

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Změny v telomerázové aktivitě u dlouhověké zimní
generace dělnic včely medonosné (*Apis mellifera*)**

Bakalářská práce

Miloslav Brejcha

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

České Budějovice 2019

Brejcha, M., 2019: Změny v telomerázové aktivitě u dlouhověké zimní generace dělnic včely medonosné (*Apis mellifera*). [Changes in the telomerase activity in the long-lived winter generation of honey bee (*Apis mellifera*) workers. Bc. Thesis, in Czech] – 35 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Telomerase activity was compared between the long-lived winter generation and the short-lived summer generation of *Apis mellifera* workers. Transcription levels of endocrine signaling determinants associated with aging were compared between these generations. Effects of photoperiod and egg laying rate on the telomerase activity of the winter generation of honey bee workers were tested.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 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 17. dubna 2019

.....
Miloslav Brejcha

Poděkování:

Především bych chtěl poděkovat své školitelce RNDr. Radmile Čapkové Frydrychové, PhD. za její odborné vedení, cenné rady a trpělivost, které mi ochotně poskytla během vypracovávání této práce. Dále děkuji ostatním členům naší laboratoře, hlavně Tomášovi a Justině, za veškerou pomoc při práci v laboratoři. Na závěr mé díky patří hlavně rodině za všechnu její podporu během mého dosavadního studia.

Obsah

1	ÚVOD	1
1.1	Proces stárnutí a jeho mechanismy	1
1.1.1	Radikálová teorie stárnutí.....	1
1.1.2	Teorie chyby a katastrofy	2
1.1.3	Signální dráhy a stárnutí.....	2
1.1.4	Evoluční teorie	5
1.2	Telomery	7
1.2.1	Struktura telomer.....	7
1.2.2	Zkracování telomerické DNA a funkce telomerázy	8
1.2.3	Regulace telomerázy	9
1.2.4	Telomery a stárnutí.....	10
1.3	Poplatek za reprodukci a sociální hmyz	10
1.4	Včela medonosná: polyetismus a stárnutí	11
1.5	Včely a telomerázová aktivita	14
2	Cíl práce	16
3	Materiál a metody.....	16
3.1	Použitý druh	16
3.2	Ovlivnění množství plodu a jeho feromonu v úlech	16
3.3	Ovlivnění fotoperiody	17
3.4	Příprava proteinových extraktů	17
3.5	Kvantifikace proteinů.....	17
3.6	TRAP assay – telomere repeat amplification protocol.....	17
3.7	Vyhodnocení transkripčních hladin.....	18
3.8	Statistické vyhodnocení.....	19
4	Výsledky	20
4.1	Rozdíl v aktivitě telomerázy v jednotlivých tkáních zimních a letních dělnic.....	20
4.2	Transkripční hladiny determinantů endokrinní signalizace dělnic letní a zimní generace..	21
4.3	Vliv množství včelího plodu a jeho feromonu na aktivitu telomerázy u včelích dělnic	22
4.4	Vliv fotoperiody na aktivitu telomerázy u zimní generace včelích dělnic	23
5	Diskuze.....	24
6	Závěr	26
7	Literatura	27

1 ÚVOD

1.1 Proces stárnutí a jeho mechanismy

Příčiny a mechanismy stárnutí neboli senescence, jsou přirozeným předmětem lidského zájmu již od nepaměti. Proces stárnutí je na organismální úrovni patrný charakteristickými poklesy ve výkonosti a kondici, postupným snižováním až úplnou ztrátou reprodukce a zvýšenou mortalitu (Troen, 2003; Hughes a Reynolds, 2005). Na buněčné úrovni se stárnutí projevuje zvyšujícím se výskytem mutací na úrovni DNA, hromaděním chybných metabolických produktů či vyšším oxidačním stresem, tedy procesy, které v určitých případech mohou vést až k apoptóze buňky (Orgel, 1963; Sohal a Weindruch, 1996; Levine, 2002).

Pro vysvětlení procesu stárnutí bylo dosud vytvořeno velké množství, často velmi dobře se navzájem doplňujících teorií. V současnosti uznávané teorie jsou pak povětšinou rozdělovány do dvou skupin, z nichž první zahrnuje teorie stochastické, popisující stárnutí převážně jako důsledek nahromadění náhodných chyb v molekulách buněk a tím způsobující fyziologický pokles a stárnutí (Troen, 2003), a teorie mechanistické, snažící se vysvětlit mechanismy, které za stárnutím stojí (Hughes a Reynolds, 2005). Ve druhé skupině jsou pak zahrnuty teorie evoluční či programovaného stárnutí nahlížející na stárnutí jako jakýsi genetický program (Hughes a Reynolds, 2005; Troen, 2003).

1.1.1 Radikálová teorie stárnutí

Radikálová teorie stárnutí vysvětluje proces stárnutí působením volných radikálů, a to především ze skupiny tzv. reaktivních forem kyslíku (ROS), které způsobují četné škody na buněčných molekulách jako lipidy, proteiny a DNA (Harman, 1956). Volné radikály jsou atomy a molekuly obsahující nespárovaný elektron a díky tomu jsou velmi reaktivní. Vznikají běžně v organismu během metabolických pochodů s tím, že k jejich největší produkci dochází v mitochondriích během procesu buněčného dýchání jako vedlejší produkt při transportu elektronů přes vnitřní mitochondriální membránu ke kyslíku (Sergiev, Dontsova a Berezkin, 2015). Mezi ROS patří superoxid (O_2^-), který je působením enzymů superoxid dismutáz (SOD), vyskytujících se v různých formách v mitochondriích, přeměněn na peroxid vodíku (H_2O_2). Peroxid vodíku následně může být transformován pomocí enzymu katalázy

na kyslík a vodu, nebo dává vzniku hydroxylovému radikálu ($\text{OH}\cdot$), který je vysoce reaktivní a má negativní vliv na makromolekuly (Fridovich, 1989; Sohal a Weindruch, 1996; Sergiev, Dontsova a Berezkin, 2015).

ROS mají vliv na regulaci genové exprese, buněčnou replikaci, diferenciaci a na apoptózu, při které mohou působit jako sekundární přenašeči signálu v signálních drahách (Sen a Packer, 1996; Suzuki, Forman a Sevanian, 1997). Mají vysoký mutagenní potenciál vůči DNA, a to zejména mitochondriální DNA, u níž jejich působení vede k defektům v procesech dýchacího řetězce a tím gradující produkci ROS v průběhu života jedince, apoptóze mitochondrií a celkově tak snížení bioenergetické kapacity buněk (Fleming *et al.*, 1982; Linnane *et al.*, 1992; Ozawa, 1997). Jejich zastoupení v tkáních savců, jako je srdce či ledviny, pozitivně koreluje se stářím (Sohal *et al.*, 1989). Zvýšený výskyt ROS je spojován i s nemocemi vázajícím se ke stárnutí jako je Parkinsonova choroba (Schapira *et al.*, 1990).

1.1.2 Teorie chyby a katastrofy

Teorie chyby a katastrofy (Error-catastrophe theory) přikládá podíl na stárnutí chybám při syntéze molekul podílejících se na dalších syntézách. Jestliže nejsou tyto chybné molekuly včas buňkou degradovány, nastane situace, kdy chybné produkty dávají vznik dalším chybným produktům a tento proces se neustále opakuje dále. Chybné molekuly se pak mohou kumulovat až do hraničního stavu, neslučitelného s funkčností a životem buňky – katastrofy (Orgel, 1963; Troen, 2003). V některých pokusech se však ukazuje, že příčina vzniku chybných proteinů ve stárnoucích organismech, není chybná syntéza ale post-translační oxidace či glykace (Levine a Stadtman, 2001; Levine, 2002).

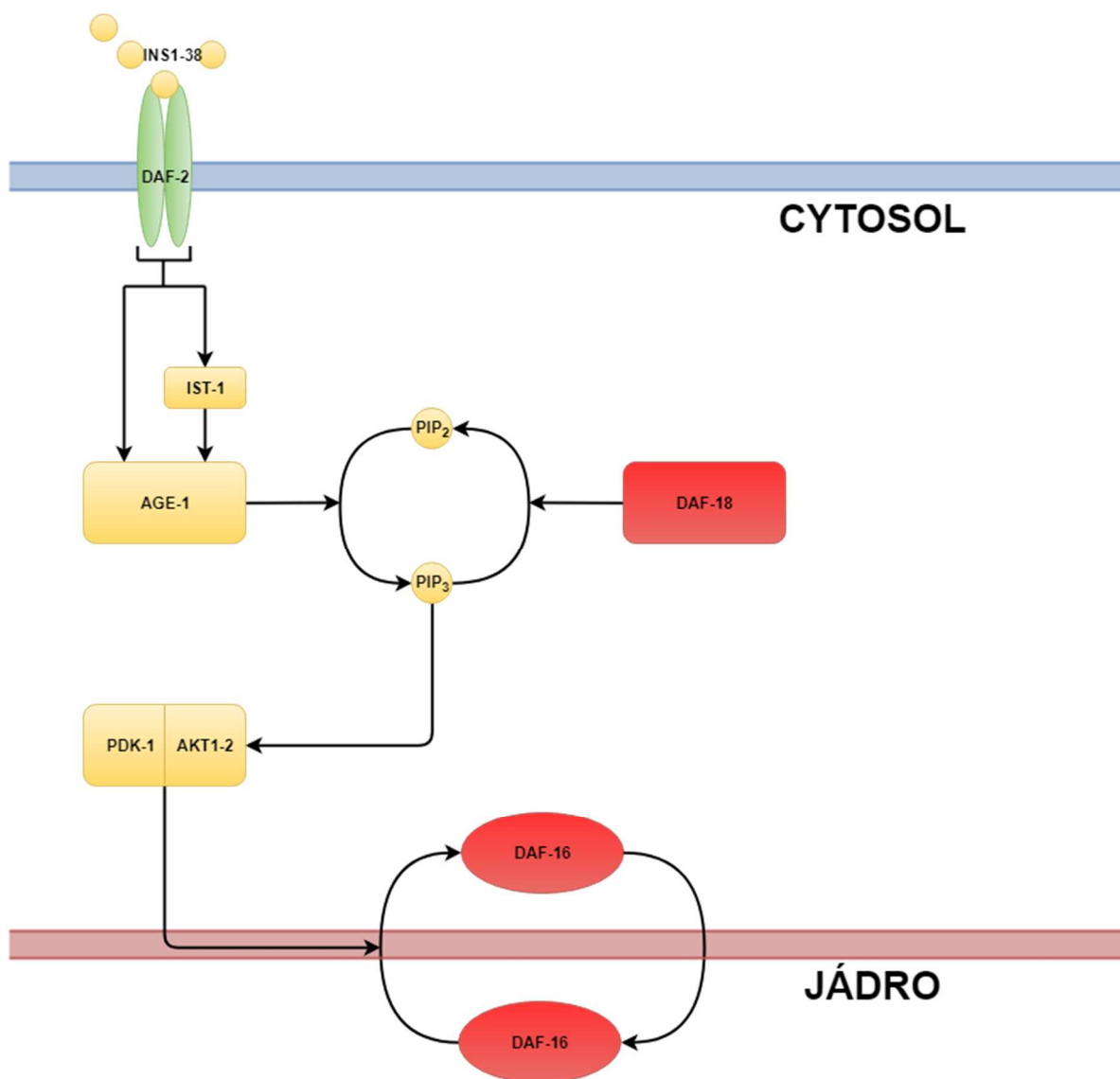
1.1.3 Signální dráhy a stárnutí

Při zkoumání mutací prodlužujících délku života u modelových organismů jako hád'átko (*Caenorhabditis elegans*) a octomilka (*Drosophila melanogaster*) se zjistilo, že velký počet těchto mutací se týká buněčných signálních drah, které reagují na příjem potravy a podmínky vnějšího prostředí, jako je dráha TOR či dráha Insulin/IGF-1 signální dráha (IIS) (Dorman *et al.*, 1995; Clancy *et al.*, 2001; Hughes a Reynolds, 2005), a tedy že stáří je regulováno hormonálně (Kenyon, 2010).

