

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Aktivita telomerázy u termita *Prorhinotermes simplex***

Diplomová práce

**Bc. Tomáš Jehlík**

Školitelka: RNDr. Radmila Čapková Frydrychová, Ph.D.

České Budějovice 2017

Jehlík, T., 2017: Aktivita telomerázy u termita *Prorhinotermes simplex*. [Telomerase activity in the termite *Prorhinotermes simplex*. MSc. Thesis, in Czech.] –34p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

Social insect is known for its unique caste system, coherence and effective division of labor, but also for the extreme longevity of reproductive individuals in comparison with asexual castes. Although mechanisms leading to lifespan differences between reproductive and non-reproductive castes of social insects are not sufficiently explained, one of the longevity determinants might be telomere length and activity of telomerase as the most common mechanism of telomere length maintenance. Telomere length belongs to general indicators of organismal lifespan. This work is focused on monitoring of telomerase activity in various stages, castes and organs of the termite *Prorhinotermes simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae) showing up-regulation of telomerase in reproductive castes.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval 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 12. 12. 2017

Tomáš Jehlík

## **Poděkování**

V první řadě bych rád poděkoval své školitelce RNDr. Radmile Čapkové Frydrychové, Ph.D., která mě zasvětila do tajů práce v laboratoři, za její cenné rady, trpělivost a ochotu, kterou mi během vypracovávání diplomové práce věnovala. Dále Mgr. Robertu Hanusovi, Ph.D. a celému jeho týmu za výbornou spolupráci a pomoc při vzniku této práce. Velké poděkování patří také Justině a celému kolektivu naší laboratoře za pomoc při laboratorní práci. V neposlední řadě bych rád poděkoval své rodině a přátelům za podporu během celého studia.

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod.....</b>	<b>1</b>
1.1	Teorie stárnutí.....	1
1.2	Objev telomer .....	3
1.3	Telomery a telomeráza – jejich struktura a funkce.....	4
1.4	Jak souvisí telomeráza s dlouhověkostí? .....	5
1.5	Dlouhověkost sociálního hmyzu a aktivita telomerázy.....	6
1.6	Eusocialita a kastovní systém termitů .....	7
1.7	Systematika termitů .....	8
1.8	Kastovní uspořádání termitů.....	9
1.9	Životní strategie termitů .....	10
1.10	<i>Prorhinotermes simplex</i> (Rhinotermitidae: Prorhinotermitinae).....	13
1.11	Diferenciace kast a vliv hormonů a feromonů.....	14
<b>2</b>	<b>Cíle práce .....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>Metodika .....</b>	<b>15</b>
3.1	Původ vzorků.....	15
3.2	Stimulace dělníků (pseudergátů) k rozvoji ve vojáky či neoteniky .....	15
3.3	Příprava proteinových extraktů .....	16
3.4	Kvantifikace proteinů .....	16
3.5	TRAP – telomere repeat amplification protocol.....	16
3.6	Statistické vyhodocení.....	17
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>17</b>
4.1	Aktivita telomerázy u kolonií vedených neotenickým vs. primárním párem.....	17
4.2	Aktivita telomerázy u larev .....	20
4.3	Aktivita telomerázy u neoteniků různého stáří.....	21
4.4	Aktivita telomerázy u vojáků různého stáří.....	22
4.5	Aktivita telomerázy v jednotlivých orgánech.....	23

<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>27</b>
<b>7</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>28</b>

# 1 Úvod

Na světě najdeme zhruba 15 000 druhů společenského (eusociálního) hmyzu, 10 000 druhů tvoří mravenci, 3 000 termity a zbytek čmeláci, vosy a některé skupiny včel, třásněnek a mšic (Hölldobler and Edwadr 1997). Společenský hmyz se vyznačuje kastovním systémem, který nemá u ostatních organizmů obdoby. Tento hmyz není zajímavý jen svým jedinečným kastovním uspořádáním, vzájemnou soudržností a efektivní dělbu práce, ale v některých případech také extrémní dlouhověkostí pohlavních jedinců ve srovnání s jedinci nepohlavních kast, zejména pak u královen sociálně pokročilých zástupců mravenců, eusociálních včel (včetně včely medonosné) nebo králů a královen termitů. I když mechanismy dlouhověkosti pohlavních kast společenského hmyzu nejsou dosud dostatečně vysvětleny, jako jedna z determinant dlouhověkosti u těchto jedinců může být podle některých teorií délka telomer a mechanismy, které tuto délku ovlivňují. Telomery totiž patří k obecným ukazatelům teoretické délky života jedince.

Tato práce, která se zaměřuje na aktivitu telomerázy v různých stádiích, kastách a orgánech termity *Prorhinotermes simplex* (Isoptera: Rhinotermitidae), vznikla na základě spolupráce mezi Entomologickým ústavem AV ČR v Českých Budějovicích (tým vedený Dr. Radmilou Čapkovou Frydrychovou) a týmem Dr. Roberta Hanuse z Ústavu organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky.

## 1.1 Teorie stárnutí

Otázky stárnutí, délky života a jeho příčin a omezení nebyly zatím dostatečně vysvětleny a přes celou řadu teorií a hypotéz se názory vědců na proces stárnutí různí. Obecně je biologická senescence vnímána jako věkově specifický pokles fyziologického stavu a kondice (Bonsall 2006). Délka života se neliší jen mezi jednotlivými druhy, ale i mezi jedinci stejného druhu. Toto zjištění vedlo ke stanovení termínu tzv. „biologický věk“, který zohledňuje zdravotní stav jedince v kontextu jeho životního prostředí a celkové životosprávy. Tento věk se liší od tzv. „chronologického věku“, který je založen na skutečném stáří konkrétního jedince (Klemera and Doubal 2006, Hayward et al. 2009). Většina teorií, které se snaží vysvětlit proces stárnutí, se shoduje, že druhově specifická

délka života není zřejmě jen pasivním výsledkem působení vnějších a vnitřních faktorů, ale jde o poměrně jemně regulovaný proces (Stearns 1992, Kirkwood 2005).

Jednou z vlivných evolučních teorií stárnutí je *Teorie antagonistické pleiotropie*, která předpokládá, že přirozený výběr upřednostňuje geny, které jsou pro daný organismus prospěšné v rané fázi života, a to navzdory tomu, že v pozdějším věku tyto geny urychlují proces stárnutí a přispívají tak k zániku daného organismu (Medawar 1952). Tato teorie ale naráží na problém, že neexistuje příliš jasných příkladů antagonisticky pleiotropních genů, které by ji potvrdily (Blagosklonny 2010). Druhá významná teorie, tj. teorie akumulace mutací, tvrdí, že proces stárnutí mohou urychlovat škodlivé mutace, které se v průběhu života v genomu postupně hromadí, nicméně projevují se až v postreprodukčním věku a nejsou tedy vystaveny přímému působení přírodního výběru. Další z teoretických konceptů je založen na předpokladu, že účinná reprodukce si konkuruje s udržováním somatických tkání, tedy že investice do rozmnožení jde na úkor somatické údržby a tím urychluje proces stárnutí (*Disposable soma*) (Medawar 1952, Kirkwood and Rose 1991). Souhrnně lze ovšem konstatovat, že tyto tři tradiční teorie se ve svých závěrech shodují v tom, že stárnutí vyplývá z adaptivní rovnováhy mezi rychlostí poškození těla a procesy, které naopak tělo „opravují“ a udržují.

Vedle evolučních teorií stárnutí existuje široká paleta tzv. funkčních teorií, které se zaměřují na konkrétní potenciální fenomény stárnutí, jako je např. poškození buněk, které mohou ovlivňovat rychlost stárnutí, a tím i rozdíl mezi skutečným „chronologickým“ a „biologickým“ věkem jedince. Snad nejznámější teorií je *Teorie volných kyslíkových radikálů*, která předpokládá, že tělo stárne následkem buněčných a tkáňových poškození způsobených volnými radikály. Volné radikály jsou obecně molekuly či atomy, které obsahují volné nepárové elektrony. Jsou proto značně reaktivní, reagují s okolními molekulami biologických systémů a tím poškozují jejich strukturu a funkčnost (Harman 2009). Volné kyslíkové radikály vznikají v organismu buď jako vedlejší produkty metabolismu, zejména buněčného dýchání, či jsou produkovány cíleně, např. v rámci procesu detoxikace xenobiotik cytochromem P450 či bílými krvinkami pro zneškodnění přítomných patogenů (Goepfert et al. 1995). Za normálních okolností je hladina volných radikálů udržována na optimální fyziologické úrovni, a to prostřednictvím antioxidačních mechanismů, jakými jsou především aktivita katalázy či superoxid dismutázy (Ross 1988). Stav, kdy hladina volných kyslíkových radikálů převyšuje kapacitu antioxidačních mechanismů, je označován jako oxidační stres (Mittler 2002). Teorie volných kyslíkových

radikálů byla zdokonalena *Teorií oxidačního stresu a Pacemakerovou teorií* „genetických hodin“. Tyto teorie naznačují, že oxidační stres je zdrojem kumulativních poškození buněk v čase (Weber 2000, Hulbert 2003). Tyto mechanismy poskytují vysvětlení i pro kdysi populární teorii *The rate of living*, která předpokládá, že čím rychlejší je metabolismus, tak tím je kratší doba života (Fontana and Partridge 2015). Stejně tak podporují i hypotézu, která předpokládá, že snížení příjmu živin může proces stárnutí zpomalit či zmírnit negativní projevy stárnutí (kalorická restrikce) (Bignell et al. 2014). Příkladem jsou signalizační dráhy inzulinu (IIS) a rapamycinu (Target of rapamycin, TOR), které v návaznosti na hladinu živin regulují buněčnou proliferaci a růst organismu. Snížením aktivity těchto signálních drah v průběhu dospělého věku dochází ke zpomalení procesu stárnutí jak v savcích, tak hmyzích modelových systémech, či v buněčných kulturách (Partridge et al. 2011, Fontana and Partridge 2015). Jak kináza TOR, tak insulinové receptory jsou charakterizovány jako antagonisticky pleiotropní geny neboli také gerogeny, tedy obecně geny podporující stárnutí (Blagosklonny 2010). V souvislosti s aktivitou gerogenů je v literatuře zmiňována teorie, která stárnutí popisuje jako tzv. zdánlivý či quasi-program, podle nějž je senescence dospělého organismu jen negativním přežitkem aktivity gerogenů, které by správně měly být aktivní jen v nedospělém organismu (Blagosklonny 2013). V kontrastu s quasi-programem existuje teorie programovaného stárnutí, která předkládá, že stárnutí je programovaným procesem řízeným postupným zesilováním exprese určitých genů či naopak postupným tlumením genů jiných (Blagosklonny 2010).

Jedním z fenoménů hojně skloňovaných a extenzivně studovaných v souvislosti se stárnutím je délka a údržba nukleoproteinových struktur na koncích eukaryotních chromozomů, tzv. telomer. Ve zkratce řečeno, existuje široká podpora teorie, zejména ze studií na obratlovcích, včetně savců a člověka, že délka života na úrovni buněk a tkání a intenzita projevů stárnutí na úrovni jedince je do jisté míry dána délkou telomer a aktivitou jevů, které jejich délku pozitivně či negativně ovlivňují a regulují.

