

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky

**Vliv chronicky podávaných subletálních dávek parakvatu
na délku telomer a rezistenci vůči oxidačnímu stresu
drozofily**

Diplomová práce

Bc. Jindřiška Tomášková

Vedoucí práce: RNDr. Radmila Čapková Frydrychová, Ph.D.

České Budějovice 2016

Tomášková J, 2016: Vliv chronicky podávaných subletálních dávek parakvatu na délku telomer a rezistenci vůči oxidačnímu stresu drozofily. [Effect of chronic sublethal paraquat doses on telomere length and resistance to oxidative stress at Drosophila, Mgr. Thesis, in Czech]. 26 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

As the most widely dispersed fauna around the world, insects are exposed to a range of stresses within their environments. Oxidative stress causes a disturbance of the balance between production of free radicals and antioxidant response, which leads to various physiological changes in an organism. Despite this, there are several of defense mechanisms, which include in particular the main antioxidant enzymes AKH. In this thesis, I tried to contribute especially to understand the physiological nature of telomere elongation after exposure to free radicals.

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

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

V Českých Budějovicích dne 10. prosince 2016

.....

Bc. Jindřiška Tomášková

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Radmile Čapkové Frydrychové, Ph.D., za odborné vedení, řadu cenných rad a poskytnutí zázemí při zpracovávání mé práce. Poděkování patří také Mgr. Michale Korandové a Mgr. Tomáši Krůčkovi a všem členům laboratoře za vytvoření příjemné atmosféry. Velké díky patří i mé rodině a kamarádům, za jejich podporu během celého studia.

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Oxidační stres	1
1.1.1	Volné kyslíkové radikály a reaktivní formy kyslíku (ROS).....	1
1.1.2	Oxidativní poškození DNA	3
1.1.3	Antioxidační obrana	3
1.2	Telomery	4
1.2.1	Výjimečné telomery drozofily.....	4
1.2.2	Telomerické elementy	5
1.2.3	Retrotranspozice - prodlužování telomer	6
2	Cíl práce.....	7
3	Materiál a metody.....	8
3.1	Chov drozofily	8
3.2	Aplikace subletálních dávek parakvatu	8
3.3	Aplikace letální dávky parakvatu.....	8
3.4	Rezistence vůči hladovění	8
3.5	Dlouhodobé přežití	8
3.6	Určení hladiny AKH v <i>corpora cardiaca</i>	9
3.7	Aplikace hormonu Drome-AKH.....	9
3.8	Izolace RNA a syntéza cDNA	10
3.9	Kvantitativní Real-time PCR	10
4	Výsledky.....	11
4.1	Vliv nízkých dávek parakvatu na délku telomer a transkripční aktivitu	11
4.2	Působení parakvatu ovlivňuje počet vylíhlých much a délku vývoje.....	11
4.3	Vliv dlouhodobého působení parakvatu s ohledem na starvaci a oxidační stres.....	13
4.4	Působení hormonu AKH na oxidační stres.....	13
4.5	Vyhodnocení hladiny transkriptů <i>HeT-A</i> po aplikaci syntetického AKH	14

5	Diskuze.....	15
6	Závěr.....	17
7	Použitá literatura.....	18

1 Úvod

1.1 Oxidační stres

Jednou z důležitých rolí kyslíku v organismu je produkce metabolitů, které se účastní řady fyziologických procesů a mezi které patří volné radikály. Volné radikály hrají důležitou roli v přirozené a získané imunitě. Účastní se procesů přeměny energie, jsou součástí buněčných signálních drah a také dalších přirozených fyziologických procesů (Knight, 2000). Produkce volných kyslíkových radikálů probíhá pod přísnou kontrolou a v případě, že se v organismu vyskytne přebytek volných radikálů, dochází k aktivaci tzv. antioxidačních mechanismů, které hladinu volných radikálů redukují. Za normálních podmínek existuje mezi tvorbou volných radikálů a antioxidační odezvou rovnováha, a pokud je tato rovnováha porušena tím, že je hladina volných kyslíkových radikálů vyšší, než je optimální, hovoříme o tzv. oxidačním stresu (Sies, 1997). Oxidační stres je tedy způsoben nadměrným vznikem reaktivních forem dusíku (RNS - Reactive Nitrogen Species) a reaktivních forem kyslíku (ROS - Reactive Oxygen Species) (Wiseman & Halliwell, 1996).

1.1.1 Volné kyslíkové radikály a reaktivní formy kyslíku (ROS)

Volné radikály mohou být definovány jako molekuly nebo molekulové fragmenty obsahující jeden nebo více nespárovaných elektronů v atomech nebo molekulových orbitalech, po nichž se pohybují (Halliwell & Gutteridge, 1999). V biologických systémech vznikají volné radikály přijetím či naopak ztrátou jednoho nebo více elektronů. Tento stav má za následek vznik nepárového elektronu, který poskytuje značnou reaktivitu volným radikálům, pro které je charakteristické, že nejsou schopny samostatné existence (Miller et al., 1990). Aby byly volné radikály schopné samostatné existence, mají snahu doplnit chybějící párový elektron. Radikály atakují látku, která je neradikálové podstaty, a tím dochází ke sledu dalších radikálových reakcí, nebo, v případě, že je koncentrace volných radikálů dostatečně vysoká, dochází k vytvoření neradikálové molekuly vzájemnými interakcemi volných radikálů (Halliwell, 1991). Reaktivní formy kyslíku je výraz používaný pro popis různých molekul a volných radikálů (chemické látky s jedním nepárovým elektronem) odvozených od molekulárního kyslíku. Molekulární kyslík je sám o sobě volným radikálem s jedinečnou elektronovou konfigurací (Miller et al., 1990). V základním stavu je bi-radikál, obsahující dva nepárové elektrony ve vnějším plášti (také známý jako triplet). Vzhledem k tomu, že dva samostatné elektrony mají stejný spin, kyslík může reagovat pouze s jedním elektronem, a proto není příliš reaktivní se dvěma elektrony v