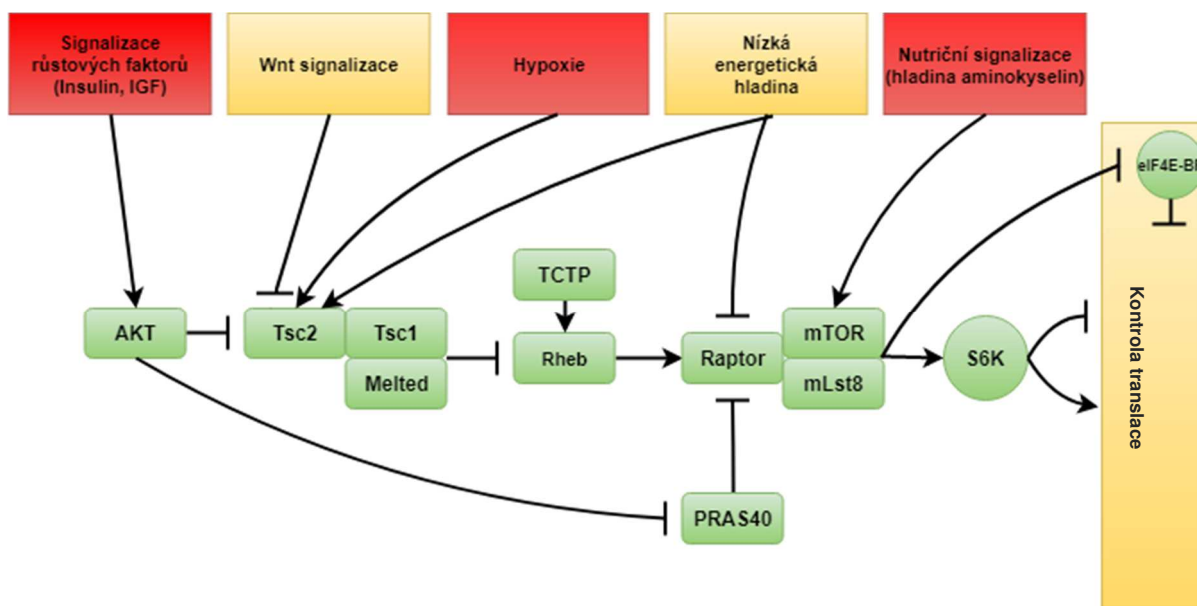
IIS dráha, která je napříč živočišnými druhy velmi konzervovaná, koordinuje buněčnou diferenciaci, růst a metabolismus organismu v odpovědi na měnící se podmínky vnějšího

prostředí a dostupnosti potravy (Kenyon, 2010). Například u *C. elegans* začíná dráha sekrecí několika insulinových peptidů jako odpovědi na potravu (Obr. 1). Tyto peptidy se následně váží na receptor DAF-2 (inzulin/IGF-1 tyrosinkinázový receptor). Takto aktivovaný receptor předává signál dále, a to buď přímo, nebo přes protein IST-1, na fosfatidilinositol 3-kinázu AGE-1, která přeměňuje fosfolipid PIP₂ na sekundární přenašeč PIP₃. PIP₃ může být zpětně defosforylován na PIP₂ fosfatázou DAF-18. Zvýšená hladina PIP₃ aktivuje 3-fosfoinositid dependentní kinázu-1 (PDK1) a protein kinázu B (PKB1-2, také známá jako AKT1-2), které následně fosforylují DAF-16, což je transkripční faktor homologický savčí rodině faktorů FoxO. Tato fosforylace vede k jeho translokaci z jádra do cytoplasmy (Morris, Tissenbaum a Ruvkun, 1996; Ogg *et al.*, 1997; Paradis *et al.*, 1999; Wolkow *et al.*, 2002). Cílové geny DAF-16 transkripčního faktoru jsou geny odpovědi na stress, geny kódující antimikrobiální peptidy a metabolické geny (Murphy *et al.*, 2003). Mutace redukující funkci DAF-2 nebo kináz zapojených v IIS dráze vedou k prodloužení života či vyšší odolnosti vůči stresu u *C. elegans* (Dorman *et al.*, 1995; Kimura *et al.*, 1997; Kenyon, 2010). Mutace snižující aktivitu DAF-16 vedou naopak ke snížení životnosti *C. elegans*. Stejně tak u *D.melanogaster*, jejíž ISS dráha je silně podobná dráze *C. elegans*, vedly mutace insulinového receptoru či jeho substrátu CHICO k prodloužení života (Clancy *et al.*, 2001; Tatar *et al.*, 2001; Toivonen a Partridge, 2009).

TOR (target of rapamycin) signalizační dráha, která je rovněž velmi konzervovaná napříč živočišnými druhy, přijímá informace z více signalizačních drah najednou, a to v tzv. TOR signalizačním jádře, které je přeposílá dále a má tak vliv na regulaci translace, mitochondriální oxidativní fosforylaci, regulátory apoptózy a odolnost vůči stresu. Hovoří se o takzvané modulární struktuře TOR dráhy (Obr. 2) (Manning *et al.*, 2002; Inoki, Corradetti a Guan, 2005; Evans *et al.*, 2011). Jednotlivé signální dráhy vstupující do TOR jádra a následně buď přímo, nebo pomocí kaskády dalších komponentů TOR jádra, regulují aktivitu proteinového komplexu TORC1 skládajícího se z serin/threonin kinázy TOR (mTOR) společně s proteiny Raptor a mLst8. Ten následně aktivací S6 kinázy, či represí regulátorů translace 4E-BP, reguluje další cíle (Guertin a Sabatini, 2005). Jednou ze vstupních drah je tzv. nutriční signalizace odpovídající na množství aminokyselin v potravě, kdy nedostatek aminokyselin působí jako silný inhibitor TORC1 (Hara *et al.*, 1998). S tím souvisí to, že všeobecně známá spojitost mezi dietní restrikcí a prodloužením života je zprostředkována právě pomocí TOR signalizace (Kapahi *et al.*, 2010).



Obr. 1: Příklad zjednodušené IIS signální dráhy bezobratlých u *Caenorhabditis elegans*. Insulinové peptidy se jako ligandy vážou na receptor DAF-2. Po aktivaci receptoru je signál převeden buď přímo, a nebo skrze protein IST-1 (insulin receptor substrate homolog protein-1) na fosfatidylinositol 3-kinázu (PI-3K) neboli AGE-1. Ta následně konvertuje fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát (PIP₂) na fosfatidylinositol-3,4,5-trisfosfát (PIP₃). Ten slouží jako sekundární přenašeč a jeho zvyšující se hladina aktivuje 3-fosfoinositid dependentní kinázu-1 (PDK1) zároveň s protein kinázou B (PKB1-2 neboli AKT1-2). Tato aktivace vede k fosforylaci transkripčního faktoru DAF-16 těmito kinázami a jeho translokaci z jádra do cytoplasmy. PIP₃ může být zpětně defosforylován fosfatázou DAF-18 (Morris, Tissenbaum a Ruvkun, 1996; Ogg *et al.*, 1997; Paradis *et al.*, 1999; Wolkow *et al.*, 2002).



Obr. 2: Schéma TOR signalačního komplexu. Signalační jádro TOR je jakýsi uzel shromažďující informace z mnoha signálních vstupů, a to signalizace růstových faktorů jako insulin a Wnt, hypoxie, energetického stresu a nutričních hladin. Tyto signální vstupy sledují intra- i extracelulární podmínky a na základě jejich aktivace regulují chod 2 základních komponent TOR jádra. Těmito komponentami jsou tumor supresorový gen tuberózní sklerózy 2 (Tsc2) a TOR komplex 1 (TORC1) skládající se z serin/threonin kinázy TOR (mTOR) a proteinů Raptor a mLst8 (Manning *et al.*, 2002; Guertin a Sabatini, 2005; Inoki, Corradetti a Guan, 2005). V nefosforylovaném stavu je Tsc2 v komplexu s proteiny Tsc1 a Meded a inhibuje funkci GTPázy Rheb aktivovat TORC1, který by jinak skrze aktivaci S6K kinázy nebo represí proteinu eIF4E-BP kontroloval translaci (Harris a Lawrence, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Manning, 2004; Pan *et al.*, 2004; Guertin a Sabatini, 2005). Inzulínová signalizace pomocí aktivace proteinkinázy B (AKT) fosforyluje Tsc2 a tím zabraňuje inhibici Rheb, nebo fosforyluje protein PRA S40 a zamezuje mu tak ve vazbě a inhibici TORC1 (Sancak *et al.*, 2007). Nízké energetické hladiny vedou k aktivaci AMP-dependentní kinázy a ta následně fosforylací inhibuje Raptor, či aktivuje Tsc2 (fosforylací na jiném místě než AKT) (Shaw *et al.*, 2004; Shaw, 2009). Hypoxie vede k aktivaci Tsc2 (DeYoung *et al.*, 2008) a stimulace Wnt receptorů naopak k jeho deaktivaci (Inoki *et al.*, 2006; van Amerongen a Nusse, 2009). Dostatek aminokyselin vyúsťuje k aktivaci TORC1 (Nicklin *et al.*, 2009).

1.1.4 Evoluční teorie

Evoluční teorie stárnutí vychází ze základu obecné evoluční teorie, která předpokládá vznik senescence jako spontánního děje během evoluce nestárnoucích populací. U teoreticky nestárnoucí populace je míra úmrtí a reprodukce stejná pro každou věkovou strukturu a tato populace podléhá jen takzvané vedlejší, to je s věkem nespojené, mortalitě. Nově vznikající mutace, které znevýhodňují jedince v přežívání a reprodukci v nízkém věku, budou z populace daleko dříve vyselektovány než škodlivé mutace působící ve starším věku. Z toho vyplývá, že mutace škodící ve starším věku se stanou neviditelné pro selekci a v průběhu mnoha generací se akumulují a jejich frekvence v populaci naroste. Z nestárnoucí populace se stane populace stárnoucí (Hamilton, 1966; Hughes a Reynolds, 2005).

Z tohoto modelu vychází i teorie nahromadění mutací vyslovená v roce 1952 Peterem Medawarem. Medawar vycházel z pozorování lidských genetických chorob, které se projevují právě až ve stáří, nebo jejich efekt postupně s věkem vzrůstá jako například u Huntingtonovy choroby. Senescence je tedy podle této teorie následek hromadění škodlivých mutací mající samostatně slabý efekt na fitness, tím dlouhodobě unikající selekci, a projevují se až se stoupajícím věkem (Le Bourg, 2001; Hughes a Reynolds, 2005).

Další teorie pak tuto myšlenku rozvedly dále, tak aby zahrnovala i koncept „trade-off“. Přežití a rozmnožování organismů vyžaduje investici zdrojů, jejichž množství je však většinou omezené. Zvýhodnění jednoho znaku usnadňujícího rozmnožování, může mít za následek znemožnění či zhoršenou schopnost dalšího rozmnožování nebo přežívání a naopak. Pro organismy je tedy výhodné, aby při přerozdělování zdrojů vznikl kompromis („trade-off“), maximalizující jejich celoživotní reprodukční úspěch (Stearns, 1989, 1992).

První z teorií obsahující i tento kompromis byla teorie antagonistické pleiotropie (Williams, 1957). Genová pleiotropie spočívá v tom, že daný gen je svým účinkem v organismu schopen ovlivňovat více znaků než jeden, a jedním z projevů pleiotropie mohou být i rozdílné účinky pleiotropního genu v různých vývojových či věkových stádiích. Pokud v organismu dojde k mutaci, která zvyšuje fitness jedince během jeho mládí, a naopak ho znevýhodňuje v pokročilejším věku, je tato mutace v populaci ukotvena, protože mladší generace bude mít vyšší úspěšnost v reprodukci a přežívání (Williams, 1957; Hughes a Reynolds, 2005).

Teorie nazvaná Disposable soma theory (Kirkwood, 1977; Kirkwood a Holliday, 1979) obohatila předchozí teorii antagonistické pleiotropie o další koncept kompromisů. Organismy přerozdělují svoji energii mezi vývojem, reprodukčními pochody a funkcemi udržujícími a opravujícími somatické buňky. Tato teorie pak mluví o skupině pleiotropních genů, které alokují energii z údržby a oprav somatických buněk na reprodukční pochody. Druhy organismů, které nejvíce energie investují do reprodukce a na údržbu a opravy využívají jen minimální množství dostatečné pro přežití, získávají selekční výhodu, protože v případě, kdy je přežívání druhu nejisté, je významnější investovat více zdrojů do úspěšné reprodukce než do dalšího přežívání (Kirkwood a Holliday, 1979; Le Bourg, 2001; Kriete, 2013).

1.2 Telomery

Telomery jsou nukleoproteinové komplexy nalézající se na koncích lineárních eukaryotních chromozomů. Během procesu replikace DNA není DNA polymeráza schopna řetězce dosyntetizovat až do konce, a tak dochází ke ztrátám terminálních sekvencí tzv. telomerickým ztrátám. Díky přítomnosti repetitivní telomerické sekvence jsou od této ztráty uchráněny geny ležící v blízkosti chromozomálních konců. Další význam telomer je v napomáhání rozeznání přirozených konců chromozomů od chromozomálních zlomů a ochrana před působením nukleáz (Blackburn, Greider a Szostak, 2006; Lin, Epel a Blackburn, 2012).

1.2.1 Struktura telomer

Sekvence telomerické DNA se skládá z repetitivních sekvencí s obecným vzorcem $(TxAyGz)_n$. Tento vzorec je v rámci eukaryotních organismů značně konzervovaný, ale přesná sekvence se může v různých skupinách lišit (Zakian, 1995; Makarov, Hirose a Langmore, 1997; Frydrychova a Mason, 2013). Například u většiny vyšších rostlin a zelených řas je telomerickou sekvencí $(TTTAGGG)_n$, v rámci obratlovců $(TTAGG)_n$ a hub a amoebozoí je to nejčastěji sekvence $(TTAGGG)_n$ (Meyne, Ratliff a Moyzis, 1989; Wellinger a Sen, 1997; Fajkus, Sýkorová a Leitch, 2005; Frydrychova a Mason, 2013). U kmene Arthropoda (bezobratlí) byla jako ancestrální telomerická sekvence identifikovaná sekvence $(TTAGG)_n$ (Sahara, Marec a Traut, 1999), nicméně v rámci hmyzu došlo k četným ztrátám této sekvence a jejímu nahrazení jinou krátkou repetitivní sekvencí, jako je sekvence $TCAG_2$ u brouků druhu *Tenebrionoidea* nebo nekanonickými sekvencemi, jako jsou dlouhé satelitní sekvence DNA u několika zástupců rodu *Chironomus*, či telomerické retroelementy v případě drozofily (Nielsen a Edström, 1993; Frydrychová a Marec, 2002; Frydrychová *et al.*, 2004; Mason, Frydrychova a Biessmann, 2008; Mravinac *et al.*, 2011).