## 1.2 Objev telomer

Výzkum telomer se v souvislosti s procesy stárnutí a řadou civilizačních onemocnění stal v posledních třech dekadách velmi populárním tématem. Nicméně, zásadní význam telomer z hlediska stability genomu a životaschopnosti buňky byl popsán již mnohem dříve. Již na konci 30. let minulého století si Hermann J. Muller u octomilek (Muller 1928) a



Barbara McCintocková u kukuřice (McClintock 1938) všimli, že se přirozené konce chromozomů chovají jinak než chromozomálních zlomy vyvolané např. rentgenovým zářením. Na rozdíl od přirozených chromozomových konců, které se jevily jako zcela stabilní, chromozomální zlomy vykazovaly vzájemné fúze. Tím Muller dospěl k předpokladu, že se chromozomové konce od vnitřních částí chromozomů liší a pojmenoval konce chromozomů jako telomery z řeckého *telos* – koncový a *meros* – část. Dalším milníkem byl objev Leonarda Hayflicka a Paula Moorheada v roce 1961, kteří zjistili, že normální lidské buňky rostoucí v kultuře se nemohou množit neomezeně, ale bylo záhadou, díky jakému mechanismu buňky „vědí“, jak jsou staré, i když jsou obklopené mladými buňkami. Až s příchodem moderních metod molekulární biologie, které nastartoval objev struktury dvoušroubovice DNA, objasnění mechanismu replikace DNA a především nástup sekvenovacích metod v sedmdesátých letech, bylo možné výzkum konců chromozomů posunout na molekulární úroveň. V té době na scénu přichází Elizabeth Blackburnovou, která spolu s Carol Greiderovou a Jackem Szostakem obdržela v roce 2009 Nobelovu cenu za lékařství a fyziologii za objev telomerázy, tedy enzymu, který telomery syntetizuje. Vzhledem ke zjištění, že vysoká hladina telomerázy u nádorových buněk zajišťuje jejich neomezené dělení a tím nesmrtelnost, a že naopak snížená aktivita telomerázy souvisí s urychleným stárnutím organismu a vznikem řady civilizačních onemocnění (Fajkus and Sýkorová 2010), se stal výzkum telomer a telomerázy jednou z prioritních záležitostí biologie.

### 1.3 Telomery a telomeráza – jejich struktura a funkce

Telomery jsou DNA-proteinové komplexy nacházející se na koncích chromozomů eukaryotních organismů. Většinou se skládají z krátkých telomerických repetitiv, jako je repetice sekvence (TTAGGG)<sub>n</sub> u obratlovců či (TTAGG)<sub>n</sub> u bezobratlých včetně většiny v tomto ohledu prozkoumaných skupin hmyzu (Frydrychova et al. 2004, Korandova and Frydrychova 2016, Mason et al. 2016). Telomery chrání chromozomy proti poškození genomu, a to konkrétně proti degradaci koncových oblastí chromozomů, chromozomálním fúzím nebo případně nevhodné rekombinaci chromozomů. Všechny tyto procesy mohou mít fatální následky a vést k nerovnováze v genetickém obsahu dělících se buněk nebo až ke ztrátě genetické informace (Blackburn 2005).

Významnou funkcí telomer je ochrana proti zkracování chromozomů (Greider, 1997). Běžné DNA polymerázy totiž nejsou schopné úplné replikace konců chromozomů,

čímž s každým cyklem replikace dochází ke zkrácení terminálního konce DNA molekuly (Shay and Wright 2000). Postupné zkracování délky telomerické DNA může fungovat jako tzv. molekulární hodiny udávající počet možných dělení, kterými může daná buňka ještě projít. Pokud telomerická délka je zkrácena až k tzv. Hayflickovu limitu, dochází k zablokování buněčného dělení a nastává stav buněčné senescence, tedy buněčné stárnutí (Olovnikov 1996). Buněčné dělení může být opětovně obnoveno, je-li telomerická délka renovována, a to některým z tzv. telomerických kompenzačních mechanismů. Jedná se o mechanismy, které, v závislosti na proliferačním statusu buňky či vývojovém stádiu organismu, telomery prodlužují a tím buňce umožňují dodatečná buněčná dělení. Nejčastějším kompenzačním mechanismem je aktivita telomerázy (Greider 1996).

Telomeráza se skládá z několika podjednotek, nicméně hlavní podjednotky jsou TERT a TERC. TERT (telomerase reverse transcriptase) nese reverzně transkriptázovou aktivitu, zodpovědnou za samotnou syntézu telomerické DNA. Podjednotka TERC (telomerase RNA component) je tvořena molekulou RNA, která podjednotce TERT slouží jako templát pro syntézu telomerické DNA. Za normálních okolností je aktivita telomerázy přísně regulována a koreluje s proliferací buňky (Flores et al. 2006).

U dospělého člověka je u většiny somatických buněk aktivita telomerázy nulová nebo velmi nízká, aktivita telomerázy zůstává vysoká jen v proliferačně aktivních buňkách, jako jsou např. buňky zárodečné či kmenové (Gomes, Shay, & Wright, 2010). Postupný pokles telomerázové aktivity v průběhu vývoje byl zaznamenán také u zástupce hemimetabolního hmyzu - švába *Periplaneta americana*, s tím, že mezi prvním a posledním vývojovým instarem byl v telomerázové aktivitě pozorován zhruba dvacetinásobný rozdíl. U dospělých švábů byla telomerázová aktivita nejvyšší u gonád (Korandová et al. 2014).

#### **1.4 Jak souvisí telomeráza s dlouhověkostí?**

Pokusy na obratlovcích a člověku dokazují, že díky své přísné vývojové a tkáňově-specifické regulaci je telomeráza spjata s procesem stárnutí (Prowse and Greider 1995). Aktivita telomerázy je vysoká v zárodečné linii a embryonálních buňkách, a naproti tomu je snižována v somatických buňkách v dospělém věku (Sahin and DePinho 2012). Když je telomeráza experimentálně potlačena nebo aktivována, snižuje se či naopak se prodlužuje délka života buněk (Bodnar et al. 1998). Udržování telomer hraje zřejmě roli při signalizaci buněčného stárnutí, ale jak je tomu v rámci celého organismu, nebylo dosud přesně objasněno. Při výzkumu myši, kterým byl pomocí genové terapie exprimován TERT, bylo

zjištěno, že u těchto myší byl prodloužen průměrný věk až o 24 % (Bernardes de Jesus et al. 2012). Zkoumán byl také vliv telomerázy na lidské buňky in vitro, kdy se po transfekci lidské TERT telomery prodloužily a prodloužil se i život daných buněk, a to o 20 replikací ve srovnání s negativní kontrolou, ve které došlo naopak ke zkrácení telomer a senescenci (Bodnar et al. 1998). Rovněž studium telomerické délky u zebřiček ukázalo, že telomerická délka v rané fázi života může sloužit jako ukazatel délky života daného jedince (Heidinger et al. 2012). Udržování telomer hraje zřejmě roli při signalizaci buněčného stárnutí, ale přesné mechanismy na úrovni celého organismu nejsou dosud známy.

## 1.5 Dlouhověkost sociálního hmyzu a aktivita telomerázy

V přírodě běžně platí fenomén, který je v anglické literatuře popisovaný jako „cost of reproduction“ v překladu cena za rozmnožení. Zjednodušeně lze říci, že pokud jedinec investuje do vlastního rozmnožení, tak tím sníží svoji vitalitu a vlastně i délku života. Tento vztah mezi reprodukcí a dlouhověkostí je pozorován u mnoha rozmanitých organismů, ale s jednou podstatnou výjimkou, a to společenským hmyzem. Jedinci schopní reprodukce u sociálního hmyzu dosahují dlouhověkosti bez snížené plodnosti v porovnání s ostatními kastami, které se nerozmnožují (Tasaki et al. 2017). Tento fenomén je velmi dobře zmapován u včel, jejichž královna je schopna vyprodukovat v sezóně až několik tisíc vajíček denně, a přitom v porovnání s dělnicí, která se nerozmnožuje, může žít až 60× déle. U vos a včel se královna dožívá 4-8 let, u termitů a mravenců to může být až neuvěřitelných 30 let života (Carey and Carey 2001). To je více než stonásobek průměrné délky života solitérně žijícího hmyzu (Jemielity et al. 2005). Tento jev, který je v rozporu s tradičním pojetím „cost of reproduction“ naznačuje, že sociální hmyz má vyvinutý mimořádný proti-stárnoucí mechanismus.

Aktivita telomerázy u sociálního hmyzu byla zatím studována jen velmi omezeně. Jedna studie byla provedena u mravenců a její výsledky ukazují velké rozdíly v aktivitě telomerázy mezi krátkověkými samci a dlouhověkými samicemi mravence *Lasius niger*, přičemž mezi královnami a dělníky nebyl rozdíl žádný (Jemielity et al., 2007). U dalšího druhu *Harpegnathos saltator* byly významné rozdíly změřeny v expresi TERT mezi dlouhověkým plodnými dělnicemi a sterilními dělníky (Bonasio et al., 2010). Další nedávná studie provedená v naší laboratoři se zaměřovala na aktivitu telomerázy jednotlivých kast u včely medonosné. Studie prokázala, že v průběhu vývoje dělnic a trubců je telomerázová

aktivita relativně vysoká v embryích a že v dalším vývoji, tedy v průběhu vývoje larvy a kukly, je aktivita telomerázy snížena. Ovšem, v porovnání s dělnicemi a trubci, je telomerázová aktivita zvýšena u královen, a to v jejich larválním stádiu či v dospělém věku v mozku a tukovém tělese (Korandova & Frydrychova, 2016, nepublikované údaje). Na příkladu včely medonosné lze spekulovat o tom, že regulace telomerázy souvisí u sociálního hmyzu s jeho kastovní diferenciací, a tedy s rozdíly v dlouhověkosti mezi reprodukčními a nereprodukčními jedinci. U termitů, tedy hemimetabolního hmyzu s propracovaným kastovním systémem a až extrémními rozdíly v dlouhověkosti, telomerázová aktivita dosud studována nebyla.

## **1.6 Eusocialita a kastovní systém termitů**

Řád termitů (Isoptera) je poměrně malý, čítající něco přes 2800 druhů (Abe et al. 2000). Všechny popsané druhy termitů jsou eusociální s více či méně komplikovaným kastovním systémem. Existence každého individua je úzce provázaná s existencí vysoce organizovaného společenstva. I když společenstvo termitů svou hierarchií a životem zřetelně konverguje s eusociálními společenstvy hmyzu, jako např. se včelami či mravenci z řádu blanokřídlí (Hymenoptera), tak cesta k eusocialitě těchto dvou evolučně velmi vzdálených řádů byla rozdílná (Wilson 1971). Hlavním rozdílem je utváření a regulace polymorfismu, na rozdíl od haplodiploidních blanokřídlých (Hymenoptera) jsou obě pohlaví termitů diploidní (Thorne 1997). Matky a dělnice blanokřídlých jsou diploidní a samci (trubci) jsou haploidní. To znamená, že trubci se rodí z neoplozených vajíček a mají jen jednu sadu chromozomů od matky. Při meióze u samců nemůže docházet k rekombinaci a náhodnému rozchodu chromozomů, proto je genom jejich spermií naprosto shodný, tím samci předávají dcerám všechnu svou genetickou výbavu, což má za následek, že jsou si sestry mezi sebou navzájem příbuznější než s vlastními potomky. Tím haplodiploidie umožnila blanokřídlému hmyzu snížit genotypovou variabilitu příbuzných jedinců a díky tomu otevřela cestu k evoluci sociálního chování (Hamilton 1964, Forman and Král 2010).

Termiti haplodiploidní nejsou, a tak ke snížení genotypové variability zajišťující větší příbuznost mezi jedinci musejí využívat jiné mechanismy, než využívají včely, ostatně podobně jako některé eusociální rody rypošů (*Heterocephalus*, *Cryptomys*) či mořských korýšů (*Synalpheus*). Termiti ke snížení genotypové variability využívají stabilní translokační heterozygotnost (komplexní heterozygotnost) (Forman and Král 2010). Vznik eusociality u termitů podporují také podmínky prostředí, hnízdní a potravního chování, jako např. rodinná soudržnost, stanoviště bohatá na potravu, pomalý vývoj, monogamie, přesah

generací, příležitost pro dědění hnízda potomky, výhody skupinové obrany proti predátorům a nutnost horizontálního přenosu střevní symbiotické fauny z jedince na jedince po každém svlékání (Hamilton, 1964).

