruhf, M., and Tjian, R., 2003. Control of cell number by Drosophila FOXO: Downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes & Development* 17 (16): 2006-2020.
- Van Raamsdonk, J.M., and Hekimi, S., 2009. Deletion of the Mitochondrial Superoxide Dismutase Sod-2 Extends Lifespan in Caenorhabditis Elegans. *PLoS Genet* 5 (2): e1000361.
- Refinetti, R., 2000. *Circadian Physiology*. CRC Press, Boca Raton, 184.
- Riddiford, L.M., Hiruma, K., Zhou, X., and Nelson, Ch.A., 2003. Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from Manduca sexta and Drosophila melanogaster. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33 (12): 1327-1338.
- Roberts, R.A., Laskin, D.L., Smith, Ch.V., Robertson, F.M., Erin, Allen, M.G., Doorn, J.A., and Slikker, W., 2009. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicological Sciences* 112 (1): 4 -16.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M., and Puigserver, P., 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 434 (7029): 113-118.
- Rogina, B., Helfand, S.L., and Frankel, S., 2002. Longevity regulation by Drosophila Rpd3 deacetylase and caloric restriction. *Science* 298 (5599): 1745-1745.
- Russell, S.J., and Kahn, C.R., 2007. Endocrine regulation of ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (9): 681-691.
- Salmon, A.B., Marx, D.B., and Harshman, G.H., 2001. A cost of reproduction in Drosophila melanogaster: Stress susceptibility. *Evolution* 55 (8): 1600-1608.
- Samuels, A., 1956. The effect of sex and allatectomy on the oxygen consumption of the thoracic musculature of the insect Leucophaea maderae. *Biological Bulletin, Woods Hole* 110: 179-183.

- Shmookler, R., Robert, J., Xu, L., Lee, H., Chae, M., Thaden, J.J., Bharill, P., Tazearslan, C., et al. 2011. Modulation of Lipid Biosynthesis Contributes to Stress Resistance and Longevity of *C. Elegans* Mutants. *Aging (Albany NY)* 3 (2): 125–147.
- Schwartz, M.W., Woods, S.C., Porte, D., Seeley, R.J., Baskin, D.G., 2000. Central nervous system control food intake. *Nature* 404: 661.
- Sim, Ch. and Denlinger, D.L., 2011. Catalase and superoxide dismutase-2 enhance survival and protect ovaries during overwintering diapause in the mosquito *Culex pipiens*. *Journal of Insect Physiology* 57: 628-634.
- Simon, A.F., Shih, C., Mack, A., and Benzer, S., 2003. Steroid control of longevity in *Drosophila melanogaster*. *Science* 299 (5611): 1407 -1410.
- Sláma, K., 1964 (a). Hormonal control of respiratory metabolism during growth, reproduction, and diapause in male adults of *Pyrrhocoris apterus* L. (Hemiptera). *The Biological Bulletin* 127 (3): 499 –510.
- Sláma, K., 1964 (b). Hormonal control of respiratory metabolism during growth, reproduction, and diapause in female adults of *Pyrrhocoris apterus* L. (Hemiptera). *Journal of Insect Physiology* 10 (2): 283-303.
- Sláma, K., 1965. Effect of hormones on growth and respiratory metabolism in the larvae of *Pyrrhocoris apterus* L. (Hemiptera). *Journal of Insect Physiology* 11 (2): 113–122.
- Sohal, R.S., 2002. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology and Medicine* 33 (1): 37-44.
- Sohal, R.S., and Weindruch, R., 1996. Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science* 273 (5271): 59 -63.
- Sohal, R.S., Agarwal, S., Dubey, A., and Orr, W.C., 1993a. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (15): 7255 -7259.
- Sohal, R.S., Agarwal, S., Dubey, A., and Orr, W.C., 1993b. Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (15): 7255-7259.

- Socha, R., and Šula, J., 2008. Regulation of the development of flight muscles in long-winged adults of the flightless bug, *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera: Pyrrhocoridae). *Eur. J. Entomol* 105 (4): 575–583.
- Socha, R., and Zemek, R., 2000. Locomotor activity in adult *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera) in relation to sex, physiological status and wing dimorphism. *Physiological Entomology* 25 (4): 383-389.
- Speakman, J.R., 2005. Body size, energy metabolism and lifespan. *Journal of Experimental Biology* 208 (9): 1717-1730.
- Speakman, J.R., 2005. Correlations Between Physiology and Lifespan – Two Widely Ignored Problems with Comparative Studies. *Aging Cell* 4 (4): 167–175.
- Stadtman, E.R., 1990. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine* 9 (4): 315-325.
- Stadtman, E.R., 1992. Protein oxidation and aging. *Science* 257 (5074): 1220 -1224.
- Stadtman, E.R., and Levine, R.L., 2000. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 899 (1): 191–208.
- Stearns, S. C., Ackermann, M., Doebeli, M., and Kaiser, M., 2000. Experimental evolution of aging, growth, and reproduction in fruitflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (7): 3309-3313.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., and Brand, M.D., 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *Journal of Biological Chemistry* 277 (47): 44784-44790.
- Sullivan, A.A., and Thummel, C.S., 2003. Temporal profiles of nuclear receptor gene expression reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development. *Molecular Endocrinology* 17 (11): 2125-2137.
- Sun, J., and Tower, J., 1999. FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Molecular and Cellular Biology* 19 (1): 216-228.