chemické vazbě. Na druhé straně, je-li jeden ze dvou nepárových elektronů excitován, mění se jeho spin a stává se silným oxidačním činidlem. Reaktivní formy kyslíku lze rozdělit do dvou základních skupin. Do první skupiny řadíme látky radikálové povahy, mezi které patří superoxidový ($O_2^{\bullet-}$), hydroxylový (HO^{\bullet}), hydroperoxylový (HO_2^{\bullet}), peroxylový (ROO^{\bullet}) a alkoxylový (RO^{\bullet}) radikál. Naopak v druhé skupině jsou látky označované jako neradikály účastníci se tvorby volných radikálů. Jedná se o peroxid vodíku (H_2O_2), ozón (O_3), singletový kyslík (1O_2) hydroxoperoxyl (HO_2^{\bullet}) a kyselina chlorná ($HOCl$) (Valko et al., 2007).

Existují sice exogenní zdroje vzniku ROS, jako je UV a ionizující záření, různé chemické látky (Ermak & Davies, 2002; Abdollahi et al., 2004; Cheng et al., 2010), ale ROS vznikají především endogenně, s tím, že v řadě případů mají i významné fyziologické funkce. K významným zdrojům endogenních ROS patří dýchací řetězec mitochondrií, a to zejména transmembránový komplex I (NADH – ubichinonreduktáza) a komplex III (ubichinon-cytochrom-c-reduktáza) (Cadenas & Sies, 1998). V dýchacím řetězci mitochondrií dochází zhruba u 1- 3 % elektronů k redukci na vodu. Zde se hlavně uplatňuje komplex III, který je za normálních podmínek hlavním producentem ROS. Během regenerace cytochromu Q se uplatňuje volný radikál semiquinon ($Q^{\bullet-}$), který je tvořen jako intermediát. Superoxidový radikál vzniká poté, co $Q^{\bullet-}$ odebere elektron z molekuly kyslíku (Turrens, 1997; Finkel & Holbrook, 2000; Turens, 2003). Superoxid není silné oxidační činidlo, nicméně je prekurzorem dalších reaktivních forem kyslíkových radikálů (Turrens, 2003). Další významnou organelou vzniku volných kyslíkových radikálů je endoplazmatické retikulum, v němž jsou ROS generovány komplexem zvaným cytochrom P-450, a to za účelem procesu biotransformace xenobiotik (Zangar et al., 2004). NADPH oxidáza je dalším důležitým donorem ROS, jejíž klíčová role je při respiračním vzplanutí hlavně fagocytujících buněk. Při tomto procesu NADPH oxidáza produkuje superoxid, který může být konvertován na další reaktivní formy kyslíku (Van Heerebeek et al., 2002; Magder, 2006). Poslední, ale neméně důležitou organelou produkující ROS je peroxizóm. Ten při procesu β -oxidace redukuje molekulární kyslík na peroxid vodíku (Reddy et al., 1986).

Volné kyslíkové radikály díky své reaktivní povaze napadají různé makromolekuly jako DNA, RNA, lipidy, glycidy a proteiny a jejich působením tak dochází k různým fyziologickým změnám v organismu (Dröge, 2002). O prospěšnosti či naopak škodlivosti jejich působení rozhoduje množství, v němž jsou generovány (Sies, 1997). Byla zjištěna souvislost mezi působením oxidačního stresu a vznikem řady civilizačních onemocnění, a to

zejména těch neurodegenerativních jako je Alzheimerova a Parkinsonova nemoc, nebo také kardiovaskulární onemocnění, rakovina, cukrovka (Uttara et al., 2009; Essick & Sam, 2010; Valko et al., 2007).

1.1.2 Oxidativní poškození DNA

Jedním z mnoha cílů působení volných kyslíkových radikálů jsou molekuly DNA, u nichž dochází ke vzniku nejrůznějších defektů, jako jsou abazická místa, oxidace pyrimidinových a purinových bází a deoxyribózy, dále pak jedno- a dvouřetězcové zlomy a tzv. „cross-linky“, což může vést k porušení celkové genomické stability buňky spojené s mutagenézí, karcinogenézí a také ke stárnutí (Krokan et al., 1997; Buonocore et al., 2010; Marnett, 2000). Jedním z efektů volných kyslíkových radikálů na DNA je zkracování telomer, tedy koncových částí chromosomů. Je to z důvodu vysokého obsahu guaninu v telomerách, který je častým cílem aktivity volných radikálů a jeho oxidace na 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-oxodG) (Fisher-Wellman & Bloomer, 2009). 8-oxodG je sice v telomerách opravován, ale díky nízké efektivitě reparačních procesů v telomerách je opravován nedokonale na jednořetězcové zlomy. Jednořetězcové zlomy při separaci dvouřetězců DNA při následné replikaci vedou ke ztrátě celého distálního úseku telomery (Nasir et al., 2014).