I přes vzdálený vývoj termitů a blanokřídlých je zde určitá podobnost v dělbě práce čili rozdělení reprodukčních, obranných, pečovatelských a stavebních funkcí mezi jednotlivé kasty. Tato podobnost se odráží i v totožné terminologii pro pojmenování jednotlivých kast (dělník/dělnice, voják, král/královna). Dalším rozdílem termitů od blanokřídlých je odlišný vývoj jedinců. Termiti mají proměnu nedokonalou a do každého stádia se musí tzv. „svléknout“, zatímco blanokřídlý hmyz má proměnu dokonalou a z kukly se líhne „dospělý“ příslušník určité kasty, který již nemá možnost diferenciaci v jinou kastu (Gupta 1991, Noirot and Bordereau 1991). U blanokřídlých je příslušnost k dané kastě dána částečně geneticky (haploidní trubec vs. diploidní samice), v případě samic i výživou. U termitů není příslušnost k určité kastě dána geneticky a každý jedinec nese tzv. totipotentní genom s obsahem všech vývojových programů jednotlivých kast a každý jedinec má v larválních stádiích „otevřenou“ cestu do každé kasty. Rozhodnutí, do které kasty se konkrétní jedinec vyvine je dáno komplexním působením vnějších, sociálních, ale i vnitřních faktorů jako např. potrava, klima, velikost kolonie, působení feromonů a vnitřních endokrinních vlivů na genovou expresi jednotlivých vývojových programů (Hanus and Šobotník 2004).

## 1.7 Systematika termitů

Podle systematiky bývá řád termitů nejčastěji členěn na sedm čeledí: Mastotermitidae, Kalotermitidae, Hodotermitidae, Termopsidae, Rhinotermitidae, Serritermitidae a Termitidae. Na základě potravní ekologie a rozdílných střevních symbiontů dělíme termity na tzv. nižší a vyšší („lower and higher termites“). Do nižších termitů patří všechny čeledi kromě nejpočetnější Termitidae (přes 2000 druhů). Nižším termitům pomáhají trávit potravu bičíkovci (Hypermastigida) a bakterie. Vyšší termiti postrádají bičíkovce a ve střevě mají jen symbiotické bakterie degradující celulózu (Bignell et al. 2014). Jedinečným znakem všech termitů je společné látkové složení potravy s převahou buničiny (celulózy), jejíž zdrojem bývá hlavně dřevo, a to především mrtvé, případně živé, které je napadené houbami a bakteriemi (Noirot and Noirot-Timothee 1969). Některé skupiny, jako např. čeleď Hodotermitidae, alternativně konzumují listy stromů, travin a opad v okolí hnízda. Humusem ze zbytků rostlin se živí celá řada vyšších termitů, např. někteří

zástupci podčeledi Termitinae, Nasutitermitinae a většina druhů podčeledi Apicotermitinae (Noirot and Noirot-Timothee 1969, Myles 1999). Kromě vlastního enzymatického aparátu a symbiotických organismů pomáhá s trávením celulózy také aktivní hledání potravy napadené houbami nebo přímo symbiotické soužití v podobě pěstování hub přímo v termitišti (Termitidae: Macrotermitinae) (Sands 1969). Je zajímavé, že jedinec s každým prodělaným svlékáním ztrácí své přirozené střevní symbionty. U nižších termitů je častá tzv. anální trofalaxe, což je vzájemné krmení natrávenou potravou, které umožňuje doplnit střevní symbionty po každém svlékání. Tento fakt o nezbytnosti vzájemného kontaktu podpořil vznik hypotézy o vzniku termitů eusociality (Honigberg 1970). Není jisté, zda je tato skutečnost nejdůležitějším faktorem vzniku eusociality termitů, ale je jisté, že hraje jeden z klíčových faktorů (Shellman-Reeve 1997).

## 1.8 Kastovní uspořádání termitů

V termití terminologii je pojem imago neboli adultní stádium používáno pouze pro pohlavní jedince s plně vyvinutými křídly (alát) či pro jedince, kteří svá křídla již ztratili (dealát). Ostatní kasty jsou považovány za nedospělé jedince. Mají totiž prothorakální žlázy, které produkují svlékací hormon ekdyson, čímž si zachovávají možnost dalšího svlékání (Noirot et al. 1985). Pojem nymfa se užívá u jedinců se základy křídel z vývojové linie směřující k okřídleným jedincům. Larvou nazýváme jedince bez křídel v raných stádiích vývoje. Do této kategorie patří jedinci vedoucí k dělníci kastě, ale také bezkřídlí velmi mladí jedinci reproduktivní linie. Sterilní kasta vojáků, která zajišťuje obranu hnízda, vede přes přechodné stádium tzv. bílého vojáka, který sice nese znaky dospělého vojáka (Obr. 1), ale postrádá pigmentaci a jeho kutikula není plně sklerotizovaná (Timothy G. Myles, 1986). Dělníky můžeme rozdělit na pravé a nepravé. Pravý dělník je jedinec, který již nemá možnost se diferencovat v okřídleného dospělého. Tyto jedince nacházíme u všech vyšších termitů a u několika podčeledí nižších termitů. U ostatních linií nižších termitů vykonávají pracovní funkci pozdní larvální a nymfální instary. Zde narážíme na pojem nepravý dělník, který bývá nazýván i pseudergát (Grasse, 1947). Jde o jedince (Obr.1) s morfologií larvy se zachovanou možností se vyvíjet v imago. Tento jedinec je v tzv. stacionární fázi, což znamená, že i když se nadále svléká, jeho morfologie zůstává stejná. Pseudergát může vzniknout také z nymfy, která prodělala tzv. regresní svlékání, při kterém ztratila základy křídel (Myles 1999).

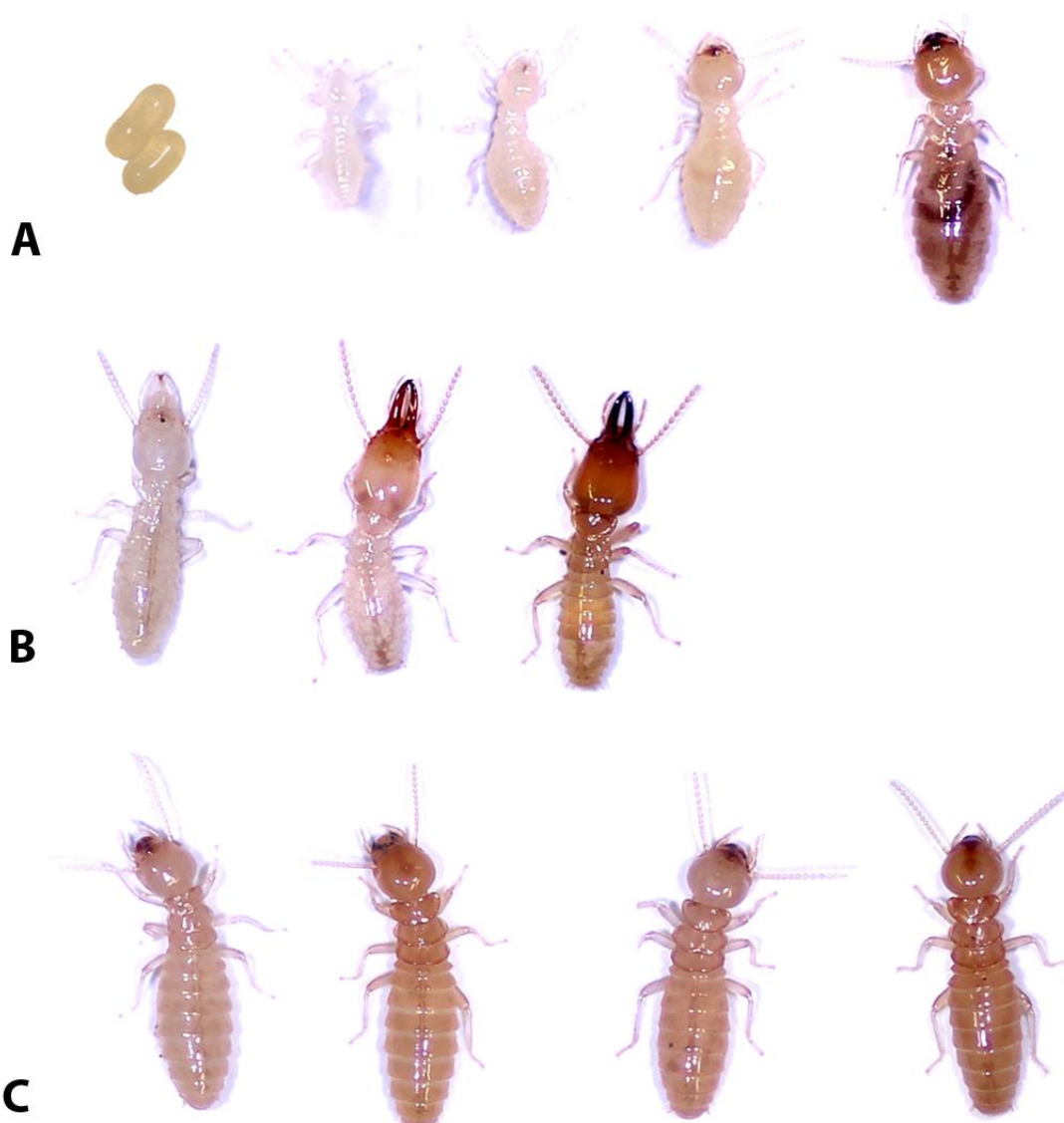
Pohlavní jedinci, což jsou jedinci schopni reprodukce, se mohou vyvinout z různých kast v různém stádiu vývoje. Mezi ně patří primární pohlavní jedinci, což jsou imaga, která opouštějí rodnou kolonii a po svatebním letu (po němž u nich dochází k odlomení křídel), vytvářejí pár a jako král a královna zakládají novou kolonii. Důležitým znakem primárních pohlavních jedinců jsou proto složené oči a zprvu i přítomnost křídel (Korb and Hartfelder 2008). Ostatní pohlavní jedince nazýváme jako sekundární, protože nejsou zakladateli nových kolonií, nýbrž se rozmnožují v rámci rodné kolonie. Mezi ně řadíme také neotenické pohlavní jedince (Obr.1), kteří vznikají z nedospělých stadií, tj. larev, nymf, dělníků či pseudergátů. Na rozdíl od primárních okřídlených reprodukčních jedinců nemají plně vyvinuté složené oči, jsou od počátku bezkřídlí a zachovávají si některé juvenilní znaky (Korb and Hartfelder 2008). Neotenici jsou reprodukčně aktivní jedinci, kteří vznikají buď jako náhradní pohlavní jedinci, slouží tedy jako náhrada za uhynulého krále či královnu, nebo slouží jako doplňkoví pohlavní jedinci a stávají se plodnými i v přítomnosti primárního páru. Neoteničtí jedinci se neúčastní svatebního letu a jsou zaznamenáni zhruba u 60 % rodů nižších termitů. U vyšších termitů jsou vzácní (Myles 1999).

## 1.9 Životní strategie termitů

Mnoho studií ukazuje, že uspořádání kast je závislé na potravních a hnízdních strategiích jednotlivých druhů termitů (Higashi et al. 1991, Shellman-Reeve 1997, Traniello and Rosengaus 1997, Myles 1999), s tím, že se stabilitou potravních zdrojů a celkově se stabilitou prostředí roste dlouhověkost a perzistence kolonie (Higashi et al. 1991). S tím souvisí i následující rozdělení termitů na základě stability zdrojů na termity jednoduchých kolonií (v angličtině tzv. single-site nesters), rozvětvených kolonií (tzv. multiple nesters) a centrálních kolonií (tzv. central nesters). U tohoto rozdělení je klíčové, že termity jednoduchých kolonií žijí v jednom kusu dřeva, který jim zároveň slouží jako zdroj potravy, který svou velikostí limituje délku života celé kolonie. Ostatní typy mají hnízdo a potravní zdroje oddělené, a tak nejsou přímo limitováni objemem potravy ve svém hnízdě (Shellman-Reeve, 1997).