U telomerické DNA se na konci vyskytuje krátký jednovláknový 3' přesah bohatý na guanin, který se skládá směrem zpět a váže se s komplementární sekvencí druhého vlákna, čímž vytváří smyčku pojmenovanou T-loop. Tato smyčka napomáhá v ochraně volných konců (Makarov, Hirose a Langmore, 1997; Griffith *et al.*, 1999).

Na chromozomálních koncích se vytváří multiproteinová struktura označovaná jako telomerická čepička. Právě tato struktura pomáhá buňce rozeznat konce chromozomů od dvouvláknových zlomů. Nefunkčnost telomerické čepičky vede k aktivaci mechanismů

reagujících na poškozenou DNA, následkem čehož dochází k chromozomálním fúzím, tvorbě cirkulárních chromozomů či případně k apoptóze (Linger a Price, 2009). Tato struktura se u člověka skládá z multiproteinu shelterinu, specificky se vázajícího na telomerickou DNA, a dalších telomerických proteinů. Shelterin tvoří 6 proteinů, a to TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1 a Rap1. Proteiny TRF1 a TRF2 (telomeric repeat-binding factor), které se vážou na dvouvláknovou telomerickou DNA, interagují s TIN 2 (interacting nuclear factor 2) a TPP1 (tripeptidil peptidáza). TIN2 a TPP1 vytvářejí spojnici mezi proteinem TRF a proteinem POT1, což je protein nasedající na přesahující jednovláknový konec telomerické DNA, a umožňují formaci a stabilizaci smyčky T-loop (Smogorzewska a de Lange, 2004; Palm a de Lange, 2008).

1.2.2 Zkracování telomerické DNA a funkce telomerázy

Během replikace DNA dochází ke zkracování telomerické sekvence. Příčinou je způsob syntézy nových řetězců pomocí DNA polymerázy (Blackburn, 1991). DNA polymeráza nesyntetizuje nové řetězce *de novo*. Pro zahájení syntézy je potřeba krátkých RNA primerů komplementárních k templátovému řetězci, k jejichž 3' konci DNA polymeráza přidává nové nukleotidy a syntéza tak probíhá ve směru 5' → 3'. RNA primery jsou následně odstraněny a vzniklé mezery doplněny za pomoci 3' konce dalšího syntetizovaného úseku. Problém ale nastává po odstranění primerů z úplných 5' konců obou řetězců (jak vedoucího, tak opoždujícího se řetězce), protože za těmito úseky již není žádná další sekvence od jejíhož 3' konce by mohla DNA polymeráza započít syntézu. Tímto způsobem se s každou replikací zkracuje délka telomer (Snustad, Simmons a Relichová, 2009).

Nejběžnějším řešením zkracujících se telomer je aktivita enzymu telomerázy. Telomeráza je ribonukleoproteinový komplex skládající se ze dvou hlavních částí, a to TERT (telomerase reverse transcriptase) a TERC (telomerase RNA component). TERC je krátká molekula RNA, pomocí které telomeráza rozeznává jednovláknový 3' konec templátového řetězce. Reverzní transkriptáza TERT následně využívá TERC jako templát k prodloužení tohoto řetězce. Při dostatečném prodloužení již může nasedat další RNA primer a DNA polymeráza je schopna dosyntetizovat další část komplementárního řetězce. Po odstranění primeru vzniká opět terminální jednovláknová část, ovšem vzhledem k předchozímu prodloužení pomocí telomerázy již není toto závěrečné zkrácení podstatné (Greider a Blackburn, 2004; Zhou *et al.*, 2014).

Aktivita telomerázy se značně liší mezi různými typy buněk. Zatímco u většiny somatických buněk se u člověka v dospělosti nevyskytuje, je tato aktivita vysoká u buněk silně proliferujících, jako jsou buňky epiteliální, kmenové, zárodečné, hematopoetické nebo embryonální. Vysoká aktivita telomerázy je typická pro rakovinové buňky (Greider, 1998; Zhu, Belcher a Van Der Harst, 2011).

1.2.3 Regulace telomerázy

Telomeráza je regulovaná pomocí genetických, epigenetických a enviromentálních faktorů. Jedná se především o regulaci transkripce jednotek TERT a TERC, posttranskripční a posttranslační modifikace TERT a o navázání telomerázy k chromozomálním koncům a její procesivitu. Intenzivně byl zkoumán promotor lidského TERT (Cairney a Keith, 2008; Kyo *et al.*, 2008) s tím, že byla objevena celá řada vazebných míst transkripčních faktorů umožňující regulaci exprese TERT. Telomerázová exprese je například spouštěna pomocí onkogenu c-Myc a naopak potlačena tumor-supresorem WT1. Zvýšená exprese c-Myc pozorovaná u rakovinových buněk je spojena s vyšší aktivitou telomerázy (Grandori a Eisenman, 1997; Kyo *et al.*, 2008). Inaktivace WT1 je spojená s telomerázovou aktivitou během vzniku nádoru (Horikawa a Barrett, 2003).

Několik případů poukazuje na epigenetické utlumení transkripce TERT. Pro příklad, CTCF, což je izolátor regulující genovou transkripci skrze organizaci chromatinových domén (Ohlsson, Renkawitz a Lobanenkov, 2001), potlačuje expresi TERT prostřednictvím své vazby na první exon TERT (Renaud *et al.*, 2005).

Je obvyklé, že hladina m-RNA TERT často nekoreluje s aktivitou telomerázy, protože aktivita telomerázy je významně ovlivňována posttranslační fosforylací TERT (Kharbanda *et al.*, 2000), či degradací TERT skrze ubiquitin (Kim *et al.*, 2005).

A konečně, hlavní roli v regulaci procesivity telomerázy a její nasedání k telomerám hraje komplex proteinů POT1 a TPP1 (Loayza a de Lange, 2003; Wang *et al.*, 2007; Xin *et al.*, 2007).

1.2.4 Telomery a stárnutí

Délka telomer je jedním z faktorů stárnutí. Postupné zkracování telomer až na limitní hranici má negativní vliv na stabilitu a funkčnost genomu dané buňky a vede k senescenci a apoptóze (Gong *et al.*, 1999; Shammass, 2011). Zdá se ale, že délka telomer přímo neovlivňuje rozdíl v životnosti mezi jednotlivými druhy. Např., v porovnání s člověkem jsou myši telomery delší, navíc somatické buňky dospělých myši často vykazují telomerázovou aktivitu, a přesto se myši dožívají zlomku délky života člověka (Blasco, 2005). Rozdíly v délce a zkracování telomer u jedinců téhož druhu ale korelují s jejich životností a stářím. A to je patrné například u člověka, u něhož většina somatických buněk v dospělém věku nevykazuje aktivitu telomerázy (Hornsby, 2007). Délka lidských telomer tedy souvisí s omezenou proliferační kapacitou somatických buněk a dá se považovat za biologický ukazatel stárnutí a dlouhověkosti (Zhu, Belcher a Van Der Harst, 2011).

Délka telomer a aktivita telomerázy nejsou určeny jen geneticky ale jsou ovlivňovány i řadou endo- i exogenních faktorů, jako je zdravotní stav, psychický i emoční stres či strava, a to vše i ve spojitosti s životním stylem či sociálním postavením (Shammass, 2011; Zhu, Belcher a Van Der Harst, 2011). Udává se ovšem, že největším činitelem ve zkracování telomer je oxidativní stres. Díky vysokému obsahu guaninu jsou totiž telomery vůči oxidativnímu stresu velmi citlivé a jejich zkracování vlivem oxidativního stresu je považované za daleko výraznější než v případě replikačního (von Zglinicki, 2002; Matthews *et al.*, 2006).

1.3 Poplatek za reprodukci a sociální hmyz

„Cost of reproduction“ (poplatek za reprodukci) je fenoménem popisujícím kompromis („trade-off“) mezi reprodukcí a délkou života. U většiny organismů má vyšší investice zdrojů do rozmnožování důsledek ve snížené schopnosti dalšího přežívání, a naopak menší míra rozmnožování životnost zvyšuje (Williams, 1966; Reznick, 1985; Harshman a Zera, 2007). V tomto ale představuje sociální hmyz, zvláště ten z řádu *Hymenoptera* (blanokřídlí) a infrařádu *Isoptera* (termity), velkou výjimku. Ve společenstvech sociálního hmyzu se totiž reprodukční jedinci (královny a králové) dožívají v průměru mnohonásobně vyššího věku než jedinci z nereprodukčních kast (dělníci a vojáci). Krom toho, reprodukční kasty jsou velmi dlouhověké i v porovnání s blízkými příbuznými soliterními druhy (Carey, 2001).

Obecně se dělníci a vojáci dožívají délky života v rádech týdnů či měsíců, kdežto reprodukční jedinci mohou žít v řádu let. Na příklad je to 5-8 let u včely medonosné (Page Jr a Peng, 2001; Remolina a Hughes, 2008) nebo až desítky let u některých druhů mravenců či termitů (Gay a Calaby, 1970; Grassé, 1984; Keller, 1998). Vznik dlouhověkosti u královen může být důsledkem jejich minimálního vystavení negativním environmentálním efektům v již úspěšně založených hnízdech, kdy toto nebezpečí přebírají nereproduktivní kasty a ony se mohou zaměřit jen na reprodukci. Plní tak úlohu jakýchsi „kmenových buněk“ v kolonii, která je přirovnávána k superorganismu, v němž dělnice vykazují vlastnosti jako tzv. „Disposable soma“ (Williams, 1966; Kirkwood, 1977; Keller a Genoud, 1997). Pojmem superorganismus jsou kolonie sociálního hmyzu přirovnávány k mnohobuněčnému organismu, kde jako jeho buňky, tkáně či orgány figurují jednotliví členové kolonie. Stejně jako jsou v tkáních skupiny buněk specializované k určitým úkonům, tak i ve společenstvech sociálního hmyzu jsou skupiny organizovaných jedinců plnící určité poslání (Hölldobler a Wilson, 2009).

1.4 Včela medonosná: polyetismus a stárnutí

Ve společenstvu včely medonosné (*Apis mellifera*) existují dvě samičí kasty, a to královna zajišťující reprodukci a dělnice. U dělnic probíhá dělba práce zajištěná pomocí věkového polyetismu. To znamená, že včely v návaznosti na svůj rostoucí věk přecházejí od jedné činnosti v úlu ke druhé (Seeley, 1982; Johnson, 2003, 2005, 2008). V prvních přibližně 21 dnech života se dělnice nacházejí ve stádiu mladušek, kdy zajišťují práce uvnitř úlu. Nově vylíhlé včely mají funkci čističek starajících se o čistotu plástů (Seeley, 1982). Ve věku 4-12 dní fungují jako kojičky, které pomocí hypofarygeálních žláz produkují potravu pro včelí plod, popřípadě jsou členy skupiny starající se o matku (Seeley, 1982; Winston, 1987). Následně dělnice přijímají řadu funkcí jako opravářky či stavitelky včelího díla, ventilaci, strážkyně česna a v konečném stádiu přebírají nektar od přilétajících létavek a přetvářejí ho v med, který ukládají do plástů (Seeley, 1982; Trumbo, Huang a Robinson, 1997; Johnson, 2003, 2008). Při dosažení věku okolo 21 dnů dochází k přechodu dělnice ze stádia mladušky na létavku, která má za úkol sběr nektaru, pylu a vody a jejich transport do úlu (Robinson, 1992; Seeley, 1995; Calderone, 1998). Přechody při dělbě práce jsou kromě behaviorálních změn spojené i s řadou fyziologických změn a se změnami v genové expresi. Příkladem může být zakrnění hypofaryngeálních žláz u létavek (Robinson, 2009).

Tento věkový polyteismus probíhá pouze u letní generace včel líhnoucí se přibližně od března do poloviny srpna. U zimní generace, která se líhne ke konci srpna a jejíž úkolem je udržení existence včelstva v průběhu zimních měsíců, jsou činnosti v rámci úlu rozděleny rovnoměrně mezi všechny dělnice (Winston, 1987). V průběhu zimy dělnice udržují stálou teplotu v zimním chomáči a asi v polovině zimy začínají s péčí o novou generaci letních včel (Sekiguchi a Sakagami, 1966; Southwick, 1983; Winston, 1987; Seeley, 2014).

Mezi jednotlivými skupinami včel nejsou jen fyziologické rozdíly, umožňující dělbu práce, ale i rozdíly v dlouhověkosti a rychlosti stárnutí. Dělnice letní generace se dožívají přibližně 4 až 5 týdnů, přičemž proces stárnutí je velmi urychlen při přechodu z mladušky na létavku (Johnson, 2010). U zimní generace je pak stárnutí utlumeno a tyto včely se dožívají 8-9 měsíců. Nejmarkantnější rozdíl je v případě královny, která se v přirozených podmínkách dožívá 6 let, v extrémních případech až 8 let (Page Jr a Peng, 2001; Remolina a Hughes, 2008).