1.1.3 Antioxidační obrana

Organismy si proti oxidačnímu stresu vyvinuly účinnou mnohasložkovou antioxidační obranu. Mezi enzymatické komponenty podílejících se na antioxidační obraně řadíme především katalázu a superoxid dismutázu SOD (Scott et al., 1991; Mendis et al., 2005; Burlakova et al., 2010). Funkce SOD spočívá v přeměně superoxidu na peroxid vodíku, který je dále rozkládán katalázou (Paoletti et al., 1986). Enzym kataláza katalyzuje heterolytické štěpení dvou molekul peroxidu vodíku, kdy dochází ke vzniku kyslíku a vody (Chance, 1952). Dále se na antioxidační obraně podílí i řada nízkomolekulárních látek, jako jsou např. vitamín C a E, které volné radikály neutralizují poskytnutím elektronu. Sice se samy tím samy stávají látkou radikálové povahy, ale jejich radikálová aktivita je nízká. Jednotlivé komponenty antioxidační obrany fungují často synergicky (Jose et al., 1999).

Antioxidační obrana hmyzu je regulována převážně pomocí adipokinetických hormonů (AKH), které se vylučují z *corpora cardiaca*, což je malá neuroendokrinní žláza spojená s mozkem (Velki et al., 2011). AKH obsahují 8 až 10 aminokyselin (Gäde et al. 1997) a ve svém účinku jsou pleiotropní. Obecně platí, že AKH působí jako typické anti-stresové hormony, stimulují katabolické reakce, a tím mobilizují zásoby energie uložené ve formě

lipidů, sacharidů, nebo aminokyselin. Současně AKH inhibují syntetické reakce; tedy uvolněná energie se používá k odstranění hrozící stresové situace. Tyto základní antistresové účinky jsou následovány stimulací fyziologické odezvy proti stresu (Kodrík, 2008), která zahrnuje aktivaci srdeční činnosti (Scarborough et al., 1984), zvýšení imunitní odpovědi (Goldsworthy et al., 2002) a další antioxidační mechanismy zahrnující i zvýšení příjmu potravy a trávicích procesů ve střevě hmyzu (Bednářová et al., 2013; Bil et al., 2014; Kodrík et al., 2012; Večeřa et al., 2007; Velki et al., 2011; Vinokurov et al., 2014).

1.2 Telomery

Telomery jsou nukleoproteinové komplexy na koncových částech chromozomů. U většiny organismů jsou složeny ze série krátkých opakujících se sekvencí (např. TTAGG u hmyzu, TTAGGG u člověka), které jsou syntetizovány enzymem telomerázou (Capkova Frydrychova et al., 2008). Telomery mají důležitou roli v replikaci chromozomů, zajišťují jejich stabilitu, segregaci a postavení v jádře (Hochstrasser et al., 1986; Blackburn, 1991; Hari et al., 2001; Chan & Blackburn, 2002; Biessmann & Mason, 2003; Abad et al., 2004). Mezi jejich významné role patří to, že odlišují přirozené konce chromozomů od těch, co vznikly dvouřetězcovými zlomy a chrání tak chromosomy s přirozenými konci před jejich vzájemnou fúzí, ke které dochází právě v případě chromosomálních zlomů (Blackburn, 1991; Chan & Blackburn, 2004). Další důležitou funkcí telomer je kompenzace ztrát koncové DNA. Telomerické ztráty nastávají jednak z důvodu působení oxidačního stresu nebo zcela přirozeně na základě neschopnosti DNA polymerázy plně replikovat koncovou část telomery (Watson, 1972; Olovnikov, 1973), díky čemuž během každého dělení dochází na 5' konci dceřiného řetězce ke zkracování koncových částí repetit. Pokud zkrácení dosáhne svého kritického limitu, tzv. Hayflickova limitu, buňka ztrácí schopnost dalšího dělení (Hayflick & Moorhead, 1961), dostává se do stádia buněčné senescence. A jelikož jsou telomery spjaty s počtem somatických dělení, jsou považovány za tzv. „buněčné hodiny“ (Allsopp et al., 1992). Koncové ztráty chromozomů jsou nejčastěji opravovány aktivitou telomerázy, což je enzym, který se váže k telomerické DNA a přikládá zde nově nasyntetizované sekvence telomerické DNA. Aktivita telomerázy je spjata s proliferačně aktivními buňkami, jako jsou embryonální, zárodečné nebo kmenové buňky (Wright et al., 1996; Zhu et al., 2011).

1.2.1 Výjimečné telomery drozofily

Ačkoli většina doposud prozkoumaných organismů má telomery s krátkými tandemovými repeticemi syntetizovanými telomerázou, bylo nalezeno několik organismů s

odlišnými strukturami. Jsou to například telomery komára *Anopheles gambiae* (Roth et al., 1997) a pakomára *Chiromomus* sp. (Nielsen and Edstrom, 1993) tvořené dlouhými satelitními sekvencemi a prodlužované genovou konverzí.