Termité ze skupiny jednoduchých kolonií mají až na výjimky (král, královna a finální instar vojáků) vysoce flexibilní kastovní vývoj a mohou podle potřeby nastoupit několik různých směrů vývoje až do pozdních instarů. Tato adaptace je zřejmě reakcí na nestabilní a omezené zdroje potravy (Higashi et al. 1991, Shellman-Reeve 1997). Zároveň u nich chybí

kasta pravého dělníka a pracovní úlohy vykonávají pseudergáti, larvy a nymfy. Navzdory omezené době vývoje kolonií mohou pohlavní jedinci žít několik let (Thorne et al. 2002).



**Obr. 1. Vývojová stádia termita *P. simplex*. A. Vajíčka, larvální stádia L1-3 a dělník (pseudergát) (znázorněno zleva doprava). B. Vývoj vojáka – stádium bílého vojáka, voják první den po svleku a konečné stádium zralého vojáka (znázorněno zleva doprava). Patrná je změna sklerotizace a pigmentace kutikuly během vývoje vojáka. C. Vývoj neotenika – mladá samice, mladý samec, zralá samice, zralý samec (znázorněno zleva doprava). Mladí neotenici na obrázku jsou zhruba týden po svleku. U zralých jedinců je patrná výraznější pigmentace kutikuly.**

Do kategorie termitů rozvětvených kolonií patří např. rody *Coptotermes*, *Reticulitermes*, *Heterotermes* (Rhinotermitidae) a některé rody Termitidae. Tito termiti mají rozvětvenou kolonii obývající několik hnízd, které jsou propojené systémem tunelů a cest. Tento systém vymezuje rozsáhlou oblast, ve které se nacházejí zdroje potravy. Najdeme zde

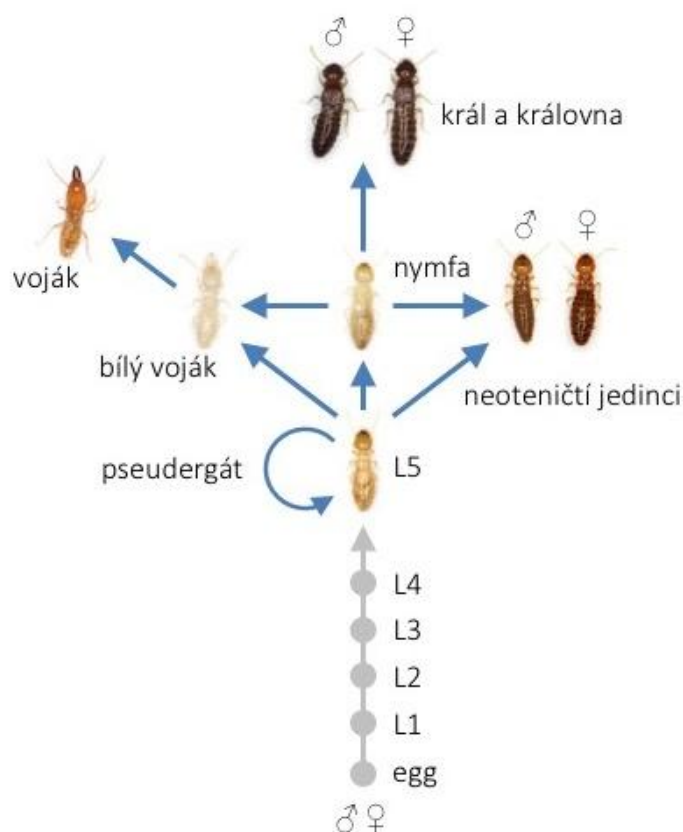


druhy obývající klády a pařezy, ale i podzemní druhy termitů. Specifikem této kategorie je úzká vazba na půdu, která slouží jako hnízdní substrát a prostor pro podzemní tunely (Gay and Callaby 1970, Noirot 1970). Tato životní strategie umožňuje velkou stabilitu kolonie a s tím spojenou dlouhověkost kolonie a velký počet jedinců v rámci kolonie (více než milión) (Gay and Callaby 1970, Jones et al. 1988). U těch to termitů najdeme právě dělníky a flexibilita kast je ve srovnání s kategorií single-site nesters minimální (Pawson and Gold 1996). I když tyto termité už nejsou závislé na jednom kusu dřeva, tak dřevo stále převažuje v jejich potravě a roztroušená distribuce tohoto zdroje omezuje stavbu velkých centralizovaných hnízd. Pohlavní jedinci mohou dle odhadů žít několik let (Hanus and Šobotník 2004).

V kategorii termitů s centrálními koloniemi najdeme většinu čeledi Termitidae, ale také druhy čeledi Hodotermitidae, část rodu *Coptotermes*, rod *Schedorhinotermes* (oba Rhinotermitidae) (Shellman-Reeve 1997). Tito termiti staví složitě strukturovaná hnízda propojená tunely s rozsáhlým potravním teritoriem. Jejich hlavní složkou potravy není jen dřevo, ale také sbírají semena, plody, listy, květy, houby, opad atd. (Krishna and Weesner 1970). Hnízda si budují na stromech, v substrátu nebo v podobě impozantních nadzemních staveb. Materiály pro stavbu hnízda jsou rostlinného původu, exkrementy nebo hlína (Gay and Callaby 1970, Noirot 1970). Jedná se o velmi stabilní stavby, které dělníci neustále rozšiřují a přestavují podle potřeby. Pozoruhodná je také stálá teplota a vlhkost uvnitř hnízda. V takovém hnízdě je potrava shromažďována, skladována a případně i pěstována (pěstování hub u Termitidae: Macrotermitinae) (Noirot, 1970). Kolonie těchto termitů může mít velmi dlouhou životnost (až několik desítek let) s počtem jedinců od stovek tisíc do několika miliónů, výjimkou u některých druhů není ani pět miliónů jedinců (Darlington 1991). Stabilní zdroje potravy a hnízdo mají vliv na uspořádání kast. Dělníci jsou sterilní (až na výjimky), bez možnosti jakékoliv diferenciaci (Traniello and Rosengaus 1997). Ztráta možnosti vyvinout se v reprodukční jedince umožnila dělníkům vysokou specializaci k maximálnímu výkonu a práci ve prospěch kolonie (Shellman-Reeve 1997). Právě u vyšších termitů byly zaznamenány příklady extrémně dlouhověkých královen, v rekordu žijících až dvě desetiletí, v odhadech pak i několik dekád (Keller 1998, Lepage and Darlington 2000).

## 1.10 *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae: Prorhinotermitinae)

Rod *Prorhinotermes* zahrnuje 20 druhů termitů s ohniskem výskytu v jihovýchodní Asii. Několik druhů kolonizovalo ostrovní a pobřežní zóny všech biogeografických oblastí. *P. simplex* obývá Nový svět, konkrétně Floridu, Jamajku, Kubu a Puerto Rico. Jde o tropický druh termita, který najdeme v lesích a mangrovech příbřežních oblastí a ostrovů. *P. simplex* tvoří malé kolonie, které jsou založeny v menších kusech naplaveného dřeva a pařezech na dostatečně vlhké půdě. Svá hnízda kolonie neopouštějí a jsou limitovány zdrojem dřeva, které hnízdo obsahuje (Scheffrahn et al. 2014). Jedná se tedy o termity jednoduchých kolonií (Shellman-Reeve 1997). Pro životnost kolonie je klíčová kvalita a velikost dřeva, které obývají. Kolonie je schopná přežít v jednotkách let s počtem několika tisíc jedinců (Abe 1990). Charakteristikou *P. simplex* je lineární vývoj jedinců s vysokou flexibilitou individuálního vývoje v různé kasty. Většina jedinců kromě vojáků a pohlavních jedinců může jít až do pozdních instarů několika směry vývoje (Obr. 2). Pro tohoto termita je typický výskyt nepravých dělníků tzv. pseudergátů (Myles, 1999). U chovných kolonií na ÚOCHB je dokladované dožití pseudergátů zhruba rok, vojáci se dožívají v průměru o rok déle, neoteničtí jedinci kolem 5 let a zatím nejstarší pozorovaný primární pár je ve věku 17 let.



**Obr. 2: Kastovní systém termita**

***P. simplex*.** Kastovní systém *P. simplex* má několik larválních stádií, které předchází dělníkům a vojákům (nereproduktivní kasty) nebo předchází jako nymfy primárním reproduktivním či neoteničtým jedincům (reproduktivní kasty).

## 1.11 Diferenciace kast a vliv hormonů a feromonů

Komunikace pomocí feromonů je nejrozšířenější cestou pro přenos informací mezi jedinci kolonie. Jde o specifické chemické látky emitované jedincem, které mohou obsahovat celou řadu informací, např. o tom, do jaké kasty příslušník patří, jakého je pohlaví, ale také dokážou působit na fyziologii, endokrinní sekreci i genovou expresi (Karlson and Lüscher 1959, Wilson 1971). V distribuci feromonů mezi ostatní jedince je mezi vědci mnoho otazníků, ale obecně se předpokládá, že feromony v kolonii šíří anální trofalaxe, a že feromony, které produkuje král a královna se k ostatním jedincům šíří od dělníků, kteří o královský pár pečují (Nagin 1972). Velkou neznámou je také chemické složení a samotná podstata termitích feromonů, např. Lüscher usuzoval, že feromony jsou přímo juvenilní hormony nebo látky jim podobné, které přímo působí na genovou expresi, ale toto podezření zavrhnul a přiklonil se k tomu, že feromony působí na endokrinní sekreci příjemců (Lüscher 1960, 1972, 1973, 1977, Myles and Chang 1984).

Určení kast spočívá v působení endokrinních hormonů na genovou expresi, která v genomu spustí konkrétní „program“ na vytvoření té či oné kasty. Načasování svleku a řízení morfogeneze, ke které následně dojde, je ovlivněno působením sekretů prothorakálních žláz (ekdysosteroidy, svlékací hormon), *corpora cardiaca* (prothoracikotropní hormon) a *corpora allata* (juvenilní hormon). Jedná se o komplexní endokrinní mechanismy, které se projevují na různých úrovních, od regulování hormonů v hemolymfě, až po samotné vyvolání buněčné odpovědi (Miura 2001). Působení a dynamika zmíněných hormonů při postembryonálním vývoji u hmyzu je poměrně dobře prozkoumaná. Ekdyson, který se cyklicky vylévá z prothorakálních žláz, aktivovaných prothoracikotropním hormonem, má za úkol synchronizaci svlékání a rozvoj imaginálních struktur. Juvenilní hormon zase ovlivňuje morfogenezi při následujícím svlékání. Tento hormon pomáhá udržet vývojové stádium larvy a jeho nedostatek vede k přeměně v dospělce. Hladiny tohoto hormonu s dalším a dalším svlékáním postupně klesají, což umožňuje progresivní vývoj imag. Juvenilní hormon a jeho hladina v hemolymfě je zodpovědná i za dozrávání gonád u imag, vitelogenezi, kladení vajíček, spuštění sexuálního chování a také významně ovlivňuje determinaci kast termitů (De Wilde and Beetsma 1982).

## 2 Cíle práce

Primárním cílem práce bylo na modelu *Prorhinotermes simplex* určit, jestli se telomeráza a její aktivita podílí na kastovní diferenciaci termitů a současně tím i na regulaci délky života termitů. Dílčími cíli bylo:

- Nejprve změřit a porovnat celkovou aktivitu telomerázy v hlavách a abdomenech různých kast *P. simplex*.
- Poté telomerázu vyhodnotit u jednotlivých orgánů, a to u různých vývojových stádií a různě starých jedinců *P. simplex*.

## 3 Metodika

### 3.1 Původ vzorků

Vzorky termita *P. simplex* pocházejí z chovů Ústavu organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky (Praha), a to původně z několika kolonií získaných v letech 1964-2010 na Kubě a Floridě. Testované vzorky byly odebírány buď přímo z chovných kolonií, nebo z vojáků či neoteniků indukovaných z dělníků (pseudergátů) držených ve skupinách v Petriho miskách. Odebraní termity byli uspáni chladem a vypitváni v Ringerově roztoku. Při pitvě byl vždy odstraňován trávicí trakt, jehož obsah by mohl ovlivnit relevantnost výsledků. Vzorky byly zamrazeny pomocí tekutého dusíku a poté skladovány při teplotě -80°C.