Ačkoliv přesný mechanismus rozdílu v dlouhověkosti napříč kastami není znám, může být vysvětlen pomocí odlišností v hormonální regulaci mezi jednotlivými kastami v souvislosti s jejich nutričním stavem.

Největší podíl na kastovní diferenciaci má zřejmě složení a množství potravy. Patrně je to v případě krmení mateří kašičkou. Mateří kašička je sekret hypofaryngeálních žláz kojiček bohatý na proteiny, lipidy, sacharidy a řadu bioaktivních látek, který hraje důležitou roli v přesmyku vývoje dělničí larvy na královnu. Zatímco obyčejné larvy dělnic jsou mateří kašičkou krmeny jen po první 3 dny, larva královny je jí krmena po celou dobu vývoje a následně i po celý dospělý život. Zdá se, že podávání mateří kašičky vede u matky v porovnání k dělnicím k rychlejšímu vývoji, větší velikosti těla, morfologickým odlišnostem a k vyšší genové aktivitě (Buttstedt, Moritz a Erler, 2014; Buttstedt *et al.*, 2016).

Nutriční stav se odráží v aktivitě signalizačních drah TOR a IIL. Ty na základě informací o složení potravy kontrolují růst larev a informace z nich jsou dále předávány signalizační kaskádou dalším faktorům endokrinní kontroly, mezi které patří i faktory kastovní diferenciaci (Patel *et al.*, 2007; Mutti *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013). Řada genů zapojených do těchto kaskád patří mezi antagonisticky pleiotropní geny neboli gerogeny, a oproti jejich důležitosti během vývoje, vede jejich aktivita v dospělosti k urychlení stárnutí, a naopak jejich utlumení k potlačení stárnutí. Na příklad, právě u TOR dráhy pravděpodobně vede přílišný přísun živin v dospělém věku k její vyšší stimulaci a následným gerontogením účinkům, zatímco v případě kalorického omezení a tím snížení aktivity TOR dráhy dojde k prodloužení života (Blagosklonny, 2010b, 2010a).

Dalším z faktorů souvisejících se včelím stárnutím je vitelogenin, prekurzor žlutkového proteinu tvořící se v tukovém tělese. Tento protein v dospělých včelách podporuje jejich imunitu a hraje roli v ochraně před oxidativním stresem (Havukainen *et al.*, 2013). Dá se tedy říci, že zpomaluje proces stárnutí. Zároveň vitelogenin potlačuje tvorbu Juvenilního hormonu (JH). JH je u hmyzu důležitý v larválním vývoji, kdy na základě enviromentálních podmínek brání předčasné metamorfóze. V dospělosti pak např. stimuluje reprodukci, avšak má i negativní vliv na imunitu a obranu proti oxidativnímu stresu, a tím podporuje stárnutí (Guidugli *et al.*, 2005; Seehuus *et al.*, 2006).

Zvýšené hladiny vitelogeninu se vyskytují u mladušek a u zimní generace včel, ale především je jeho hladina až 300x zvýšena u včelích královen (Piulachs *et al.*, 2003; Aurori *et al.*, 2013). Vitelogenin tedy zřejmě hraje významnou roli v udržování délky života včel. Signální dráhy pak mají důležitou úlohu v kastovní diferenciaci včel. Během vývoje larvy královny vykazují TOR a ISS dráhy a JH zvýšenou aktivitu, což vede k jejímu rychlejšímu vývoji (16 dní oproti 21 dnům u dělnic). Při experimentálním snížení zmíněných signalizačních drah dojde ke zvrácení vývoje matky na dělnici (Mutti *et al.*, 2011). U dospělé včelí matky aktivita těchto drah a JH klesá, čím se potlačuje i jejich gerontogení působení, a současně také dochází ke zvýšení hladiny vitelogeninu (Guidugli *et al.*, 2005; Mutti *et al.*, 2011). U dělnic je v porovnání se včelí matkou hladina JH zvýšená, a krom toho, k dalšímu navýšení JH u nich dochází při jejich přechodu ze stádia mladušky do stádia létavky (Elekonich *et al.*, 2001).

Věkový polyteismus v rámci včel je značně flexibilní a na jeho průběh má velký vliv komunikační síť v rámci včelstva, zohledňující jeho vnitřní stav, jako je velikost snůšky a množství zásob a plodu, řízená především pomocí feromonu včelí matky a feromonu včelího plodu. Ty řídí jak sociální interakce ve včelstvu, tak ovlivňují fyziologii dělnic.

Feromon včelí matky je produkován mandibulárními žlázami královny. Svým působením má vliv na fyziologii dělnic. Brání totiž dozrávání vaječníků u dělnic a tím jejich reprodukci (Hoover *et al.*, 2003), podporuje ukládání tukových zásob a podporuje tak rezistenci vůči hladovění a brání přechodu mladušek na létavky (Kaatz, Hildebrandt a Engels, 1992; Pankiw, Winston a Robinson, 1998). Nově vylíhlé včely prochází dodatečným vývojem a potřebují dostatečný přísun proteinů. Ty se ve formě pylu vyskytují v oblasti včelího plodu, kde se nalézá i královna. Tak jsou mladé včely a kojičky starající se o plod pod neustálým působením feromonu včelí matky (Johnson, 2010). Jedním z jeho fyziologických působení je potlačení produkce JH, a naopak zvýšení hladiny vitelogeninu, čímž dochází k utlumení metabolismu a pohybové aktivity dělnic a včely tak setrvávají v oblasti včelího plodu

(Kaatz, Hildebrandt a Engels, 1992; Pankiw, Winston a Robinson, 1998). Navíc dochází i ke snížení hladiny neurotransmiteru dopaminu, takže dělnice vykazují i malý zájem o jakoukoliv činnost krom péče o plod (Taylor *et al.*, 1992; Beggs *et al.*, 2007; Beggs a Mercer, 2009). S líhnutím nových jedinců jsou pak vytlačovány postupně až do okrajových oblastí úlu, s čímž se snižuje působení feromonu matky, a to umožňuje jejich postupný přechod do stádia létavky (Tofts a Franks, 1992; Amdam a Omholt, 2003). Zároveň s tím se zvyšuje hladina JH, který pak pravděpodobně inhibuje syntézu vitelogeninu (Kaatz, Hildebrandt a Engels, 1992; Pankiw, Winston a Robinson, 1998; Pinto, Bitondi a Simões, 2000).

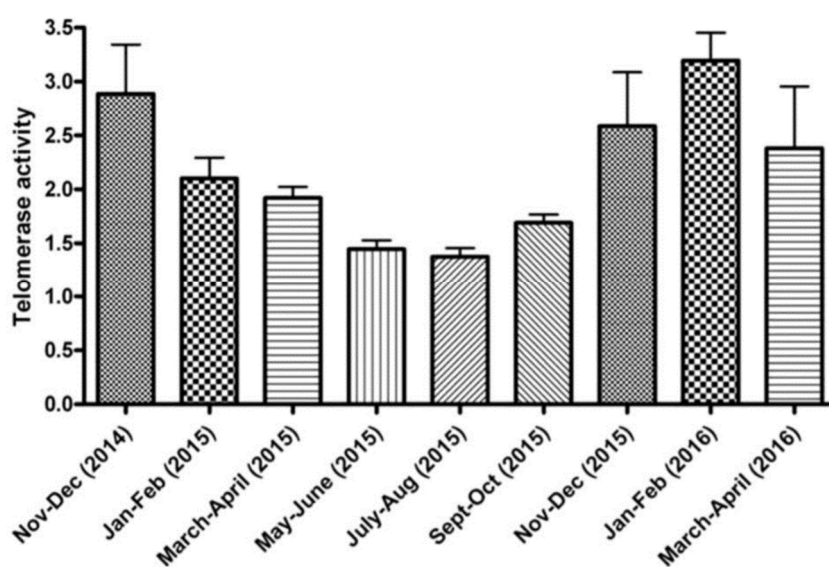
Feromon včelího plodu je produkován larvami a vzhledem k jejich potravním potřebám ovlivňuje chování i fyziologii dělnic (Le Conte *et al.*, 1990). Jeho chemické složení se mění s věkem larviček, a tak udává dělnicím informace o potřebách jednotlivých larev (Le Conte, Sreng a Trouiller, 1994) a zároveň směs všech typů tohoto feromonu informuje létavky o potřebném množství pylu k zásobování (Pankiw, Page Jr a Fondrk, 1998; Pankiw a Rubink, 2002). Kojičky jsou krom feromonu matky v přímém kontaktu s plodem a jeho feromonem. Ten u nich stimuluje funkci hypofaryngeálních žláz, což vede ke zvýšení jejich schopnosti konzumace pylu a jeho přeměny na potravu pro včelí plod. Vyšší konzumace bílkovin ve formě pylu vede u mladušek ke zvyšování hladiny vitelogeninu, což pravděpodobně vede zpětnou vazbou ke snížení hladiny JH (Mohammedi *et al.*, 1996; Le Conte, Mohammedi a Robinson, 2001; Pankiw, 2004; Guidugli *et al.*, 2005). Naopak u létavek snížená přítomnost včelího plodu a jeho hormonu způsobuje snížení hladiny vitelogeninu a snížení nutričního statusu, čímž dojde k urychlení stárnutí (Amdam a Omholt, 2003; Le Conte a Hefetz, 2008).

1.5 Včely a telomerázová aktivita

Protože telomerázová aktivita je spojena se stárnutím, nastává otázka, zda délka telomer a aktivita telomerázy přispívají k fyziologickým mechanismům doprovázející dlouhověkost u reprodukčních jedinců sociálního hmyzu.

Předchozí práce v naší laboratoři (Korandová a Frydrychová, 2016) se zaměřila na charakterizaci regulace telomerázové aktivity v průběhu vývoje u včely medonosné a v různých tkáních v průběhu vývoje dělnic, trubců a královen. Výsledky podpořily předpoklad vysoké telomerázové aktivity u královen, a potvrdily tak, že rozdíly v dlouhověkosti kast sociálního hmyzu jsou spojeny s biologií telomer.

Když byla testována možná souvislost mezi aktivitou telomerázy a dlouhověkostí přezimující generace dělnic, bylo zjištěno, že aktivita telomerázy je u dělnic postupně zesilována v průběhu podzimu, v zimě nabývá svého maxima a v průběhu předjaří a jara postupně klesá (Korandová, 2017) (Obr. 3). Nejmenší aktivita telomerázy byla zaznamenávána v průběhu letních měsíců. Tato pozorování byla prováděna v průběhu dvou let a dala vznik naší pracovní hypotéze, že aktivita telomerázy není a priori zvýšená u včel, které se líhnou na počátku podzimu a mají sloužit jako přezimující a dlouhověká generace včel, ale že se aktivita telomerázy mění v průběhu roku v závislosti na dosud neznámých faktorech, kterými by mohly být cirkadiální a teplotní změny v průběhu roku, vliv potravní skladby nebo vliv síly plodování včelstev.



Obr. 3: Telomerázová aktivita v hlavách včely medonosné. Telomerázová aktivita byla kvantifikována v rámci 5 úlů každý měsíc během roku a půl (2014/2016). Data z období listopad až prosinec 2014, listopad až prosinec 2015 a leden až únor 2016 jsou statisticky odlišné od období květen až říjen 2015 ($P < 0,05$). Data byla statisticky vyhodnocena pomocí Bonferroniho metody mnohonásobného porovnání. Obrázek a data byly použity z práce Korandová 2017.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo další objasnění změn v telomerázové aktivitě u *Apis mellifera* v průběhu roku. Jednotlivé dílčí cíle byly:

- Ověření výsledků předchozí práce kvantifikující aktivitu telomerázy u *Apis mellifera* v průběhu roku dodatečným srovnáním aktivity telomerázy v hlavách dělnic odebraných během února a června.
- Zhodnocení aktivity telomerázy v jednotlivých tkáních dělnic z letní a zimní generace.
- Vyhodnocení vlivu množství včelího plodu a feromonu včelího plodu na aktivitu telomerázy u dělnic.
- Zhodnocení vlivu fotoperiody na změny v telomerázové aktivitě u zimní generace dělnic.
- Vyhodnocení transkripčních hladin determinantů endokrinní signalizace, majících roli v procesu stárnutí, jako je TOR, juvenilní hormon a vitelogenin pro případné zjištění, zda-li může existovat jejich korelace s regulací telomerázové aktivity.

3 Materiál a metody

3.1 Použitý druh

Pro pokusy byl použitý druh *Apis mellifera mellifera carnica* (Hymenoptera: Apidae). Vzorky byly odebírány z experimentálních včelstev umístěných na pozemku Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích. Odebrané vzorky byly buď celé, nebo po vypitvání jednotlivých orgánů, zamrazeny v tekutém dusíku a skladovány v -80 °C.