Další výjimku tvoří tři rodiny telomericky specifických non-LTR retroelementů, které jsou popsány u *Drosophila melanogaster*, a to *HeT-A*, *TART* a *TAHRE* (Mason et al., 2008). V telomeře jsou tyto elementy zastoupeny v různém sledu i počtu. Pomocí své retrotranspozice jsou jejich nové kopie připojovány specificky ke koncům chromozomů, čímž se tak kompenzují telomerické ztráty (Mason et al. 2008; Capkova Frydrychova et al., 2009). Souhrnně se oblast všech tří telomerických elementů označuje jako HTT. Tato oblast má různou variabilní délku. Může se pohybovat od 26 do 147 kb podle počtu kopií retrotranspozonů v náhodném pořadí (Abad et al., 2004a). K oblasti HTT je přiložena subtelomerická oblast zvaná TAS (telomere associated sequences) a dále speciální proteinový komplex označovaný jako telomerická čepička (Mason et al., 2008).

1.2.2 Telomerické elementy

Element *HeT-A* je nejvíce prostudovaný element. Tento element o délce 6 kb obsahuje pouze jeden otevřený čtecí rámec (ORF), který kóduje protein Gag-like. Protein Gag-like se specificky váže na nukleovou kyselinu při procesu retrotranspozice. Navíc elementy *HeT-A* jsou vysoce konzervované sekvence, které jsou přerušované krátkými delecemi, insercemi a duplikacemi (Biessmann et al., 1992). Jelikož tento element nekóduje reverzní transkriptázu, předpokládá se, že reverzně transkriptázová funkce je závislá na dalších dvou telomerických elementech (Biessmann & Mason, 2003; Abad et al., 2004a). Typická vlastnost elementu *HeT-A* je délkově variabilní sekvence oligo(A), pomocí níž je element připojen k chromozomálnímu konci. Naopak neobvyklým rysem je jeho promotor, který leží na 3' UTR (tj. 3' netranslatované oblasti) daného elementu. Má za úkol řídit transkripci sousedního, tj. 3' elementu (Pardue & DeBaryshe, 2003). V promotorové oblasti se nachází i počátek transkripce a každý transkript má tak krátký úsek asi 60 bp, který pochází ze sousedního 5' elementu. Druhý promotor je umístěn v 5' UTR oblasti, jehož příspěvek k celkové transkripci je pouze nepatrný a je tedy pravděpodobně důležitý pro tkáňovou specifitu (Danilevskaya et al., 1997; Danilevskaya et al., 1999; Pardue & DeBaryshe 2003). Element *TART* je dlouhý 12 kb se dvěma čtecími rámci ORF1 a ORF2, kódující protein Gag-like a protein s funkcí reverzní transkriptázy (Levis et al., 1993) (Sheen & Levis, 1994). Element *TAHRE* (Telomere-Associated and *HeT-A*-Related Element) je

třetím telomerickým elementem dlouhým 11 - 13 kb (Abad et al., 2004a) se dvěma ORF kódujícími protein Gag-like a reverzní transkriptázu.

Celá HTT oblast je kryta multiproteinovým komplexem, označovaným jako telomerická čepička. A je to právě struktura telomerické čepičky, která identifikuje přirozené chromozomální konce od těch zlomených a tedy, pokud dojde k poškození telomerické čepičky, může to vést k chromozomálním fúzím, a tím posléze k chromozomálním zlomům se ztrátou genetického materiálu a celkovou nestabilitou genomu (Linger & Price, 2010). Na rozdíl savců se u drozofily formace telomerické čepičky děje nezávisle na sekvenci DNA, která se nachází na chromosomálním konci, a proto u drozofily při ztrátě telomerické DNA nemusí dojít ke ztrátě genomové stability a buněčné smrti. Nová telomera je totiž schopna se zformovat na konci zlomeného chromozómu (Capkova Frydrychova & Mason, 2013).

1.2.3 Retrotranspozice - prodlužování telomer

Hlavním mechanismem kompenzace telomerických ztrát drozofily je retrotranspozice telomerických elementů. Kromě retrotranspozice mohou být ovšem telomery prodlužovány i pomocí genové konverze. Mechanismus retrotranspozice se skládá z několika po sobě jdoucích kroků. Prvním krokem je transkripce retroelementů, tedy přepis DNA na mRNA. Poté nově vzniklé transkripty opouští jádro jadernými póry ve formě mRNA. Na ribozomech dochází k translaci mRNA retroelementů na polypeptid Gag. Navíc u elementů *TART* a *TAHRE* probíhá translace reverzní transkriptázy. Poté co se Gag protein naváže na transkript retroelementu, vzniká komplex, který je transportován zpět do jádra, kde se pomocí 3'oligo (A) naváže na konec chromozómu. Reverzní transkriptáza přepíše molekulu RNA na DNA, čímž dochází k prodloužení telomery (George & Pardue, 2003; Biessmann & Mason, 2003).

2 Cíl práce

Tato diplomová práce je součástí širšího projektu naší laboratoře, který je zaměřen na studium oxidačního stresu a jeho vlivu na telomery u hmyzu. Při studiu vlivu volných radikálů náš výzkumný tým dříve potvrdil jednak stimulační vliv subletálních dávek parakvatu na antioxidační mechanismy drozofily (Kruček et al., 2015) a taktéž došel ke zjištění, že při působení nízkých dávek volných radikálů dochází k prodlužování telomerické délky (Szakosova, 2015). Cílem mé práce bylo přispět především k pochopení fyziologické podstaty prodloužení telomer po působení volných radikálů. Tzn., mým úkolem bylo u much, které byly po několika generacích vystaveny subletálním dávkám parakvatu, testovat parametry, jakými jsou změny v délce vývoje drozofily a počtu vylíhlých jedinců, rezistenci vůči letálním dávkám parakvatu a změny v hladině adipokinetického hormonu, tj. hmyzího stresového hormonu. Dále jsem také testovala délku telomer v reakci na zvýšené množství adipokinetického hormonu.