### 3.2 Stimulace dělníků (pseudergátů) k rozvoji ve vojáky či neoteniky

Celý proces byl prováděn dle publikované metodiky (Hanus et al. 2006) v Petriho miskách s vlhkým pískem a kouskem smrkového dřeva, při teplotě 26°C. Pro indukci dělníků ve vojáky byla použita skupina bez vojáků, ve které se dělníci do třech týdnů postupně začali svlékat v bílé vojáky. Díky každodenní kontrole kolonie bylo možné odebírat bílé vojáky (po cca 14 dnech od jejich svlékání z dělníků) jeden den před jejich svlékáním ve vojáky (takové jedince lze poznat podle prosvítajících pigmentovaných mandibul vojáka přes kutikulu bílého vojáka). Tito farátní vojáci byli odebráni a dále drženi ve skupině 40 pseudergátů.

Neotenici byli indukováni ve skupinách 75 dělníků + 15 vojáků. Po zhruba deseti dnech v takových skupinách vznikali z dělníků první neotenici. Ti byli odebíráni a dále



96 jamkových destičkách v cycleru CFX96 BioRad Real-time PCR system. TRAP byla prováděna 60minutovou inkubací při 30 °C a následovala PCR o 35 cyklech (30 s při 95 °C a 90 s při 60 °C). Jednotlivé vzorky byly vyhodnocovány v duplikátech.

Pro vyloučení ovlivnění reakce případnými inhibitory ve vyhodnocovaných vzorcích byla při kvantifikaci zahrnuta vnitřní kontrola ITAS (internal telomere assay standard). ITAS (Generi Biotech, Česká republika) o velikosti 100-nt obsahovala koncové sekvence pro primery TS a Bm-CXa. Na reakci jsme použili 10-18 mol ITAS. U každého vzorku byly provedeny čtyři nezávislé experimenty. Relativní aktivitu telomerázy jsem vypočítal podle  $2^{Ct(ITAS)} / 2^{Ct(vzorek)}$ . Hodnoty prahového cyklu (Ct) byly získány pomocí Real-time PCR z každého testovaného vzorku. Výsledky jednotlivých pokusů byly standardizovány k výsledkům získaných z proteinových extraktů hlav dělníků, kteří byli odebráni vždy z téže kolonie jako testovaní jedinci.

### 3.6 Statistické vyhodnocení

Statistické vyhodnocení probíhalo v programu GraphPad Prism 7 pomocí jednocestné ANOVA a Bonferroniho mnohonásobného srovnávacího testu. Chybové úsečky uvedené v jednotlivých grafech reprezentují směrodatné odchylky vypočtené z alespoň tří testovaných vzorků. Statistická průkaznost je v grafech znázorněna jako \* (P <0,05), \*\* (P <0,01), \*\*\* (P <0,001) a \*\*\*\* (P <0,0001).

## 4 Výsledky

Cílem pokusů bylo získat představu o relativní aktivitě telomerázy u všech možných kast, stádií, ale i v různých orgánech *P. simplex* a ověřit tak, jestli regulace telomerázy hraje roli v kastovní diferenciaci termitů a tím také v dlouhověkosti jejich reprodukčních kast.

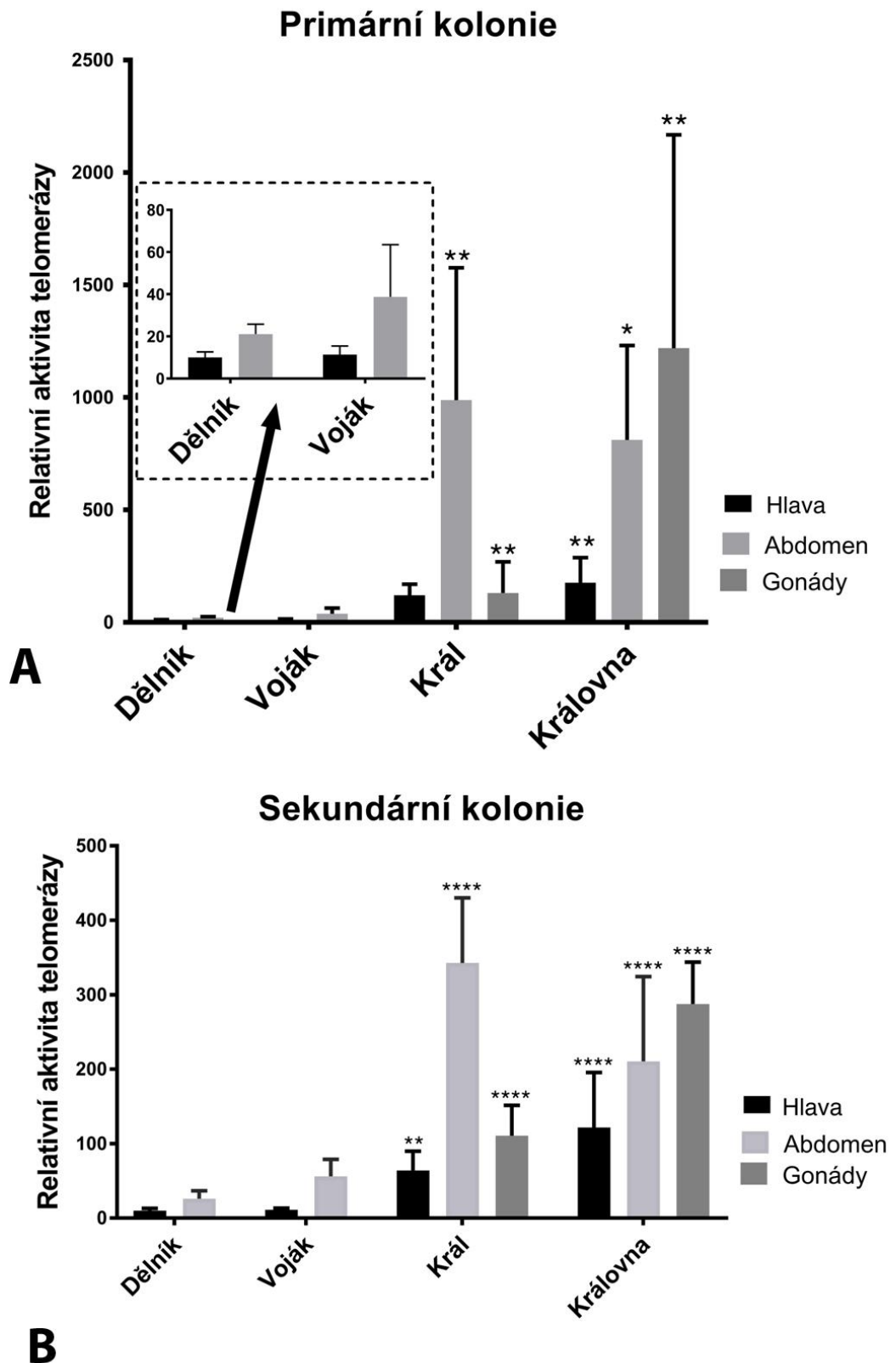
### 4.1 Aktivita telomerázy u kolonií vedených neotenickým vs. primárním párem

V prvním kroku byla mapována relativní aktivita telomerázy u zástupců jednotlivých kast, a to v koloniích tvořených primárními reprodukčními jedinci a v koloniích, u nichž byl primární pár nahrazen neoteniky. Analýza byla provedena u tří kolonií s primárním párem a tří kolonií s neoteniky, s tím, že byly vyhodnocovány extrakty hlavy, abdomenů a gonád (Obr. 3). Srovnání telomerázové aktivity mezi dělníky a vojáky nevykázalo statisticky průkazný rozdíl. Avšak jak u primárních, tak neotenických kolonií lze, ve srovnání s

hodnotami telomerázové aktivity dělníků, pozorovat mnohonásobné nárůsty telomerázové aktivity u reprodukčních jedinců. U primárních jedinců se jednalo o 18násobný ( $P=0,0042$ ) a 40násobný ( $P=0,0196$ ) nárůst v hlavě a abdomenu královen a 50násobný ( $P=0,0045$ ) nárůst v abdomenu krále (rozdíl v hlavě krále nebyl statisticky průkazný). Dramatický nárůst telomerázové aktivity byl pozorován také u hlav neoteniků, kde se jednalo o 6násobný nárůst u králů ( $P=0,0039$ ) a 12násobný nárůst u královen ( $P <0,0001$ ). V abdomenu byl nárůst 13násobný u králů ( $P <0,0001$ ) a 8násobný u královen,  $P <0,0001$ ).

Hodnoty telomerázové aktivity v abdomenech reprodukčních jedinců se jeví vyšší než v jejich hlavách, nicméně v tomto ohledu byl statisticky průkazný rozdíl zaznamenán pouze u neotenických králů (6násobný nárůst,  $P <0,001$ ). Srovnatelné hodnoty byly nalezeny mezi ováriemi a abdomenem královen, naproti tomu, hodnoty v testes vykazaly podobné hodnoty jako hlava králů. Tedy, aktivita telomerázy v testes byla výrazně nižší než v ováriích, a to jak u primárních (10násobný rozdíl ovšem bez statistické průkaznosti), tak neotenických jedinců (2,5násobný rozdíl,  $P <0,0001$ ).

Rozdíly byly pozorovány taktéž při srovnání primárních a neotenických kolonií u pohlavních kast. Primární jedinci oproti neotenickým vykazali mnohem vyšší hladiny telomerázové aktivity (3násobný rozdíl v ováriích,  $P=0,0018$ ) a 3násobný rozdíl v abdomenu u králů,  $P <0,0001$ ).



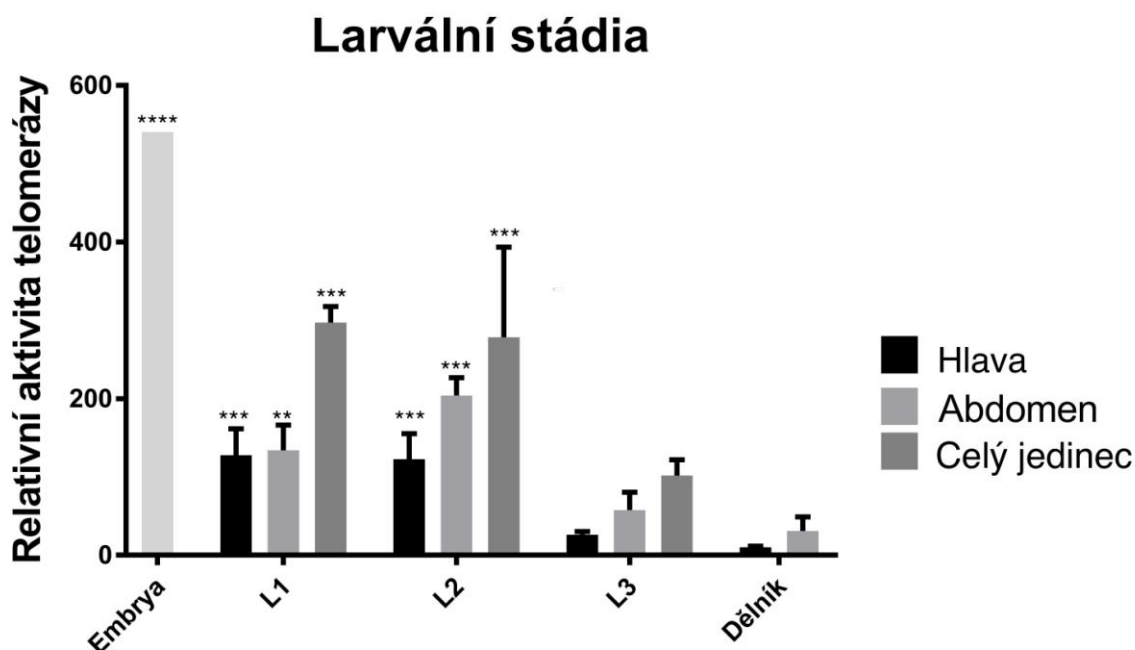
Obr. 3. Srovnání telomerázové aktivity mezi primární a sekundární kolonií. **A.** Primární kolonie. **B.** Sekundární kolonie. Hodnoty relativní telomerázové aktivity byly hodnoceny v hlavě, abdomenu a gonádách jedinců různých kast.