3.2 Ovlivnění množství plodu a jeho feromonu v úlech

Pro zhodnocení vlivu množství včelího plodu na aktivitu telomerázy u dělnic byly použity dvě včelstva, kdy v jednom z těchto včelstev byla královna izolována pomocí klícky, která ji zabraňovala v kladení vajíček. V druhém kontrolním úle byla matka ponechána v přirozených podmínkách. Pro zhodnocení vlivu feromonu včelího plodu byla použita dvě včelstva, z nichž byly odebrány matky, a jejich přítomnost byla nahrazena aplikací feromonu

mandibulárních žláz včelí matky. V jednom z těchto úlů byl aplikován feromon včelího plodu, zatímco v druhém úle nikoliv. Použité byly feromonové přípravky PseudoQueen AVEC QMP (Intko Supply) jako feromon matky a SuperBoost (Contech) jako feromony včelího plodu. Pokus probíhal od 6.9. 2018 do konce září a byly uskutečněny 2 odběry, a to 7. a 27. 9. 2018.

3.3 Ovlivnění fotoperiody

U pokusných úlů byla v průběhu listopadu a počátku prosince 2018 použitím zatemňovací plachty pozměněna expozice včelstev dennímu světlu, tak aby byla nasimulována fotoperioda přibližně odpovídající lednovému období, tj. s prodlouženou délkou noci (16 hodin tma : 8 hodin světlo). Tato včelstva byla porovnávána se včelstvy bez zatemnění, tedy prodlouženou délkou dne (v průměru 14,86 hodin tma : 9,14 hodin světlo). Odběry byly provedeny celkem tři, a to 5.11., 20.11. a 5.12.

3.4 Příprava proteinových extraktů

Pro vyhodnocení aktivity telomerázy byly ze vzorků připraveny proteinové extrakty. Vzorky byly nejprve homogenizovány v 200 µl extrakčního roztoku (10 mM Tris/HCL, pH 7,6; 1 mM EGTA; 0,1 mM benzamidine (PMSF); 5mM 2-merkptoethanol; 0,5 % (w/v) CHAPS; 10 % (v/v) glycerol a 40 U/ml Rnase inhibitor). Homogenizované vzorky byly inkubovány přibližně 30 minut na ledu a následně centrifugovány při 12 000 g po dobu 20 minut při 4 °C. Po centrifugaci byl odebrán supernatant a ten byl buď ihned vyhodnocován, či byl uskladněn při -80 °C.

3.5 Kvantifikace proteinů

Stanovení celkových proteinů v homogenátech každého vzorku bylo provedeno za použití Bio-Rad Protein Assay Kit založeném na Bradfordově metodě (Bradford, 1976).

3.6 TRAP assay – telomere repeat amplification protocol

Pro stanovení telomerázové aktivity byla použita metoda TRAP v kombinaci s kvantitativní Real-time PCR. Metodika kvantifikace telomerázy specifické k hmyzí

a 10 µl Hyperscript™ master mixu. Hladiny jednotlivých transkriptů byly následně vyhodnoceny pomocí RT-PCR. Použité primery jsou uvedeny v tabulce (Tab. I). Každá reakce probíhala v 25 µl a obsahovala 5 µl 10x ředěného roztoku cDNA, 0,5 µl reverse primeru, 0,5 µl forward primeru a 12 µl Xceed qPCR SG 2x Mix Lo-ROX (IAB). Průběh reakce byl 95 °C, 3 min – (94 °C, 15 s, 57 °C, 30 s, 72 °C, 20 s), o 39 cyklech. Relativní kvantifikace byla zjištěna výpočtem $R = \text{Eff}(\text{ref})^{\text{CT}(\text{ref})} / \text{Eff}(\text{target})^{\text{CT}(\text{target})}$, kde eff je účinnost reakce, ref je referenční gen, target je cílový gen a ct je hodnota ct (cycle threshold). Reakce byly prováděny v 96 jamkových destičkách v cycleru CFX96 BioRad Real-time PCR systém. Účinnost reakce byla zjištěna pro každý použitý pár primerů pomocí standardní křivky. Jako referenční gen byla ve vzorcích vyhodnocována transkripční hladina Ribosomálního proteinu L (RpL). Každý testovaný vzorek byl připraven z odlišného jedince či tkáně a analyzován byl v duplikátech.

Tab I: Sekvence primerů použitých pro vyhodnocení transkripčních hladin

Cílový gen	Sekvence primerů	
	forward	reverse
Vitelogenin	5'-ATG GTC GAC AAT CCA GAA TC-3'	5'-GCT TCCA ACT TTT CTT CGC TC-3'
TOR	5'-GAT TAC ACG TGT CTG CCT C-3'	5'-CTT AGT GCT GGT GAT GGT G-3'
Mfe	5'- AAT TGT TGG ACT CAA ACA GAA A-3'	5'-TAA AAT TAG CGA GAG TTT CAA C-3'
RpL	5'-TGG CCA TTT ACT TGG TCG TT-3'	5'-GAG CAC GGA AAT GAA ATG GT-3'

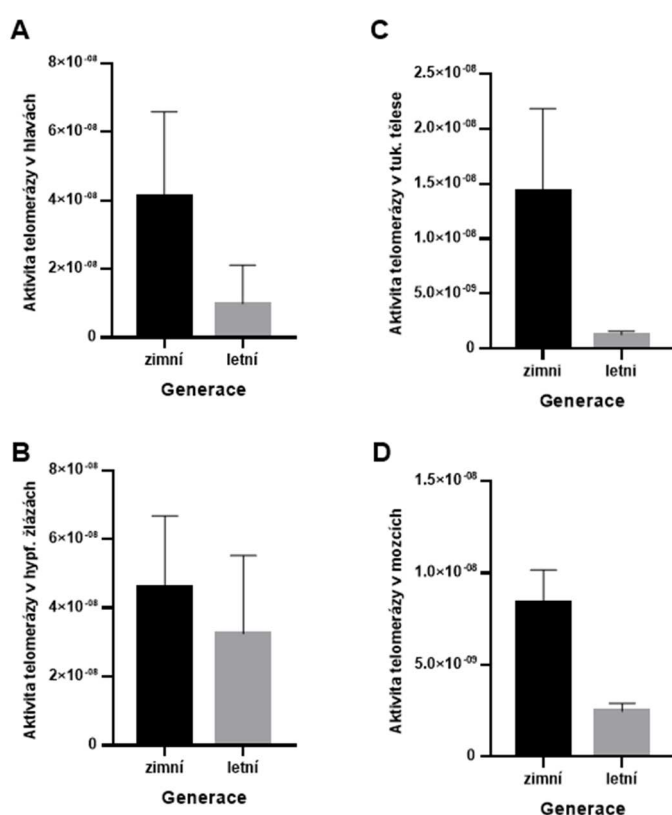
3.8 Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocení byl použit program GraphPad Prism 8 za využití nepárového t-testu. Z hlediska povahy dat a toho, že u všech dat byla otázka, zda jedna skupina nabývá prokazatelně vyšších hodnot než druhá, byla použita jednostranná varianta t-testu. V případech, kdy F-test odhalil příliš velký rozdíl ve variancích testovaných souborů, byla použita Welchova korekce t-testu. Sloupce v grafech znázorňují průměry hodnot dat jednotlivých testovaných skupin a chybové úsečky reprezentují směrodatné odchylky vypočtené nejméně ze 4 testovaných vzorků.

4 Výsledky

4.1 Rozdíl v aktivitě telomerázy v jednotlivých tkáních zimních a letních dělnic

Nejprve byla vyhodnocena telomerázová aktivita extraktů hlav dělnic odebraných ze dvou úlů v průběhu února a června 2018 (Obr. 4). Výsledné aktivity z těchto dvou období byly statisticky porovnány. V případě zimní generace dělnic došlo ke 4násobnému nárůstu v aktivitě telomerázy v porovnání s letní generací, a to se statistickou průkazností ($p = 0,0131$).



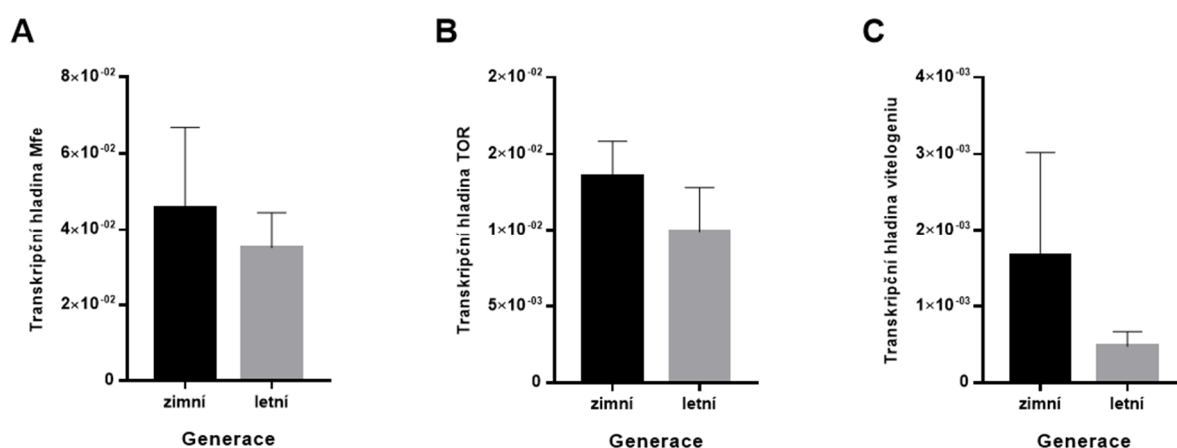
Obr. 4: Srovnání telomerázové aktivity v jednotlivých tkáních letní a zimní generace. Aktivita telomerázy byla měřena pomocí metody TRAP assay v rámci dvou úlů během února a června 2018, a to z připravených extraktů hlavy (A), tukového tělesa (B), hypofaryngeálních žláz (C) a mozku (D). Rozdíl mezi testovanými vzorky byl vyhodnocen pomocí nepárového jednostranného t testu a v případě hlavy, tukového tělesa a mozku byla použita Welchova korekce (A. $p = 0,0131$, Df = 6,241; B. $p = 0,0085$, Df = 4,023; C. $p = 0,1765$, Df = 8; D. $p = 0,0007$, Df = 4,569).

Poté byla telomerázová aktivita vyhodnocena u dalších tkání, a to v mozcích, hypofaryngeálních žlázách, tukovém tělese a hemolymfě (Obr. 4). Tak, jak v předchozím experimentu, testované dělnice pocházely ze dvou úlů a byly odebrány v průběhu února a června 2018. K největšímu nárůstu telomerázové aktivity v zimní generaci dělnic oproti letní

došlo u tukového tělesa, a to k 11násobnému ($p = 0,0085$). V rámci mozku došlo k 3násobnému nárůstu v aktivitě ($p = 0,0007$). V případě hypofaryngeální žlázy je pak vidět malý (1,5násobný) nárůst, který ovšem není statisticky průkazný ($p = 0,1765$). V případě hemolymfy nebyly ve výstupu metody TRAP zaznamenány žádné hodnoty Ct.

4.2 Transkripční hladiny determinantů endokrinní signalizace dělnic letní a zimní generace

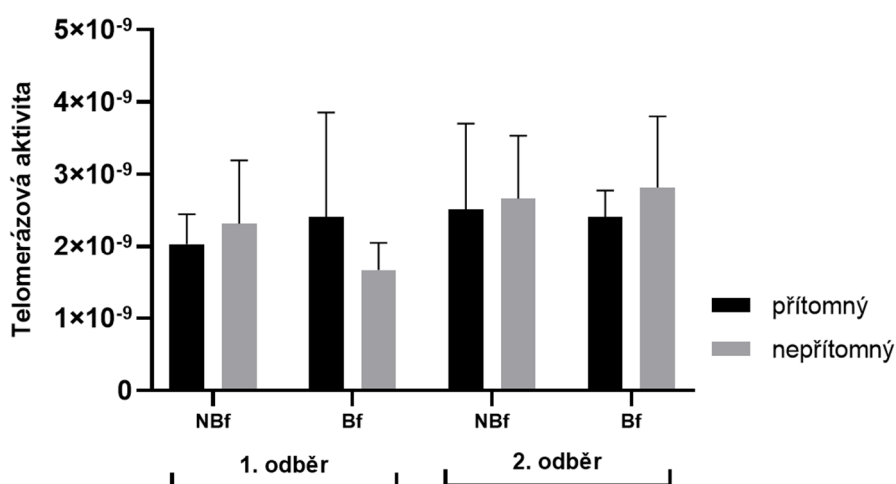
V tukovém tělese dělnic odebraných v průběhu února a června 2018 byly vyhodnoceny transkripční hladiny *vitelogeninu*, *Mfe* (*methyl farnesoate epoxidase*, což je enzym katalyzující finální krok biosyntézy juvenilního hormonu), a *TOR* (Obr. 5). Zimní generace v porovnání s letní ukázala 3,5násobný nárůst vitelogeninu ($p = 0,0311$). V případě *TOR* došlo u zimní generace k 1,4násobnému nárůstu ($p = 0,0147$). U transkripčních hladin *Mfe* nebyl pozorován žádný statisticky průkazný rozdíl ($p = 0,1426$).



Obr. 5: Srovnání transkripčních hladin determinantů endokrinní signalizace v tukové tkáni dělnic letní a zimní generace. Byly hodnoceny transkripční hladiny *Mfe* (A) *TOR* (B) a *vitelogeninu* (C). Transkripční hladiny byly vyhodnoceny ze vzorků cDNA syntetizovaných z RNA izolované z dělnic odebraných ze dvou úlů v únoru a červnu 2018. Rozdíl byl vyhodnocen pomocí jednostranného nepárového t-testu a v případě vitelogeninu byla použita Welchova korekce (A. $p = 0,1426$, Df = 11; B. $p = 0,0147$, Df = 11; C. $p = 0,0311$, Df = 6,539).