3 Materiál a metody

3.1 Chov drozofily

Ke své práci jsem používala mouchy linie Oregon R, jejíž chov je dlouhodobě udržován při 25 °C na běžném kukuřično-melasovém médiu (163 g kukuřičného šrotu, 33 g sušených kvasnic, 16 g agaru, 200 ml melasy a 2,6 l vody) spolu s dezinfekčním roztokem (12 g kyseliny benzoové, 2,5 g kyseliny sorbové a 240 ml denaturovaného etylalkoholu) při fotoperiodě: 16 hodin světlo + 8 hodin tma a 60 – 75 % vlhkosti. Linie byly chovány ve skleněných vialkách.

3.2 Aplikace subletálních dávek parakvatu

Parakvat (Sigma - Aldrich, kat. č. 36541) je silným oxidačně redukčním činidlem, který vede k produkci superoxidých aniontů (Mollace et al., 2003; Choi et al., 2006). Při aplikaci subletálních dávek byl parakvat aplikován do média, které bylo tvořeno 5.43 g agaru, 15.65 g kvasnic, 8.7 g sojové mouky, 69.57 g kukuřičné mouky, 19.13 g řepného sirupu, 69.57 g sladového sirupu, 5.43 ml propionové kyseliny a 1.3 g metyl-4-hydroxybenzoátu v 1 litru destilované vody. Do připraveného média byl vmíchán parakvat s finální koncentrací o rozsahu $1,6 \times 10^{-1}$ mM až $1,6 \times 10^{-7}$ mM. Kontrolní médium bylo vytvořeno smícháním média s odpovídajícím množstvím destilované H₂O. Pro založení nové generace bylo vždy využito 10 samců a 10 samic z předcházející generace, vložených do vialky s příslušnou koncentrací parakvatu. U pokusů, kdy se hodnotila délka vývoje a počet nově vylíhlých jedinců, se do každé vialky aplikovalo 80 vajíček.

3.3 Aplikace letální dávky parakvatu

Hodnocení úmrtnosti se provádělo po akutní aplikaci letální dávky parakvatu (20 mM), a to u linií, které byly předtím drženy po pět generací na příslušných koncentracích parakvatu. Úmrtnost byla po aplikaci 20 mM parakvatu hodnocena po 24 hodinách.

3.4 Rezistence vůči hladovění

K pokusu bylo použito vždy 20 samců, a to ve vialce s 0,5 % agarózovým gelem. Mortalita byla sledována každých 6 hodin.

3.5 Dlouhodobé přežití

K této metodě bylo na jednu vialku použito 20 samců pocházejících z linií chovaných po dvanáct generací na příslušné koncentraci parakvatu. Testovaní jedinci byli drženi za

standardních podmínek, s tím, že v průběhu pokusu byli co čtyři dny přemísťováni na čerstvé kukuřično-standardní médium a po každých 4 dnech byla sledována úmrtnost.

3.6 Určení hladiny AKH v *corpora cardiaca*

Pro určení hladiny hormonu AKH byla použita metoda ELISA, tak jak je popsáno v práci Zemanová et al., 2016. Vzorky extrahované v 80% metanolu byly vyjmuty z CNS (*corpora cardiaca*), získané vždy ze tří jedinců cephalothoraxoadultního stádia. Extrakt byl použit pro určení hladiny AKH pomocí metody kompetitivní ELISA. 96-ti mikrotitrační destička byla přes noc ponořena do pufru o koncentraci 1:10 000 obsahujícího IgG protilátka, čímž došlo k vytvoření tenkého filmu IgG protilátka na povrchu jamek (anti Drome-AKH polyklonální protilátka). Po blokování pomocí 3% roztoku BSA (albumin hovězího séra) s destilovanou vodou byly vzorky přidány do konkrétních jamek. Ke vzorkům byla přidána biotinylovaná proba Drome-AKH za použití Biotin Long Arm Maleimide (Blam, Gln-Leu-Thr-Phe-Ser-Pro Asp-Trp-Lys (Bio) -Gly-NH₂; Vidia, Praha, Česká Republika) rozpuštěná v 1 mM PBS o pH = 7,5. Po kompetici o vazebná místa na primární protilátce IgG navázané na destičce byl do každé jamky přidán streptavidin spojený s roztokem křenové peroxidázy (Vector Laboratories, CA, USA) o koncentraci 1:500 v PBS-Tween. Nakonec byl přidán vizualizující ELISA substrát (3,3',5,5'-tetramethylthylbenzidine, Sigma Aldrich) a reakce byla ukončena přidáním 0,5 M kyseliny sírové. Absorbance byla měřena při 450 nm. Jako standardy, podle kterých byla vytvořena koncentrační křivka a odhadnuta hladina AKH v jednotlivých vzorcích, byly použity známé koncentrace Drome-AKH (Vidia, Praha, Česká Republika). Detekční limit pro test ELISA byl odhadnut podle standardní křivky 20 fmol Drome-AKH. Protilátka byla poskytnuta k použití Prof. Kodříkem (ENTÚ, BC AVČR).