## 4.2 Aktivita telomerázy u larev

Vzhledem k rozdílům v hladině telomerázové aktivity zaznamenaným mezi jednotlivými kastami primárních i neotenických kolonií, bylo přikročeno k vyhodnocení aktivity telomerázy v nediferencovaných, tj. vývojově nedospělých jedincích. V tomto pokusu byla hodnocena embrya, celé larvy a pak hlava a abdomen larválních stádií L1-L3 ve srovnání s dělníkem (pseudergátem).

Srovnáním aktivity telomerázy u embryí a larválních stádií (Obr. 4) lze pozorovat, že aktivita telomerázy postupně klesá. Nejvyšší aktivita telomerázy byla tedy zaznamenána u embryí, u nichž byla hodnota telomerázy např. 50x vyšší než u hlav dělníků ( $P < 0,0001$ ), zhruba 2x vyšší než v celých larvách L1 ( $P < 0,0001$ ) a L2 ( $P < 0,0001$ ) a dokonce 5x vyšší než v celých larvách L3 ( $P < 0,0001$ ). Nejvyšší pokles aktivity byl pozorován při vývoji z embrya v larvu a při svleku do L3. Při porovnání hladin telomerázy u larev a jednotlivých kast vidíme, že aktivita telomerázy je u larev mnohonásobně vyšší než dělníků a vojáků, nicméně je srovnatelná se somatickými orgány reprodukčních jedinců.



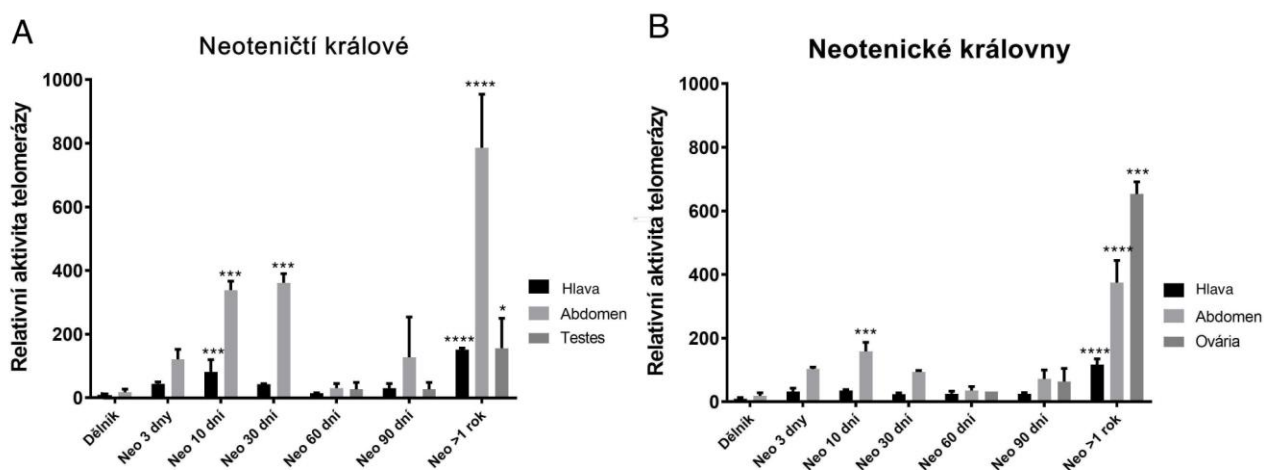
**Obr. 4. Aktivita telomerázy při vývoji larev.** Aktivita telomerázy u larválních stádií a embryí, pro srovnání přidán dělník. Testovány byly celé larvy, hlava a abdomen.

Souhrnně, provedené experimenty naznačují markantní rozdíl v regulaci telomerázové aktivity mezi reprodukčními a nereprodukčními kastami. Při vývoji nereprodukčních kast dochází k postupnému utlumování telomerázové aktivity, naproti tomu, u dospělých jedinců reprodukčních kast se zdá, že jejich telomerázová aktivita je s jejich věkem zesílena. K ověření těchto výsledků byla proto v dalším experimentu testována telomerázová aktivita u různých věkových kategorií neoteniků.

### 4.3 Aktivita telomerázy u neoteniků různého stáří

Neoteničtí samci a samice byli odebíráni a testováni ve věku 3, 10, 30, 60, 90 dní a starší než 1 rok. Byla vyhodnocována hlava, abdomen a ve věku od 60 dní taktéž i gonády, které jsou od tohoto věku pro analýzu již dostatečně vyvinuté. Paralelně s neotenickými jedinci byli vyhodnocováni i dělníci (Obr. 5).

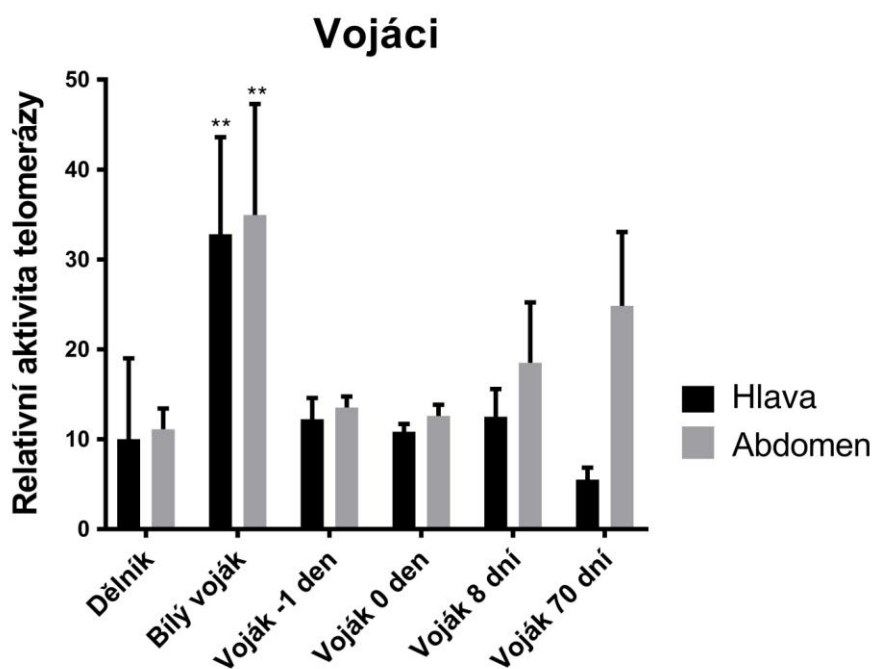
Konzistentně s předchozími pokusy bylo i zde pozorováno, že u neoteniků dochází ve srovnání s dělníky k nárůstu aktivity telomerázy, a to s výjimkou neoteniků starých 60 dní, kde byl u obou pohlaví pozorován pokles telomerázy jak v hlavě, tak i abdomenu. Pro obě pohlaví neoteniků je charakteristické významné posílení telomerázové aktivity u jedinců starších jednoho roku. V porovnání s dělníky je zde u králů pozorován 15násobný nárůst v hlavě ( $P < 0,0001$ ), 44násobný nárůst v abdomenu ( $P < 0,0001$ ), u královen potom 11násobný nárůst v hlavě ( $P < 0,0001$ ) a 21násobný nárůst v abdomenu ( $P < 0,0001$ ).



**Obr. 5. Aktivita telomerázy u různého stáří neoteniků.** Vyhodnocování byli neoteničtí samci (A) a samice (B), pro srovnání byl také testován dělník. Testována byla hlava, abdomen a gonády.

#### 4.4 Aktivita telomerázy u vojáků různého stáří

Z předchozího pokusu je zřejmé, že aktivita telomerázy u neoteniků celkově narůstá s jejich stářím v rámci terminálního vývojového stádia. Dalším cílem bylo proto objasnění, jestli nárůsty telomerázové aktivity spojené s věkem jedince jsou záležitostí pouze reprodukčních jedinců, či naopak podobně lze nárůsty telomerázy pozorovat i u jedinců nereprodukčních, kteří jsou v terminálním instaru vývoje. Jako vhodná kasta pro tento test byla vybrána kasta vojáků společně se stádiem tzv. bílého vojáka, které vývoji vojáka předchází. Vyhodnocování byli bílí vojáci, vojáci v den svleku, jeden den a 8 dní po svleku a ve stáří 70 dní. Při srovnání relativní aktivity telomerázy při vývoji vojáka (Obr. 6) lze vidět významný nárůst telomerázy u bílého vojáka. Vzhledem k paralelně testovaným dělníkům byl nárůst telomerázy 3násobný v hlavě ( $P=0,0011$ ) a v abdomenu ( $P=0,007$ ). Ovšem, v následujícím vývoji byla u vojáka telomerázová aktivita snížena na úroveň pozorovanou u dělníků, s tím, že u vojáků dochází v průběhu věku nedocházelo ke statisticky významným změnám.

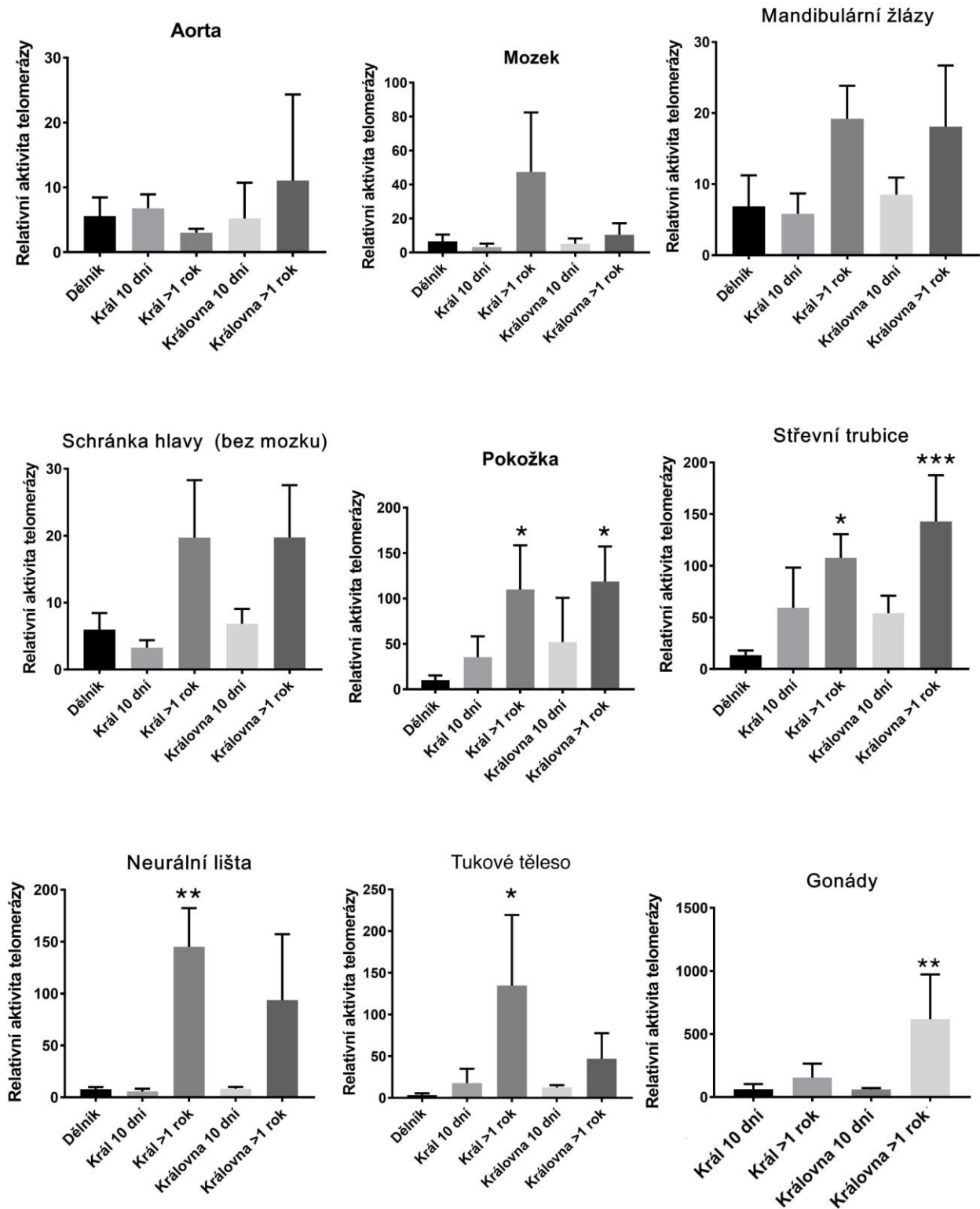


**Obr. 6.** Aktivita telomerázy u různého stáří vojáků. Měřen abdomen a hlava bílých vojáků a plně vyvinutých různě starých vojáků (-1 den, 0 dní – ihned po svleku, 8 dní a 70 dní). Pro srovnání opět přidán dělník.