4.3 Vliv množství včelího plodu a jeho feromonu na aktivitu telomerázy u včelích dělnic

Byla vyhodnocena aktivita telomerázy extraktů hlav dělnic odebraných během září 2018 z celkem čtyřech včelstev. Včelstva byla o dvou typech. V prvním typu (NBf) bylo jedno včelstvo s kladoucí matkou a plodem a druhé včelstvo bylo s nekladoucí matkou a žádným plodem. Druhý typ včelstev (Bf) neobsahoval plod ani matku, přičemž v jednom ze včelstev byla nahrazena přítomnost plodu a matky syntetickými feromony, zatímco v druhém včelstvu byla syntetickým feromonem nahrazena pouze matka. U každého včelstva proběhly dva odběry; první odběr proběhl následující den po zahájení pokusu, druhý po třech týdnech (Obr.6). Mezi všemi testovanými včelstvy byly v obou termínech odběrů zaznamenány srovnatelné hladiny telomerázové aktivity.

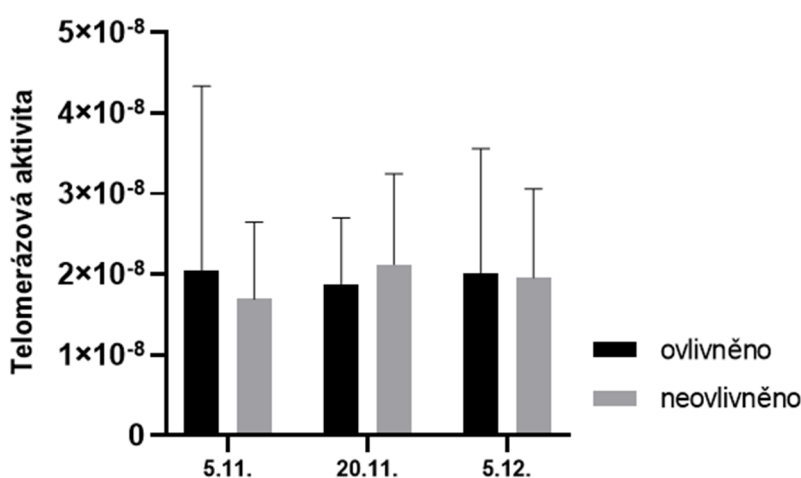


Obr. 6: Srovnání vlivu množství včelího plodu a jeho feromonu na aktivitu telomerázy v hlavách dělnic.

Značka **NBf** znamená úly s královnou a přítomným či nepřítomným plodem. Značka **Bf** znamená úly pouze se syntetickým mandibulárním feromonem včelí královny a přítomností či nepřítomností syntetického feromonu včelího plodu. Pokus probíhal od 6. září 2019 a aktivita telomerázy byla vyhodnocena pomocí metody TRAP assay ve dvou odběrech ze 7. a 27. září 2019. Rozdíly mezi 2 úly v jednotlivých pokusech a odběrech byly vyhodnoceny pomocí jednostranného nepárového t testu, kdy v případě 1. odběru Bf byla použita Welchova korekce (**1. odběr:** NBf $p = 0,2639$, $Df = 8$; Bf $p = 0,1617$, $Df = 4,570$; **2. odběr:** NBf $p = 0,4121$, $Df = 8$; Bf $p = 0,2065$, $Df = 7$).

4.4 Vliv fotoperiody na aktivitu telomerázy u zimní generace včelích dělnic

Byla vyhodnocena a porovnána telomerázová aktivita v extraktech hlav dělnic odebraných v průběhu listopadu a začátku prosince 2018 ze dvou skupin včelstev, odlišujících se délkou fotoperiody. Byla tedy použita čtyři včelstva s prodlouženou délkou noci (16 hodin tma : 8 hodin světlo) a čtyři včelstva s prodlouženou délkou dne (v průměru 14,86 hodin tma : 9,14 hodin světlo). Odběry byly celkem tři, a to 5.11., 20.11. a 5.12. Rozdíl v telomerázové aktivitě mezi testovanými včelstvy však pozorován nebyl (Obr. 7).



Obr. 7: Srovnání vlivu fotoperiody na telomerázovou aktivitu včelích dělnic zimní generace. Telomerázová aktivita byla vyhodnocena pomocí metody TRAP assay z extraktů hlav dělnic odchycených ve 3 odběrech v období 5.11. – 5.12.2018 z 8 úlů, kdy u poloviny těchto úlů byla ovlivněna fotoperioda (16 hodin tma : 8 hodin světlo). Rozdíl mezi zatemněnými a nezatemněnými úly byl vyhodnocen za pomoci nepárového jednostranného t testu a v případě odběru z 5.11. byla použita Welchova korekce (5.11. $p = 0,3518$, $Df = 9,351$; 20.11. $p = 0,3147$, $Df = 14$; 5.12. $p = 0,4666$, $Df = 14$).

5 Diskuze

Celkovým zaměřením tato bakalářská práce zkoumá příčiny rozdílné délky života letní a zimní generace dělnic včely medonosné (*Apis mellifera*), přičemž se zaměřuje na odlišnou telomerázovou aktivitu v těchto generacích. Práce ověřuje možnou souvislost mezi zvýšenou telomerázovou aktivitou u zimní generace a nižší intenzitou plodové aktivity ve včelstvu či odlišnou délkou fotoperiody. Krom toho byly v práci vyhodnocovány transkripční hladiny *Vg*, *TOR* a *Mfe*, což jsou geny endokrinní signalizace, které jsou obecně spojovány s regulací délky života či procesů stárnutí (Guidugli *et al.*, 2005; Seehuus *et al.*, 2006; Blagosklonny, 2010b, 2010a; Havukainen *et al.*, 2013), s otázkou, zda rozdíly v telomerázové aktivitě, které jsou v průběhu roku pozorovány, mohou být korelovány s aktivitou těchto genů. Téma navazuje na předchozí výzkum telomerázové aktivity sociálního hmyzu, a to hlavně u včely medonosné (Korandová a Frydrychová, 2016), ale také u termita *Prorhinotermes simplex* a čmeláků *Bombus terrestris* (nepublikované výsledky), které prokázaly souvislost zvýšené telomerázové aktivity u reprodukčních kast sociálního hmyzu a také zvýšenou telomerázovou aktivitu u dlouhověké přezimující generace včelích dělnic citace (Korandová, 2017).

Svémi výsledky jsem potvrdil výsledky předcházející studie (Korandová, 2017), že u zimní generace dělnic dochází v jejich hlavách ke zvýšení telomerázové aktivity. Tato pozorování jsem rozšířil o zjištění, že telomerázová aktivita je u zimní generace dělnic také výrazně posílená v jejich tukovém tělese. Lze spekulovat o spojitosti se zvýšenou metabolickou aktivitou tukového tělesa zimních včel, což by mohlo být spojeno se zvýšenou syntézou DNA, a což by mohlo být přímý důvod zvýšené telomerázové aktivity. Co se týče syntetické aktivity DNA, není reálným předpokladem, že by syntéza DNA byla napojena na proces buněčné proliferace. Tukové těleso je totiž polyploidní tkání, s tím, že a syntéza DNA je součástí endoreduplikace (Edgar a Orr-Weaver, 2001). Podle nepublikovaných výsledků naší laboratoře ke zvýšené telomerázové aktivitě v tukovém tělese, spojené s posílenou endoreduplikační aktivitou, dochází také u mladých královen čmeláka zemního (*Bombus terrestris*). Je možné, že zesílená telomerázová aktivita společně s endoreduplikací jsou nutnými předpoklady pro výstavbu tukového tělesa mladých královen čmeláka, a tak posílení metabolické aktivity, důležité pro úspěšné přežití jejich diapauzy. Posílená telomerázová aktivita v tukovém tělese zimních včel je v souladu s faktem, že u řady organismů hraje metabolismus tuků pravděpodobnou roli v kompromisu mezi plodností a dlouhověkostí, kdy při ztrátě schopnosti reprodukce dochází k nárůstu jak tukových zásob, tak délky života

(Arrese a Soulages, 2010). Neplodná včelí dělnice se dožívá zlomku života královny, což si, jak už bylo zmíněno, protirečí s fenoménem „cost of reproduction“. Královna sice disponuje velkou plodností, na druhou stranu je si třeba uvědomit, že veškerou péči o potomstvo přebírají dělnice a lze tak přemýšlet nad tím, že je to právě ten faktor, který včelí dělnice vystavuje daleko silnějšímu dopadu „cost of reproduction“. Telomerázová aktivita v tukovém tělese královny je v porovnání s dělnicemi posílená (Korandová, 2017), čímž se naskýtá myšlenka, že vyšší aktivita telomerázy v tukovém tělese zimních dělnic je důsledkem zimní sezóny jako bezplodného období ve včelstvu. Ve své práci jsem ověřoval vliv množství plodu na telomerázovou aktivitu, nicméně mé experimenty zmíněnou hypotézu nepotvrdily. Experimenty byly ovšem prováděny v závěru včelařské sezony, kdy ve včelstvu již byl značný podíl zimních včel, který mohl výsledky experimentu zkreslit. Taktéž, analýza byla prováděna z extraktů hlav včel, nikoliv tukového tělesa, takže by bylo vhodné tuto část experimentů v modifikované verzi zopakovat.

Zvýšená telomerázová aktivita v mozku, která byla potvrzena v rámci mé práce u přezimující generace dělnic a taktéž v předešlé studii u včelích královen (Korandová a Frydrychová, 2016) je překvapující, a to z hlediska toho, že mozek je tkáň obecně s nulovou či nízkou proliferační aktivitou (Ortega-Perez, Murray a Lledo, 2007). Na druhou stranu, řada studií na člověku a hlodavcích zaznamenává telomerázovou aktivitu u některých typů buněk mozku (npř. u kmenových a progenitorových) i v dospělosti (Liu, Nemes a Zhou, 2018), a lze tedy předpokládat pozitivní efekt přítomnosti telomerázy i u tkání tohoto typu.

Zabýval jsem se otázkou, jaké jsou příčiny nárůstu telomerázové aktivity u zimní generace dělnic. Z dostupných výsledků je zřejmé, že telomerázová aktivita u zimní generace včel narůstá postupně s postupující sezonou, patrně tedy pod vlivem nějakého vnějšího faktoru (Korandová, 2017). V mé práci jsem testoval možný vliv zkracující se fotoperiody, nicméně žádný průkazný vliv odhalen nebyl. Lze ale zmínit několik studií, které poukazují na propojenost cirkadiánních rytmů dělnic s dělbou práce ve včelstvu (Bloch, Toma a Robinson, 2001; Shemesh, Cohen a Bloch, 2007; Shemesh *et al.*, 2010). Aktivita létavek je už vzhledem k povaze jejich úřadu silně rytmická, zatímco včely vykonávající práce v rámci úlu vykazují chování nepravidelné (Moore *et al.*, 1998). Tento fakt se projevuje i na míře transkripce cirkadiánních genů (Toma *et al.*, 2000; Abreu, Freitas a Simões, 2018). Bylo by tedy nadále zajímavé zjistit, zda existuje propojenost těchto genů s mechanismy souvisejícími se stárnutím, včetně telomerázové aktivity, a jestli se tento mechanismus projevuje i v případě zimní generace dělnic, která podobně jako mladušky letní generace vykonává až do první jarní snůšky veškeré práce uvnitř úlu (Winston, 1987; Seeley, 2014).

Když jsem porovnával transkripční hladiny endokrinních genů spojených s mechanismy stárnutí, výraznou změnu jsem pozoroval pouze u vitelogeninu, jehož transkripční hladiny jsou výrazně posíleny u zimní generace. To potvrzuje pozorování předchozích studií, které nejenže ukázaly zvýšenou hladinu vitelogeninu u zimní generace a včelích královen, ale také prokázaly roli vitelogeninu v obraně proti oxidačnímu stresu, imunitních reakcích a obecně v regulaci procesu stárnutí (Havukainen *et al.*, 2013; Piulachs *et al.*, 2003; Aurori *et al.*, 2013). Lze se ptát, zda-li pozorovaný nárůst vitelogeninu a telomerázové aktivity u zimních včel je čistě náhodný, či naopak může být mezi regulací vitelogeninu a telomerázové aktivity nějaká těsnější spojitost.

6 Závěr

V této práci se podařilo ověřit předchozí zjištění, že u zimní generace dělnic včely medonosné dochází k navyšování jejich telomerázové aktivity. Bylo zjištěno, že k nárůstům telomerázové aktivity dochází zejména u tukového tělesa, jako metabolického orgánu s předpokládanou rolí v procesu stárnutí. Tyto výsledky tedy posilují předcházející zjištění, že telomerázová aktivita u včely a vůbec sociálního hmyzu hraje roli v kastovní diferenciaci a regulaci procesu stárnutí.