3.7 Aplikace hormonu Drome-AKH

Pro tento pokus byl použit syntetický hormon AKH z *D. melanogaster*, Drome-AKH (pGlu-Leu-Thr-Phe-Ser-Pro-Asp-Trp-NH₂; Vidia Company, Praha) o koncentraci 184,65 pmol/μl v 80% metanolu. Pro aplikaci hormonu byly vybrány larvy much, které byly ponořeny do roztoku Drome-AKH v 20% metanolu v Ringerově roztoku o koncentraci 3 pmol/μl po dobu několika sekund. Kontrolní larvy byly namáčeny v 20% metanolu v Ringerově roztoku stejným způsobem. Poté se larvy nechaly lehce osušit a přenesly se na živné médium, kde se vylíhly. Vyhodnocení se provádělo u čerstvě vylíhlých samců.

3.8 Izolace RNA a syntéza cDNA

Pomocí komerčního kitu NucleoSpin RNA II (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, kat. č. 740955.50) byla provedena izolace RNA a bylo postupováno podle instrukcí přiložených výrobcem. Přesná koncentrace RNA byla stanovena spektrofotometricky, a to pomocí nanodropu.

Vzorky RNA byly převedeny do vzorků cDNA použitím kitu Super Script III First-Strand (Invitrogen, kat. č. 18080-051). Reakce byla prováděna dle instrukcí doporučených výrobcem. Celkový objem reakce byl 10 μ l a množství použitých reagensů byl následující: 1 μ g celkové RNA, 50 μ M oligo dT, 100 U reverzní transkriptázy SmartScribe RT a 100 mM DTT. Reakce probíhala při 42 $^{\circ}$ C po dobu 90 minut a nakonec byla provedena inaktivace reverzní transkriptázy při 70 $^{\circ}$ C po dobu 15 minut.

3.9 Kvantitativní Real-time PCR

Pro vyhodnocování relativní telomerické délky a relativní hladiny transkriptů telomerických elementů byl použit cyclus Light Cycler CFX96 BioRad Real-time PCR systém (Biorad) s využitím qPCR 2 \times SYBRE MIX (Top-Bio s.r.o., kat. č. P553). Tato metoda byla zvolena pro získání relativní úrovně cílového transkriptu v porovnání s referenčním transkriptem ribozomálního proteinu RpL32. Vzorky byly nanášeny v duplikátech o objemu 25 μ l, s primery o koncentraci 0,2 pmol/ μ l a s 5 μ l 10krát ředěné cDNA. Průběh reakcí byl 95 $^{\circ}$ C, 3 min – (95 $^{\circ}$ C, 30 s; 58 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 20 s) \times 30. Použité primery a jejich sekvence, teploty nasedání a velikost produktů jsou zaznamenány v tabulce 1. Všechny primery byly komerčně vyrobeny firmou Generi Biotech.

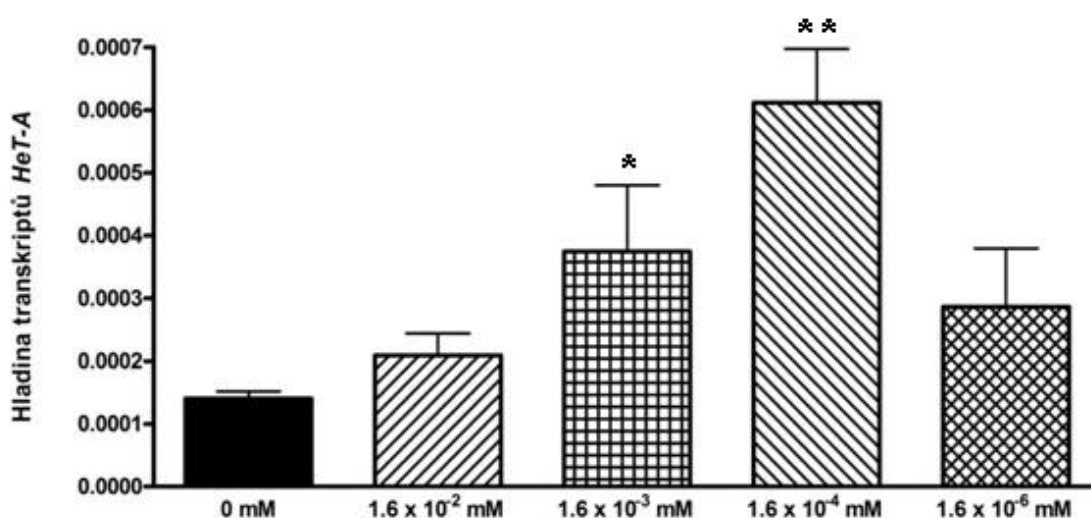
Tab. 1: Použité primery.

Gen	Název primeru	Velikost produktu (bp)	Teplota nasedání primeru	Sekvence primeru
HeT-A	HeT-A (forward)	150	58	5'-ATTGCTTCTCCTCCGTCCACC-3'
	HeT-A (reverse)	150	58	5'-TTCTCTATGCTATTGTCGCTGTGC-3'
RpL 32	RpL 32 (forward)	145	58	5'-GGACAGTATCTGATGCCCAAC-3'
	RpL 32 (reverse)	145	58	5'-ATCTCGCCGAGTAAACGC-3'