#### **4.5 Aktivita telomerázy v jednotlivých orgánech**

Pro detailnější analýzu telomerázové aktivity byly v dalších experimentech hodnoceny jednotlivé orgány neoteniků, a to starých deset dní či starších jednoho roku a paralelně byly stejné orgány testovány i u dělníků. Měření bylo prováděno v aortě, mozku, mandibulárních žlázách, hlavové kapsuli (tj. hlavy bez mozku a mandibulárních žláz), pokožce, střevní trubici, nervové pásce, tukovém tělese a v gonádách (Obr. 7).

Dělníci a mladí reprodukční jedinci vykazali ve všech testovaných orgánech, srovnatelnou telomerázovou aktivitu. Telomerázová aktivita zde byla relativně nízká, např. u aorty dělníka zhruba 100krát ( $P=0,0028$ ) nižší než u ovárií staré neotenické královny (Obr.8). Statisticky významný nárůst aktivity telomerázy byl zaznamenán u starých králů v hlavové kapsuli (7násobný,  $P=0,0266$ ), neurální liště (25násobný,  $P=0,0041$ ) a tukovém tělese (8násobně,  $P=0,0382$ ). U starých královen byl tento nárůst zaznamenán ve střevní trubici (2,5násobný,  $P=0,0262$ ) a ováriích (10násobný,  $P=0,0383$ ). K významnému nárůstu telomerázy v průběhu věku došlo u ovárií (9násobný rozdíl,  $P=0,0383$ ).



**Obr. 7. Aktivita telomerázy v testovaných orgánech.** Aktivita byla vyhodnocována u dělníků, neotenických královen a králů ve stáří 10 dní a jedinců starších než 1 rok. Relativní aktivita telomerázy byla testována v aortě, mozku, schránce hlavy (bez mozku), mandibulárních žlázách, střevní trubici, pokožce, neurální liště, tukovém tělese a v gonádách.

## 5 Diskuze

V předložené magisterské práci byla zmapována aktivita telomerázy u termita *P. simplex*, který se řadí mezi nižší termity. Jedná se o jednu z prvních prací, která sleduje aktivitu telomerázy u sociálního hmyzu; předchozí studie se zabývaly včelou medonosnou (Korandová and Frydrychová 2016) a mravenci (Jemielity et al. 2007), a toto je vůbec první práce, která se zabývá termity.

Na základě četných studií u obratlovců (Prowse and Greider 1995, Wright et al. 1996, Bernardes de Jesus et al. 2012), bezobratlých (*P. americana* či *A. mellifera*) (Korandová et al. 2014, Korandová and Frydrychová 2016), ale i rostlin (Fajkus et al. 1996) existuje předpoklad, že aktivita telomerázy je obecně vysoká na počátku vývoje jedince, a to zejména v raném embryonálním stádiu, a že s vývojem jedince je telomeráza postupně tlumena. Taktéž se obecně předpokládá korelace telomerázové aktivity s buněčnou proliferací (Wright et al. 1996, Flores et al. 2006, 2008, Saretzki 2009), takže např. u člověka bylo detailně ukázáno, že telomerázová aktivita je u dospělých jedinců omezena na buňky právě s relativně vysokou proliferační kapacitou, jako jsou buňky kmenové či zárodečné (Flores et al. 2006). A konečně je rovněž předpokládáno, že aktivita telomerázy je tlumena s věkem jedince a že nedostatečná aktivita telomerázy v proliferačně aktivních buňkách dospělého organismu je jedním z významných urychlovačů procesu stárnutí (Harley and Villeponteau 1995, Saretzki 2009).

Vzhledem k uvedeným předpokladům lze na výsledky této magisterské práce pohlížet ze dvou aspektů. Prvním aspektem je kasta dělníků, u nichž získané výsledky věrně odrážejí obecné charakteristiky telomerázové aktivity, tedy její vysoké hodnoty v embryonálním stádiu a postupný útlum v průběhu vývoje a stáří jedince, obdobně jak bylo pozorováno v předcházející studii u blízce příbuzného švába *P. americana* (Korandová et al. 2014). Druhým aspektem jsou dlouhověcí reprodukční jedinci, kteří naopak svou telomerázovou aktivitou vybočují z obecného trendu, když ukazují, že jsou „schopni“ aktivitu telomerázy zesilovat, a to nejen v průběhu svého vývoje, ale taktéž i v rámci svého dospělého věku. Správnost naší pracovní hypotézy, že regulace kastovní diferenciace a tím i rozdíly v délce života *P. simplex* jsou korelovány s aktivitou telomerázy, je utvrzena srovnáním reprodukčních a nereprodukčních jedinců v jejich telomerázových aktivitách, ale taktéž i srovnáním *P. simplex* s blízce příbuzným švábem *P. americana*, tedy taktéž hemimetabolním, nicméně solitérním hmyzem.

Lze spekulovat o tom, co stojí za odlišnou regulací telomerázy mezi reprodukční a nereprodukční kastou. Určité vodítko může poskytnout včela medonosná, což je sice holometabolní hmyz a lze tedy u ní vzhledem k *P. simplex* předpokládat značné odlišnosti v buněčné proliferaci v průběhu vývoje, ale u níž na základě publikovaných i nepublikovaných výsledků (Korandová and Frydrychová 2016, nepublikovaná data naší laboratoře) bylo prokázáno, že aktivita telomerázy je zvýšená jak u královny, tak i u dlouhověké zimní generace dělnic a tedy, že aktivita telomerázy je spjata s kastovní diferenciací včely a s rozdíly v délce života. Kastovní diferenciaci včely, věkový polyetismus a regulace délky života včely medonosné jsou intenzivně studovanými tématy, a to zejména s ohledem na endokrinní regulaci a působení včelích feromonů jako komunikačních signálů ve včelstvu (Pankiw et al. 1998, Slessor et al. 2005, Smedal et al. 2009, Korandová and Frydrychová 2016). Bylo prokázáno, že feromon včelího plodu u dělnic urychluje proces stárnutí, naproti tomu feromon včelí matky stárnutí dělnic oddaluje (Smedal et al. 2009) a tedy, že proces stárnutí dělnic ve včelstvu je z valné části závislý na velikosti včelstva a jeho sociálních potřebách. Lze se tedy ptát, jestli obdobně jak u včel, tak i u termitů, vzhledem k jejich přísnému sociálnímu zřízení, je telomeráza a tím i dlouhověkost řízena feromonálně, a to s ohledem na momentální potřeby jejich společenství.

Další otázkou, ke které naše data přirozeně vybízejí, je, zda je telomerázový nárůst u reprodukčních jedinců způsoben zvýšenou proliferační aktivitou testovaných tkání. Nicméně nárůst aktivity telomerázy byl pozorován u tkání, které jsou u hmyzu obecně proliferačně neaktivní, jako je např. tukové těleso. Protože nárůst aktivity telomerázy byl v naší laboratoři pozorován i v tukovém tělese královen včel, tak i čmeláků (nepublikovaná data), dalo by se spekulovat o tom, že u reprodukčních jedinců se např. právě v tukovém tělese může nacházet velké množství kmenových buněk, jejichž proliferační aktivita, a tím i telomerázová aktivita, přispívá k renovaci tkáňových struktur. Ovšem eventualita, že by nárůsty telomerázové aktivity reprodukčních jedinců byly vázány na zvýšenou buněčnou proliferaci, byla zatím předběžně vyloučena probíhajícími experimenty v naší laboratoři, v nichž je ve vybraných tkáních *P. simplex* vizualizovaná buněčná proliferace pomocí bromdeoxyuridinu. Lze tedy spekulovat o nějaké jiné, netelomerické funkci telomerázy. Ačkoliv se jeví, že kromě údržby telomerické délky, má telomeráza i další funkce, jako je např. regulace transkripce nebo regulace apoptózy, detailních poznatků je v tomto ohledu poskrovnu. K významnějšímu zjištění ale patří, že telomeráza tlumí produkci volných kyslíkových radikálů při procesu oxidativní fosforylace v mitochondriích a tedy, že přispívá ke snižování hladiny oxidačního

stresu v organismu (Saretzki 2009). A je to právě aspekt oxidačního stresu a antioxidační ochrany, který je často zmiňován nejen v souvislosti s projevy stárnutí (Mittler 2002) ale také, vinou zesílených metabolických procesů, s reprodukcí organismu (Tasaki et al. 2017). Souhrnně se tedy můžeme ptát – co je příčinou zesílené telomerázové aktivity u reprodukčních jedinců? Může to být u nich tolik potřebná ochrana vůči volným kyslíkovým radikálům? Kladná odpověď na tuto otázku by mohla rozluštit dosud tolik záhadný nesoulad sociálního hmyzu k fenoménu „cost of reproduction“.

## **6 Závěr**

Závěrem lze konstatovat, že se v rámci této magisterské práce podařilo zjistit, že telomerázová aktivita u *P. simplex* je posilovaná v reprodukčních jedincích, a tedy, že je spjata s kastovní diferenciací tohoto druhu. Mechanismus propojení telomerázy s kastovní diferenciací *P. simplex* bude dále podrobněji studován.