7 Literatura

- Abreu, F. C. P., Freitas, F. C. P. a Simões, Z. L. P. (2018) „Circadian clock genes are differentially modulated during the daily cycles and chronological age in the social honeybee (*Apis mellifera*)", *Apidologie*. Springer, 49(1), s. 71–83.
- Amdam, G. V. a Omholt, S. W. (2003) „The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis", *Journal of theoretical biology*. Elsevier, 223(4), s. 451–464.
- van Amerongen, R. a Nusse, R. (2009) „Towards an integrated view of Wnt signaling in development", *Development*. The Company of Biologists Ltd, 136(19), s. 3205–3214.
- Arrese, E. L. a Soulages, J. L. (2010) „Insect fat body: energy, metabolism, and regulation", *Annual review of entomology*. Annual Reviews, 55, s. 207–225.
- Aurori, C. M. *et al.* (2013) „What is the main driver of ageing in long-lived winter honeybees: antioxidant enzymes, innate immunity, or vitellogenin?", *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*. Oxford University Press US, 69(6), s. 633–639.
- Beggs, K. T. *et al.* (2007) „Queen pheromone modulates brain dopamine function in worker honey bees", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 104(7), s. 2460–2464.
- Beggs, K. T. a Mercer, A. R. (2009) „Dopamine receptor activation by honey bee queen pheromone", *Current biology*. Elsevier, 19(14), s. 1206–1209.
- Blackburn, E. H. (1991) „Structure and function of telomeres", *Nature*. Nature Publishing Group, 350(6319), s. 569.
- Blackburn, E. H., Greider, C. W. a Szostak, J. W. (2006) „Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging", *Nature Medicine*, 12(10), s. 1133–1138. doi: 10.1038/nm1006-1133.
- Blagosklonny, M. V (2010a) „Calorie restriction: decelerating mTOR-driven aging from cells to organisms (including humans)", *Cell Cycle*. Taylor & Francis, 9(4), s. 683–688.
- Blagosklonny, M. V (2010b) „Revisiting the antagonistic pleiotropy theory of aging: TOR-driven program and quasi-program", *Cell Cycle*. Taylor & Francis, 9(16), s. 3171–3176.
- Blasco, M. A. (2005) „Mice with bad ends: Mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging", *EMBO Journal*, 24(6), s. 1095–1103. doi: 10.1038/sj.emboj.7600598.
- Bloch, G., Toma, D. P. a Robinson, G. E. (2001) „Behavioral rhythmicity, age, division of labor and period expression in the honey bee brain", *Journal of Biological Rhythms*. Sage Publications Sage CA: Thousand Oaks, CA, 16(5), s. 444–456.
- Le Bourg, E. (2001) „A mini-review of the evolutionary theories of aging.", *Demographic Research*, 4, s. 1–28. doi: 10.4054/DemRes.2001.4.1.
- 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*. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
- Buttstedt, A. *et al.* (2016) „Royalactin is not a royal making of a queen", *Nature*. Nature Publishing Group, 537(7621), s. E10.
- Buttstedt, A., Moritz, R. F. A. a Erler, S. (2014) „Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family", *Biological Reviews*. Wiley Online Library, 89(2), s. 255–269.

- Cairney, C. J. a Keith, W. N. (2008) „Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity", *Biochimie*. Elsevier, 90(1), s. 13–23.
- Calderone, N. W. (1998) „Proximate mechanisms of age polyethism in the honey bee, *Apis mellifera* L.", *Apidologie*. EDP Sciences, 29(1–2), s. 127–158.
- Carey, J. R. (2001) „Demographic mechanisms for the evolution of long life in social insects", *Experimental gerontology*. Elsevier, 36(4–6), s. 713–722.
- Clancy, D. J. *et al.* (2001) „Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 292(5514), s. 104–106.
- Le Conte, Y. *et al.* (1990) „Identification of a brood pheromone in honeybees", *Naturwissenschaften*. Springer, 77(7), s. 334–336.
- Conte, Y. Le a Hefetz, A. (2008) „Primer pheromones in social hymenoptera", *Annu. Rev. Entomol.* Annual Reviews, 53, s. 523–542.
- Le Conte, Y., Mohammadi, A. a Robinson, G. E. (2001) „Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development", *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. The Royal Society, 268(1463), s. 163–168.
- Le Conte, Y., Sreng, L. a Trouiller, J. (1994) „The recognition of larvae by worker honeybees", *Naturwissenschaften*. Springer, 81(10), s. 462–465.
- DeYoung, M. P. *et al.* (2008) „Hypoxia regulates TSC1/2–mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14–3–3 shuttling", *Genes & development*. Cold Spring Harbor Lab, 22(2), s. 239–251.
- Dorman, J. B. *et al.* (1995) „The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*.", *Genetics*. Genetics Soc America, 141(4), s. 1399–1406.
- Edgar, B. A. a Orr-Weaver, T. L. (2001) „Endoreplication cell cycles: more for less", *Cell*. Elsevier, 105(3), s. 297–306.
- Elekovich, M. M. *et al.* (2001) „Juvenile hormone levels in honey bee (*Apis mellifera* L.) foragers: foraging experience and diurnal variation", *Journal of Insect Physiology*. Elsevier, 47(10), s. 1119–1125.
- Evans, D. S. *et al.* (2011) „TOR signaling never gets old: aging, longevity and TORC1 activity", *Ageing research reviews*. Elsevier, 10(2), s. 225–237.
- Fajkus, J., Sýkorová, E. a Leitch, A. R. (2005) „Telomeres in evolution and evolution of telomeres", *Chromosome Research*. Springer, 13(5), s. 469–479.
- Fleming, J. E. *et al.* (1982) „Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome?", *Gerontology*. Karger Publishers, 28(1), s. 44–53.
- Fridovich, I. (1989) „Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas", *J Biol Chem*. ASBMB, 264(14), s. 7761–7764.
- Frydrychová, R. *et al.* (2004) „Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insects", *Genome*. NRC Research Press, 47(1), s. 163–178.
- Frydrychova, R. C. a Mason, J. M. (2013) „Telomeres: their structure and maintenance", in *The Mechanisms of DNA Replication*. InTech.
- Frydrychová, R. a Marec, F. (2002) „Repeated losses of TTAGG telomere repeats in evolution of beetles (Coleoptera)", *Genetica*. Springer, 115(2), s. 179–187.

- Gay, F. J. a Calaby, J. H. (1970) „Termites of the Australian Region. In 'Biology of Termites'. (Eds K. Krishna and FM Weesner.) Vol. 2". Academic Press: New York and London.
- Gong, J. *et al.* (1999) „The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage", *Nature*. Nature Publishing Group, 399(6738), s. 806.
- Grandori, C. a Eisenman, R. N. (1997) „Myc target genes", *Trends in biochemical sciences*. Elsevier, 22(5), s. 177–181.
- Grassé, P. P. (1984) „Termitologia, Fondation des Sociétés. Construction. Tome II". Paris, Masson.
- Greider, C. W. (1998) „Telomerase activity, cell proliferation, and cancer.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(1), s. 90–2. doi: 10.1073/PNAS.95.1.90.
- Greider, C. W. a Blackburn, E. H. (2004) „Tracking telomerase", *Cell*. Elsevier, 116, s. S83–S87.
- Griffith, J. D. *et al.* (1999) „Mammalian telomeres end in a large duplex loop", *Cell*. Elsevier, 97(4), s. 503–514.
- Guertin, D. A. a Sabatini, D. M. (2005) „An expanding role for mTOR in cancer", *Trends in molecular medicine*. Elsevier, 11(8), s. 353–361.
- Guidugli, K. R. *et al.* (2005) „Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect", *FEBS letters*. Wiley Online Library, 579(22), s. 4961–4965.
- Hamilton, W. D. (1966) „The moulding of senescence by natural selection", *Journal of theoretical biology*. Elsevier, 12(1), s. 12–45.
- Hara, K. *et al.* (1998) „Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism", *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 273(23), s. 14484–14494.
- Harman, D. (1956) „Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry", *Journal of gerontology*, 11(3), s. 298–300. doi: 10.1093/geronj/11.3.298.
- Harris, T. E. a Lawrence, J. C. (2003) „TOR signaling", *Sci. STKE*. American Association for the Advancement of Science, 2003(212), s. re15-re15.
- Harshman, L. G. a Zera, A. J. (2007) „The cost of reproduction: the devil in the details", *Trends in ecology & evolution*. Elsevier, 22(2), s. 80–86.
- Havukainen, H. *et al.* (2013) „Vitellogenin Recognizes Cell Damage through Membrane Binding and Shields Living Cells from Reactive Oxygen Species", *Journal of Biological Chemistry*. American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 288(39), s. 28369–28381. doi: 10.1074/JBC.M113.465021.
- Hölldobler, B. a Wilson, E. O. (2009) *The superorganism: the beauty, elegance, and strangeness of insect societies*. WW Norton & Company.
- Hoover, S. E. R. *et al.* (2003) „The effect of queen pheromones on worker honey bee ovary development", *Naturwissenschaften*. Springer, 90(10), s. 477–480.
- Horikawa, I. a Barrett, J. C. (2003) „Transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms", *Carcinogenesis*. Oxford University Press, 24(7), s. 1167–1176.
- Hornsby, P. J. (2007) „Telomerase and the aging process", *Experimental gerontology*. Elsevier, 42(7), s. 575–581.
- Hughes, K. A. a Reynolds, R. M. (2005) „Evolutionary and Mechanistic Theories of Aging", *Annual Review of Entomology*, 50(1), s. 421–445. doi: 10.1146/annurev.ento.50.071803.130409.

- Inoki, K. *et al.* (2006) „TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth", *Cell*. Elsevier, 126(5), s. 955–968.
- Inoki, K., Corradetti, M. N. a Guan, K.-L. (2005) „Dysregulation of the TSC-mTOR pathway in human disease", *Nature genetics*. Nature Publishing Group, 37(1), s. 19.
- Johnson, B. R. (2003) „Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labour and behavioural flexibility", *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. The Royal Society, 270(1511), s. 147–152.
- Johnson, B. R. (2005) „Limited flexibility in the temporal caste system of the honey bee", *Behavioral Ecology and Sociobiology*. Springer, 58(3), s. 219–226.
- Johnson, B. R. (2008) „Within-nest temporal polyethism in the honey bee", *Behavioral Ecology and Sociobiology*. Springer, 62(5), s. 777–784.
- Johnson, B. R. (2010) „Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms", *Behavioral Ecology and Sociobiology*. Springer, 64(3), s. 305–316.
- Kaatz, H.-H., Hildebrandt, H. a Engels, W. (1992) „Primer effect of queen pheromone on juvenile hormone biosynthesis in adult worker honey bees", *Journal of Comparative Physiology B*. Springer, 162(7), s. 588–592.
- Kapahi, P. *et al.* (2010) „With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging", *Cell metabolism*. Elsevier, 11(6), s. 453–465.
- Keller, L. (1998) „Queen lifespan and colony characteristics in ants and termites", *Insectes Sociaux*. Springer, 45(3), s. 235–246.
- Keller, L. a Genoud, M. (1997) „Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing", *Nature*. Nature Publishing Group, 389(6654), s. 958.
- Kenyon, C. J. (2010) „The genetics of ageing", *Nature*. Nature Publishing Group, 464(7288), s. 504.
- Kharbanda, S. *et al.* (2000) „Regulation of the hTERT telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase", *Current Biology*. Elsevier, 10(10), s. 568–575.
- Kim, J. H. *et al.* (2005) „Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT", *Genes & development*. Cold Spring Harbor Lab, 19(7), s. 776–781.
- Kimura, K. D. *et al.* (1997) „daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 277(5328), s. 942–946.
- Kirkwood, T. B. L. (1977) „Evolution of ageing", *Nature*. Nature Publishing Group, 270(5635), s. 301.
- Kirkwood, T. B. L. a Holliday, R. (1979) „The evolution of ageing and longevity", *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*. The Royal Society London, 205(1161), s. 531–546.
- Korandová, M. *et al.* (2014) „Distribution of TTAGG-specific telomerase activity in insects", *Chromosome research*. Springer, 22(4), s. 495–503.
- Korandová, M. (2017) *Telomere length compensation mechanisms as players in longevity and stress adaptation of insects*. University of South Bohemia in České Budějovice.
- Korandová, M. a Frydrychová, R. Č. (2016) „Activity of telomerase and telomeric length in *Apis mellifera*", *Chromosoma*. Springer, 125(3), s. 405–411.
- Kriete, A. (2013) „Robustness and aging—a systems-level perspective", *Biosystems*. Elsevier, 112(1), s. 37–48.