4 Výsledky

4.1 Vliv nízkých dávek parakvatu na délku telomer a transkripční aktivitu

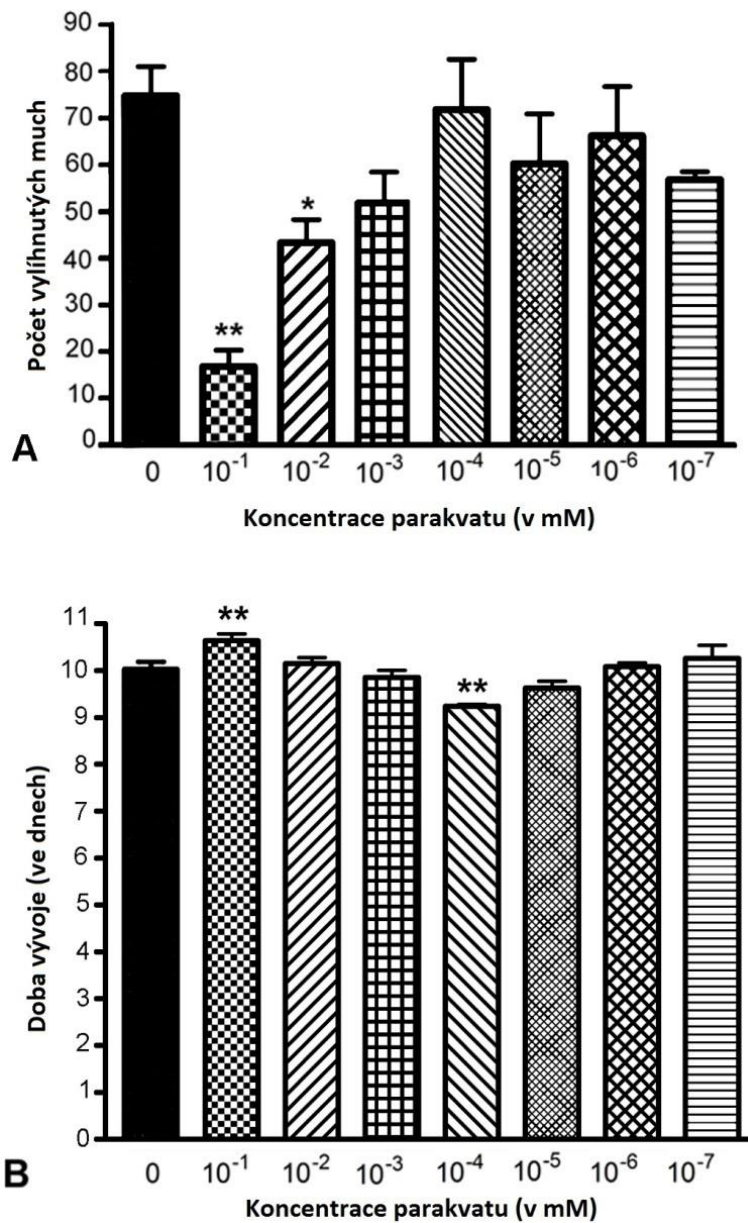
Prvním krokem byl experiment k ověření efektu subletálních dávek parakvatu, podávaných v průběhu pěti generací, na transkripční aktivitu telomerických elementů, který jsem předpokládala na základě výsledků předcházející studie (Szakosova, 2015). Na základě mého pokusu jsem obdobně jako ve zmíněné studii potvrdila zvýšené hladiny transkriptu u much vystavených parakvatu 10^{-3} a 10^{-4} mM (Obr. 1).



Obr. 1: Vliv parakvatu na hladinu transkriptů *HeT-A*. Relativní hladina transkriptů *Het-A* byla měřena v páté generaci much vystavovaných příslušným koncentracím parakvatu. Data byla analyzována pomocí jednocestné ANOVA ($p < 0,001$) a ke srovnávání jednotlivých vzorků ke kontrolnímu vzorku byl použit Dunnettův test (* $P < 0,05$, ** $p < 0,01$). Chybové úsečky v grafech představují průměr \pm SD z pěti nezávislých experimentů.

4.2 Působení parakvatu ovlivňuje počet vylíhlých much a délku vývoje

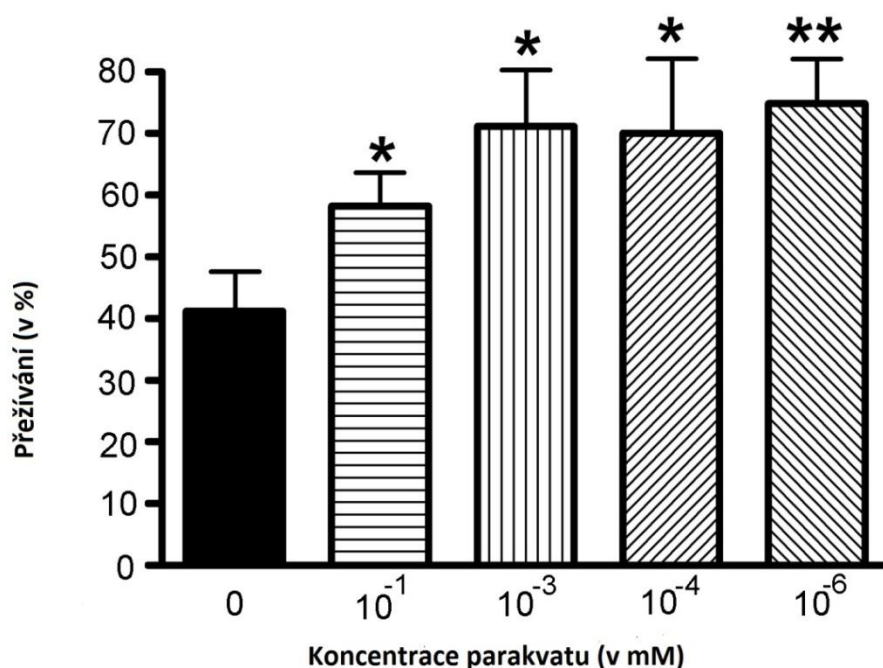
V dalším kroku jsem přistoupila k vyhodnocení efektu subletálních dávek parakvatu na vývoj jedinců testovaných linií. Oproti kontrolním mouchám jsem u skupin, které byly v průběhu vývoje vystaveny působení parakvatu, pozorovala změny v jejich počtu. Statistická významnost se nacházela ve skupinách, které byly vystaveny dvěma nejvyšším koncentracím parakvatu, a to 10^{-1} mM a 10^{-2} mM, kde počet nově vylíhnutých much byl asi 20% ($P < 0,01$) a 45% ($P < 0,05$) vzhledem ke kontrole (Obr. 2A). Za další, ve srovnání s kontrolními mouchami, u kterých byla průměrná doba vývoje 9.9 dnů od naklazení vajíček, mouchy držené na 10^{-1} mM parakvatu vykazovaly delší vývoj (10.65, $p < 0,01$), zatímco mouchy při koncentraci 10^{-4} mM se vyvíjely rychleji (9.24 dní, $p < 0,01$) (obr. 2B).