## 7 Literatura

- Abe, T. 1990. Evolution of worker caste in termites. *Social insects and the environments*:29–30.
- Abe, T., D. E. Bignell, and M. Higashi. 2000. *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Springer Science & Business Media.
- Bernardes de Jesus, B., E. Vera, K. Schneeberger, A. M. Tejera, E. Ayuso, F. Bosch, and M. A. Blasco. 2012. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Molecular Medicine* 4(8):691–704.
- Bignell, D. E., D. T. Jones, and H. Hagedorn. 2014. A taxonomic index, with names of descriptive authorities of termite genera and species: An accompaniment to *Biology of Termites: A Modern Synthesis* (Bignell DE, Roisin Y, Lo N, Editors. 2011. Springer, Dordrecht. 576 pp.) . *Journal of Insect Science* 14(1):81.
- Blackburn, E. H. 2005. Telomeres and telomerase: Their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Letters* 579(4 SPEC. ISS.):859–862.
- Blagosklonny, M. V. 2013. Damage-induced aging and perpetual motion. *Cell Cycle* 12(17):2709–2710.
- Blagosklonny, M. V. 2010. Revisiting the antagonistic pleiotropy theory of aging: TOR-driven program and quasi-program. *Cell Cycle* 9(16):3151–3156.
- Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C.-P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner, and W. E. Wright. 1998. Extension of Life-Span by Introduction of Telomerase into Normal Human Cells. *Science* 279(5349):349 LP-352.
- Bonasio, R., G. Zhang, C. Ye, N. S. Mutti, X. Fang, N. Qin, G. Donahue, P. Yang, Q. Li, and C. Li. 2010. Genomic comparison of the ants *Camponotus floridanus* and *Harpegnathos saltator*. *science* 329(5995):1068–1071.
- Bonsall, M. B. 2006. Longevity and ageing: appraising the evolutionary consequences of growing old. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 361(1465):119–135.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72(1–2):248–254.
- Carey, J. R., and J. R. Carey. 2001. Demographic mechanisms for the evolution of long life in social insects. *Experimental gerontology* 36:713–22.
- Darlington, J. 1991. Turnover in the populations within mature nests of the termite *Macrotermes michaelseni* in Kenya. *Insectes Sociaux* 38(3):251–262.
- Fajkus, J., A. Kovařík, and R. Královics. 1996. Telomerase activity in plant cells. *FEBS Letters* 391(3):307–309.
- Fajkus, J., and E. Sýkorová. 2010. Nejvyšší ocenění koncům chromozomů - telomery a telomeráza. *Vesmír* 89(6):357–359.
- Flores, I., R. Benetti, and M. A. Blasco. 2006. Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Current Opinion in Cell Biology* 18(3):254–260.
- Flores, I., A. Canela, E. Vera, A. Tejera, G. Cotsarelis, and M. A. Blasco. 2008. The longest telomeres: A general signature of adult stem cell compartments. *Genes and Development* 22(5):654–667.
- Fontana, L., and L. Partridge. 2015. Promoting Health and Longevity through Diet: From Model Organisms to Humans. *Cell* 161(1):106–118.
- Forman, M., and J. Král. 2010. Změny v organizaci genomu a vznik sociality u bezobratlých. *Živa* 58:128–130.
- Frydrychova, R., P. Grossmann, P. Trubac, M. Vitkova, and F. Marec. 2004. Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects. *Genome* 47(1):163–178.
- Gay, F. J., and J. H. Callaby. 1970. *Biology of Termites*, vol. II.
- Goeptar, A. R., H. Scheerens, and N. P. E. Vermeulen. 1995. Oxygen and Xenobiotic Reductase Activities of Cytochrome P450. *Critical Reviews in Toxicology* 25(1):25–65.
- Gomes, N. M. V., J. W. Shay, and W. E. Wright. 2010. Telomere biology in Metazoa. *FEBS Letters* 584(17):3741–3751.
- Grasse, P.-P. 1947. Le polymorphisme social du termite a cou jaune (*Kaloterme flavicollis* F.). Les faux-ouvriers ou pseudergates les mues regressives. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 214:219–221.

- Greider, C. W. 1996. Telomere Length Regulation. *Annual Review of Biochemistry* 65(1):337–365.
- Gupta, A. P. 1991. *Morphogenetic hormones of arthropods*. Rutgers University Press.
- Hamilton, W. D. 1964. The genetical Evolution of Social Behavior II.
- Hanus, R., and J. Šobotník. 2004. Ontogeneze termitů (Isoptera) v kontextu ekologických strategií. *Biologické listy* 69:29–57.
- Hanus, R., J. Šobotník, I. Valterová, and J. Lukáš. 2006. The ontogeny of soldiers in *Prorhinotermes simplex* (Isoptera, Rhinotermitidae). *Insectes Sociaux* 53(3):249–257.
- Harley, C. B., and B. Villeponteau. 1995. Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Current opinion in genetics & development* 5(2):249–55.
- Harman, D. 2009. Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954–2009. *Biogerontology* 10(6):773.
- Hayward, A. D., A. J. Wilson, J. G. Pilkington, J. M. Pemberton, and L. E. B. Kruuk. 2009. Ageing in a variable habitat: environmental stress affects senescence in parasite resistance in St Kilda Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276(1672):3477 LP-3485.
- Heidinger, B. J., J. D. Blount, W. Boner, K. Griffiths, N. B. Metcalfe, and P. Monaghan. 2012. Telomere length in early life predicts lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(5):1743–1748.
- Higashi, M., N. Yamamura, T. Abe, and T. P. Burns. 1991. Why don't all termite species have a sterile worker caste? *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 246(1315):25–29.
- Hölldobler, B., and O. Edwadr. 1997. *Cesta k mravencům*. Academia, Praha.
- Honigberg, B. M. 1970. Protozoa associated with termites and their role in digestion. *Biology of termites*:1–36.
- Hulbert, A. J. 2003. Life, death and membrane bilayers. *Journal of Experimental Biology* 206(14):2303–2311.
- Jemielity, S., M. Chapuisat, J. D. Parker, and L. Keller. 2005. Long live the queen: Studying aging in social insects. *Age* 27(3):241–248.

- Jemielity, S., M. Kimura, K. M. Parker, J. D. Parker, X. Cao, A. Aviv, and L. Keller. 2007. Short telomeres in short-lived males: what are the molecular and evolutionary causes? *Aging Cell* 6(2):225–233.
- Jones, S. C., J. P. La Fage, and R. W. Howard. 1988. Isopteran sex ratios: phylogenetic trends. *Sociobiology (USA)*.
- Karlson, P., and M. Lüscher. 1959. “Pheromones”: a new term for a class of biologically active substances. *Nature* 183(4653):55–56.
- Keller, L. 1998. Queen lifespan and colony characteristics in ants and termites. *Insectes Sociaux* 45(3):235–246.
- Kirkwood, T. B. L. 2005. Understanding the odd science of aging. *Cell* 120(4):437–447.
- Kirkwood, T. B. L., and M. R. Rose. 1991. Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 332(1262):15–24.
- Klemera, P., and S. Doubal. 2006. A new approach to the concept and computation of biological age. *Mechanisms of Ageing and Development* 127(3):240–248.
- Korandová, M., and R. Č. Frydrychová. 2016. Activity of telomerase and telomeric length in *Apis mellifera*. *Chromosoma* 125(3):405–411.
- Korandová, M., T. Krůček, K. Vrbová, and R. Č. Frydrychová. 2014. Distribution of TTAGG-specific telomerase activity in insects. *Chromosome Research* 22(4):495–503.
- Korb, J., and K. Hartfelder. 2008. Life history and development - A framework for understanding developmental plasticity in lower termites. *Biological Reviews* 83(3):295–313.
- Krishna, K., and F. M. Weesner. 1970. Biology of termites. Vol. 2. *Academic, New York*.
- Lepage, M., and J. P. E. C. Darlington. 2000. Population dynamics of termites. Pages 333–361 *Termites: evolution, sociality, symbioses, ecology*. Springer.
- Lüscher, M. 1977. Queen dominance in termites. Page *Proceedings of the International Congress of the International Union for the Study of Social Insects*.
- Lüscher, M. 1960. Hormonal control of caste differentiation in termites. *Annals of the New York Academy of Sciences* 89(1):549–563.

- Lüscher, M. 1972. Environmental control of juvenile hormone (JH) secretion and caste differentiation in termites. *General and Comparative Endocrinology* 3:509–514.
- Lüscher, M. 1973. The influence of the composition of experimental groups on caste development in *Zootermopsis* (Isoptera). Pages 253–256 *Proc. VII Congr. IUSSI, London*.
- Lüscher, M., and A. Springhetti. 1960. Untersuchungen über die Bedeutung der Corpora allata für die Differenzierung der Kasten bei der Termite *Kaloterme flavicollis* F. *Journal of Insect Physiology* 5(3–4):190–212.
- Mason, J. M., T. A. Randall, and R. C. Frydrychova. 2016. Telomerase lost? *Chromosoma* 125:65–73.
- McClintock, B. 1938. The fusion of broken ends of sister half-chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphases. *Mo. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.* 290:1–48.
- Medawar, P. B. 1952. Uniqueness of the Individual. Page In: *Medawar, PB An Unsolved Problem of Biology, HK Lewis*. Citeseer.
- Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7(9):405–410.
- Miura, T. 2001. Morphogenesis and gene expression in the soldier-caste differentiation of termites. *Insectes Sociaux* 48(3):216–223.
- Muller, H. J. 1928. *The production of mutation by X-rays*.
- Myles, T. G. 1986. Reproductive soldiers in the Termopsidae (Isoptera). *Pan-Pacific Entomologist* 62(4):293–299.
- Myles, T. G. 1999. Review of secondary reproduction in termites (Insecta: Isoptera) with comments on its role in termite ecology and social evolution.
- Myles, T. G., and F. Chang. 1984. The caste system and caste mechanisms of *Neotermes connexus* (Isoptera: Kalotermitidae). *Sociobiology (USA)*.
- Nagin, R. 1972. Caste determination in *Neotermes jouteli* (Banks). *Insectes Sociaux* 19(1):39–61.
- Noirot, C. 1970. The nests of termites. *Biology of termites* 1:73–125.

- Noirot, C., and C. Bordereau. 1991. Termite polymorphism and morphogenetic hormones. *Morphogenetic hormones of arthropods* 3:295–324.
- Noirot, C., and C. Noirot-Timothee. 1969. La cuticule proctodéale des Insectes. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 101(4):477–509.
- Noirot, C., B. M. Okot-Kotber, and J. A. L. Watson. 1985. *Caste differentiation in social insects*. Pergamon Press.
- Olovnikov, A. M. 1996. Telomeres, telomerase, and aging: Origin of the theory. *Experimental Gerontology* 31(4):443–448.
- Pankiw, T., Z.-. . Huang, M. L. Winston, and G. E. Robinson. 1998. Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers. *Journal of Insect Physiology* 44(7):685–692.
- Partridge, L., N. Alic, I. Bjedov, and M. D. W. Piper. 2011. Ageing in *Drosophila*: the role of the insulin/Igf and TOR signalling network. *Experimental gerontology* 46(5):376–381.
- Pawson, B. M., and R. E. Gold. 1996. Caste differentiation and reproductive dynamics of three subterranean termites in the genus *Reticulitermes*(Isoptera: Rhinotermitidae). *Sociobiology* 28(3):241–252.
- Prowse, K. R., and C. W. Greider. 1995. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(May):4818–22.
- Ross, D. 1988. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents: mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacology & therapeutics* 37(2):231–249.
- Sahin, E., and R. A. DePinho. 2012. Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13(6):397–404.
- Saretzki, G. 2009. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. *Experimental gerontology* 44(8):485–492.
- Shay, J. W., and W. E. Wright. 2000. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1):72–76.

- Shellman-Reeve, J. S. 1997. The spectrum of eusociality in termites. *The evolution of social behavior in insects and arachnids*:52–93.
- Scheffrahn, R. H., N. Su, B. Cabrera, and W. Kern. 2014. Cuban Subterranean Termite ( proposed ), Florida Dampwood Termite ( old unofficial name ), *Prorhinotermes simplex* ( Hagen ) ( Insecta : Isoptera :(September 2017):1–3.
- Slessor, K. N., M. L. Winston, and Y. Le Conte. 2005. Pheromone Communication in the Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Chemical Ecology* 31(11):2731–2745.
- Smedal, B., M. Brynem, C. D. Kreibich, and G. V. Amdam. 2009. Brood pheromone suppresses physiology of extreme longevity in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology* 212(23):3795–3801.
- Stearns, S. C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford University Press Oxford.
- Tasaki, E., K. Kobayashi, K. Matsuura, and Y. Iuchi. 2017. An efficient antioxidant system in a longlived termite queen. *PLoS ONE* 12(1):1–16.
- Thorne, B. L. 1997. Evolution of eusociality in termites. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28(1):27–54.
- Thorne, B. L., N. L. Breisch, and M. I. Haverty. 2002. Longevity of kings and queens and first time of production of fertile progeny in dampwood termite (Isoptera; Termopsidae; Zootermopsis) colonies with different reproductive structures. *Journal of Animal Ecology* 71(6):1030–1041.
- Traniello, J. F. A., and R. B. Rosengaus. 1997. Ecology, evolution and division of labour in social insects. Elsevier.
- Weber, P. 2000. *Minimum z klinické gerontologie: pro lékaře a sestru v ambulanci*. 1. IDVPZ, Brno.
- De Wilde, J., and J. Beetsma. 1982. The physiology of caste development in social insects. *Advances in Insect Physiology* 16:167–246.
- Wilson, E. O. 1971. *The Insect Societies*. Page Cambridge Belknap Press of Cambridge University Press.
- Wright, W. E., M. A. Piatyszek, W. E. Rainey, W. Byrd, and J. W. Shay. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental genetics* 18(2):173–179.