- Kyo, S. *et al.* (2008) „Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers", *Cancer science*. Wiley Online Library, 99(8), s. 1528–1538.
- Levine, R. L. (2002) „Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease", *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 32(9), s. 790–796.
- Levine, R. L. a Stadtman, E. R. (2001) „Oxidative modification of proteins during aging", *Experimental gerontology*. Elsevier, 36(9), s. 1495–1502.
- Lin, J., Epel, E. a Blackburn, E. (2012) „Telomeres and lifestyle factors: roles in cellular aging", *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. Elsevier, 730(1–2), s. 85–89.
- Linger, B. R. a Price, C. M. (2009) „Conservation of telomere protein complexes: shuffling through evolution", *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*. Taylor & Francis, 44(6), s. 434–446.
- Linnane, A. W. *et al.* (1992) „Mitochondrial DNA mutation and the ageing process: bioenergy and pharmacological intervention", *Mutation Research/DNAging*. Elsevier, 275(3–6), s. 195–208.
- Liu, M.-Y., Nemes, A. a Zhou, Q.-G. (2018) „The Emerging Roles for Telomerase in Central Nervous System", *Frontiers in Molecular Neuroscience*. Frontiers, 11, s. 160.
- Loayza, D. a de Lange, T. (2003) „POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control", *Nature*. Nature Publishing Group, 423(6943), s. 1013.
- Makarov, V. L., Hirose, Y. a Langmore, J. P. (1997) „Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening", *Cell*. Elsevier, 88(5), s. 657–666.
- Manning, B. D. *et al.* (2002) „Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway", *Molecular cell*. Elsevier, 10(1), s. 151–162.
- Manning, B. D. (2004) „Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis", *J cell biol.* Rockefeller University Press, 167(3), s. 399–403.
- Mason, J. M., Frydrychova, R. C. a Biessmann, H. (2008) „Drosophila telomeres: an exception providing new insights", *Bioessays*. Wiley Online Library, 30(1), s. 25–37.
- Mathews, C. *et al.* (2006) „Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress", *Circulation research*. Am Heart Assoc, 99(2), s. 156–164.
- Meyne, J., Ratliff, R. L. a Moyzis, R. K. (1989) „Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG) n among vertebrates", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 86(18), s. 7049–7053.
- Mohammedi, A. *et al.* (1996) „Effect of a brood pheromone on honeybee hypopharyngeal glands.", *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 319(9), s. 769–772.
- Moore, D. *et al.* (1998) „Timekeeping in the honey bee colony: integration of circadian rhythms and division of labor", *Behavioral Ecology and Sociobiology*. Springer, 43(3), s. 147–160.
- Morris, J. Z., Tissenbaum, H. A. a Ruvkun, G. (1996) „A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*. Nature Publishing Group, 382(6591), s. 536.
- Mravina, B. *et al.* (2011) „TCAGG, an alternative telomeric sequence in insects", *Chromosoma*. Springer, 120(4), s. 367–376.
- Murphy, C. T. *et al.* (2003) „Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*", *Nature*. Nature Publishing Group, 424(6946), s. 277

- Mutti, N. S. *et al.* (2011) „IRS and TOR nutrient-signaling pathways act via juvenile hormone to influence honey bee caste fate", *Journal of Experimental Biology*. The Company of Biologists Ltd, 214(23), s. 3977–3984.
- Nicklin, P. *et al.* (2009) „Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy", *Cell*. Elsevier, 136(3), s. 521–534.
- Nielsen, L. a Edström, J. E. (1993) „Complex telomere-associated repeat units in members of the genus *Chironomus* evolve from sequences similar to simple telomeric repeats.", *Molecular and cellular biology*. Am Soc Microbiol, 13(3), s. 1583–1589.
- Ogg, S. *et al.* (1997) „The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*", *Nature*. Nature Publishing Group, 389(6654), s. 994.
- Ohlsson, R., Renkawitz, R. a Lobanenkov, V. (2001) „CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease", *TRENDS in Genetics*. Elsevier, 17(9), s. 520–527.
- Orgel, L. E. (1963) „The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 49(4), s. 517.
- Ortega-Perez, I., Murray, K. a Lledo, P.-M. (2007) „The how and why of adult neurogenesis", *Journal of molecular histology*. Springer, 38(6), s. 555–562.
- Ozawa, T. (1997) „Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging", *Physiological reviews*. American Physiological Society Bethesda, MD, 77(2), s. 425–464.
- Page Jr, R. E. a Peng, C. Y.-S. (2001) „Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L.", *Experimental gerontology*. Elsevier, 36(4–6), s. 695–711.
- Palm, W. a de Lange, T. (2008) „How shelterin protects mammalian telomeres", *Annual review of genetics*. Annual Reviews, 42, s. 301–334.
- Pan, D. *et al.* (2004) „Tuberous sclerosis complex: from *Drosophila* to human disease", *Trends in cell biology*. Elsevier, 14(2), s. 78–85.
- Pankiw, T. (2004) „Brood pheromone regulates foraging activity of honey bees (Hymenoptera: Apidae)", *Journal of Economic Entomology*. Oxford University Press Oxford, UK, 97(3), s. 748–751.
- Pankiw, T., Page Jr, R. E. a Fondrk, M. K. (1998) „Brood pheromone stimulates pollen foraging in honey bees (*Apis mellifera*)", *Behavioral ecology and sociobiology*. Springer, 44(3), s. 193–198.
- Pankiw, T. a Rubink, W. L. (2002) „Pollen foraging response to brood pheromone by Africanized and European honey bees (*Apis mellifera* L.)", *Annals of the Entomological Society of America*. Entomological Society of America, 95(6), s. 761–767.
- Pankiw, T., Winston, M. L. a Robinson, G. E. (1998) „Queen mandibular gland pheromone influences worker honey bee (*Apis mellifera* L.) foraging ontogeny and juvenile hormone titers", *Journal of insect physiology*. Elsevier, 44(7–8), s. 685–692.
- Paradis, S. *et al.* (1999) „A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*", *Genes & development*. Cold Spring Harbor Lab, 13(11), s. 1438–1452.
- Patel, A. *et al.* (2007) „The making of a queen: TOR pathway is a key player in diphenic caste development", *PloS one*. Public Library of Science, 2(6), s. e509.
- Pinto, L. Z., Bitondi, M. M. G. a Simões, Z. L. P. (2000) „Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen", *Journal of insect physiology*. Elsevier, 46(2), s. 153–160.

- Piulachs, M. D. *et al.* (2003) „The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies", *Insect biochemistry and molecular biology*. Elsevier, 33(4), s. 459–465.
- Remolina, S. C. a Hughes, K. A. (2008) „Evolution and mechanisms of long life and high fertility in queen honey bees", *Age*. Springer, 30(2–3), s. 177.
- Renaud, S. *et al.* (2005) „CTCF binds the proximal exonic region of hTERT and inhibits its transcription", *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 33(21), s. 6850–6860.
- Reznick, D. (1985) „Costs of reproduction: an evaluation of the empirical evidence", *Oikos*. JSTOR, s. 257–267.
- Robinson, E. J. H. (2009) „Physiology as a caste-defining feature", *Insectes Sociaux*. Springer, 56(1), s. 1–6.
- Robinson, G. E. (1992) „Regulation of division of labor in insect societies", *Annual review of entomology*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 37(1), s. 637–665.
- Sahara, K., Marec, F. a Traut, W. (1999) „TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods", *Chromosome research*. Springer, 7(6), s. 449–460.
- Sancak, Y. *et al.* (2007) „PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase", *Molecular cell*. Elsevier, 25(6), s. 903–915.
- Schapira, A. H. V *et al.* (1990) „Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease", *Journal of neurochemistry*. Wiley Online Library, 54(3), s. 823–827.
- Seehuus, S.-C. *et al.* (2006) „Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 103(4), s. 962–967.
- Seeley, T. D. (1982) „Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies", *Behavioral Ecology and Sociobiology*. Springer, 11(4), s. 287–293.
- Seeley, T. D. (1995) *The wisdom of the hive* Cambridge. MA: Harvard University Press.
- Seeley, T. D. (2014) *Honeybee ecology: a study of adaptation in social life*. Princeton University Press.
- Sekiguchi, K. a Sakagami, F. (1966) „Structure of foraging population and related problems in the honeybee, with considerations on the division of labour in bee colonies", *Hokkaido Nat. Agric. Exp. Sta. Rept.*, 62, s. 1–65.
- Sen, C. K. a Packer, L. (1996) „Antioxidant and redox regulation of gene transcription.", *The FASEB journal*, 10(7), s. 709–720.
- Sergieiev, P. V., Dontsova, O. A. a Berezkin, G. V. (2015) „Theories of aging: An ever-evolving field", *Acta Naturae*, 7(1), s. 9–18.
- Shammas, M. (2011) „Telomeres, lifestyle, cancer, and aging", *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 14, s. 28–34. doi: 10.1097/MCO.0b013e32834121b1.Telomeres.
- Shaw, R. J. *et al.* (2004) „The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling", *Cancer cell*. Elsevier, 6(1), s. 91–99.
- Shaw, R. J. (2009) „LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth", *Acta physiologica*. Wiley Online Library, 196(1), s. 65–80.
- Shemesh, Y. *et al.* (2010) „Molecular dynamics and social regulation of context-dependent plasticity in the circadian clockwork of the honey bee", *Journal of Neuroscience*. Soc Neuroscience, 30(37), s. 12517–12525.

- Shemesh, Y., Cohen, M. a Bloch, G. (2007) „Natural plasticity in circadian rhythms is mediated by reorganization in the molecular clockwork in honeybees", *The FASEB Journal*. Federation of American Societies for Experimental Biology, 21(10), s. 2304–2311.
- Smogorzewska, A. a de Lange, T. (2004) „Regulation of telomerase by telomeric proteins", *Annual review of biochemistry*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, 73(1), s. 177–208.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. a Relichová, J. (2009) *Genetika*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita.
- Sohal, R. S. *et al.* (1989) „Superoxide anion radical production in different animal species", *Mechanisms of ageing and development*. Elsevier, 49(2), s. 129–135.
- Sohal, R. S. a Weindruch, R. (1996) „Oxidative stress, caloric restriction, and aging", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 273(5271), s. 59–63.
- Southwick, E. E. (1983) „The honey bee cluster as a homeothermic superorganism", *Comparative biochemistry and physiology Part A: Physiology*. Elsevier, 75(4), s. 641–645.
- Stearns, S. C. (1989) „Trade-offs in life-history evolution", *Functional ecology*. JSTOR, 3(3), s. 259–268.
- Stearns, S. C. (1992) *The evolution of life histories*.
- Suzuki, Y. J., Forman, H. J. a Sevanian, A. (1997) „Oxidants as stimulators of signal transduction", *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier, 22(1–2), s. 269–285.
- Tatar, M. *et al.* (2001) „A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 292(5514), s. 107–110.
- Taylor, D. J. *et al.* (1992) „Changes in brain amine levels associated with the morphological and behavioural development of the worker honeybee", *Journal of Comparative Physiology A*. Springer, 170(6), s. 715–721.
- Tofts, C. a Franks, N. R. (1992) „Doing the right thing: ants, honeybees and naked mole-rats", *Trends in ecology & evolution*. Elsevier Current Trends, 7(10), s. 346–349.
- Toivonen, J. M. a Partridge, L. (2009) „Endocrine regulation of aging and reproduction in *Drosophila*", *Molecular and cellular endocrinology*. Elsevier, 299(1), s. 39–50.
- Toma, D. P. *et al.* (2000) „Changes in period mRNA levels in the brain and division of labor in honey bee colonies", *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 97(12), s. 6914–6919.
- Troen, B. R. (2003) „The biology of aging", *Mount Sinai Journal of Medicine*. Baltimore: Mount Sinai Hospital, 1970-, 70(1), s. 3–22.
- Trumbo, S. T., Huang, Z.-Y. a Robinson, G. E. (1997) „Division of labor between undertaker specialists and other middle-aged workers in honey bee colonies", *Behavioral Ecology and Sociobiology*. Springer, 41(3), s. 151–163.
- Wang, F. *et al.* (2007) „The POT1–TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor", *Nature*. Nature Publishing Group, 445(7127), s. 506.
- Wang, Y. *et al.* (2013) „Insulin-like peptides (AmILP1 and AmILP2) differentially affect female caste development in the honey bee (*Apis mellifera*)", *Journal of Experimental Biology*. The Company of Biologists Ltd, s. jeb-085779.
- Wellinger, R. J. a Sen, D. (1997) „The DNA structures at the ends of eukaryotic chromosomes", *European Journal of Cancer*. Elsevier, 33(5), s. 735–749.

- Williams, G. C. (1957) „Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence", *evolution*. Wiley Online Library, 11(4), s. 398–411.
- Williams, G. C. (1966) „Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle", *The American Naturalist*. Science Press, 100(916), s. 687–690.
- Winston, M. L. (1987) *The biology of the honey bee*. harvard university press.
- Wolkow, C. A. *et al.* (2002) „Insulin receptor substrate and p55 orthologous adaptor proteins function in the *Caenorhabditis elegans* daf-2/insulin-like signaling pathway", *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 277(51), s. 49591–49597.
- Xin, H. *et al.* (2007) „TPP1 is a homologue of ciliate TEBP- β and interacts with POT1 to recruit telomerase", *nature*. Nature Publishing Group, 445(7127), s. 559.
- Zakian, V. A. (1995) „Telomeres: beginning to understand the end", *Science*. American Association for the Advancement of Science, 270(5242), s. 1601–1607.
- von Zglinicki, T. (2002) „Oxidative stress shortens telomeres", *Trends in biochemical sciences*. Elsevier, 27(7), s. 339–344.
- Zhang, Y. *et al.* (2003) „Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins", *Nature cell biology*. Nature Publishing Group, 5(6), s. 578.
- Zhou, J. *et al.* (2014) „Telomerase reverse transcriptase in the regulation of gene expression", *BMB reports*. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology, 47(1), s. 8–14. doi: 10.5483/BMBRep.2014.47.1.284.
- Zhu, H., Belcher, M. a Van Der Harst, P. (2011) „Healthy aging and disease: role for telomere biology?", *Clinical Science*. Portland Press Limited, 120(10), s. 427–440.