- Sun, L.Y., Steinbaugh, M.J., Masternak, M.M., Bartke, A., and Miller, R.A., 2009. Fibroblasts from long-lived mutant mice show diminished ERK1/2 phosphorylation but exaggerated induction of immediate early genes. *Free Radical Biology and Medicine* 47 (12): 1753-1761.
- Suzuki, Y.J., Forman H.J., and Sevanian, A., 1997. Oxidants as Stimulators of Signal Transduction. *Free Radical Biology and Medicine* 22 (1-2): 269–285.
- Tatar, M., and Yin, C.-M., 2001. Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Experimental Gerontology* 36 (4–6): 723-738.
- Tatar, M., Bartke, A., and Antebi, A., 2003. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299 (5611): 1346 -1351.
- Tatar, M., Khazaeli, A.A., and Curtsinger, J.W., 1997. Chaperoning extended life. *Nature* 390 (6655): 30-30.
- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.-P., Yin, C.-M., and Garofalo, R.S., 2001. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 292 (5514): 107-110.
- Thummel, C.S., 2001. Molecular mechanisms of developmental timing in *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila*. *Developmental Cell* 1 (4): 453-465.
- Thummel, C.S., 2002. Ecdysone-regulated puff genes 2000. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32 (2): 113-120.
- Truman, J. W., 1972. Physiology of insect rhythms I. Circadian organization of the endocrine events underlying the moulting cycle of larval tobacco hornworms. *Journal of Experimental Biology* 57 (3): 805-820.
- Truman, J.W., Riddiford, L.M., and Safranek, L., 1974. Temporal patterns of response to ecdysone and juvenile hormone in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Developmental Biology* 39 (1): 247-262.

- Tsai, Ch.-Ch., Kao, H.-Y., Yao, T.-P., McKeown, M., and Evans, R.M., 1999. SMRTER, a *Drosophila* nuclear receptor coregulator, reveals that EcR-mediated repression is critical for development. *Molecular Cell* 4 (2): 175-186.
- Tu, M.-P., Epstein, D., and Tatar, M., 2002. The demography of slow aging in male and female *Drosophila* mutant for the insulin-receptor substrate homologue chico. *Aging Cell* 1 (1): 75-80.
- Tu, M.P., Flatt, T., Tatar, M., 2006. Juvenile and steroid hormones in *Drosophila melanogaster* longevity. In: Masoro, E.J., Austad, S.N., editors. *Handbook of the Biology of Aging* (6th Edition). San Diego, Academic Press (Elsevier).
- Tu, M.-P., Yin, Ch.-M., and Tatar, M., 2005. Mutations in insulin signaling pathway alter juvenile hormone synthesis in *Drosophila melanogaster*. *General and Comparative Endocrinology* 142 (3): 347-356.
- Turrens, J.F., 1997. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience reports* 17 (1): 3–8.
- Vergara, M., Smith-Wheelock, M., Harper, J.M., Sigler, R., and Miller, R.A., 2004. Hormone-treated snell dwarf mice regain fertility but remain long lived and disease resistant. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 59 (12): 1244-1250.
- Van Voorhies, W.A., 2001. Metabolism and lifespan. *Experimental Gerontology* 36: 55-64.
- Van Voorhies, W.A., Khazaeli A.A., and Curtsinger, J.W., 2004. Testing the ‘Rate of Living’ Model: Further Evidence That Longevity and Metabolic Rate Are Not Inversely Correlated in *Drosophila Melanogaster*. *Journal of Applied Physiology* 97 (5): 1915–1922.
- Wegener, G., 1996. Flying insects: model systems in exercise physiology. *Cellular and Molecular Life Sciences* 52 (5): 404–412.
- Weinert, B.T., and Timiras, P.S., 2003. Invited review: theories of aging. *Journal of Applied Physiology* 95 (4): 1706.

- Weismann, A., 1882. *Studies in the Theory of Descent*, S. Low, Marston, Searle & Rivington.
- Wyatt, G.R., 1997. Juvenile hormone in insect reproduction - paradox? *European Journal of Entomology* 94: 323-333.
- Xu, Y.Ch., Wu, R.F., Gu, Y., Yang, Y.-S., Yang, M.-Ch., Nwariaku, F.E., and Terada, L.S., 2002. Involvement of TRAF4 in oxidative activation of c-Jun N-terminal kinase. *Journal of Biological Chemistry* 277 (31): 28051 -28057.
- Yan, L.-J., and Sohal, R.S., 2000. Prevention of flight activity prolongs the life span of the housefly, *Musca domestica*, and attenuates the age-associated oxidative damage to specific mitochondrial proteins. *Free Radical Biology and Medicine* 29 (11): 1143-1150.
- Yan, L.-J., Levine, R.L., and Sohal, R.S., 1997. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (21): 11168 -11172.
- Yui, R., Ohno, Y., and Matsuura, E.T., 2003. Accumulation of deleted mitochondrial DNA in aging *Drosophila melanogaster*. *Genes & Genetic Systems* 78 (3): 245-251.
- Zera, A.J., Cisper, G., 2001. Genetic and Diurnal Variation in the juvenile hormone titer in a wing-polymorphic cricket: implications for the evolution of life histories and dispersal. *Physiological and Biochemical Zoology* 74 (2): 293-306.
- Zimniak, P., 2008. Detoxification reaction: relevance to aging. *Aging Research Reviews* 7 (4): 281-300.