Obr. 2: Účinky parakvatu na počet vylíhnutých much a délku jejich vývoje. A. Počet celkově vylíhnutých much. B. Vývojový čas. Chybové úsečky v grafech představují průměr \pm SD z pěti nezávislých experimentů. Data byla analyzována pomocí jednocestné ANOVA ($p < 0,001$) a ke srovnávání jednotlivých vzorků ke kontrolnímu vzorku byl použit Dunnettův test (* $P < 0,05$, ** $p < 0,01$). Chybové úsečky v grafech představují průměr \pm SD z pěti nezávislých experimentů.

4.3 Vliv dlouhodobého působení parakvatu s ohledem na starvací a oxidační stres

U všech linií, které jsem po pět generací vystavovala příslušným koncentracím parakvatu, a rovněž u linie kontrolní jsem analyzovala odolnost proti oxidačnímu stresu, a to tak, že mouchy byly vystaveny 20mM parakvatu a po 24 hodinách se u nich hodnotila mortalita. Ve srovnání s kontrolou, kde mortalita dosáhla asi 58%, mortalita u much dlouhodobě ovlivňovaných parakvatem byla snížena. Nejvýraznější pokles ve srovnání s kontrolou byl pozorován v linii ošetřené nejnižší koncentrací parakvatu (25%, $p < 0,01$) (Obr. 3). Rovněž jsem u testovaných much vyhodnocovala rezistenci k hladovění. Jak u kontrolních linií, tak linií ošetřovaných parakvatem nebyly v podmínkách dietní restrikce zaznamenány rozdíly v době přežití; průměrná doba přežití byla u všech skupin cca 10 dní.

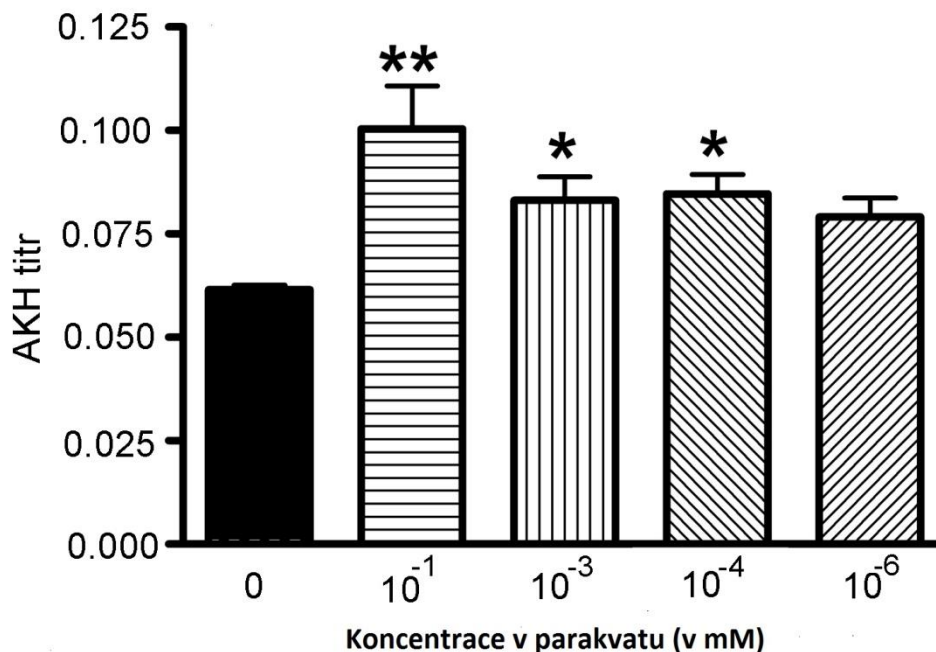


Obr. 3: Odolnost proti letálním dávkám parakvatu. Míra přežití po akutním vystavení 20mM parakvatu byla hodnocena u much, jejichž linie byla držena po pět generací na subletálních dávkách parakvatu, a u linie, která nikdy parakvatem ošetřena nebyla. Data byla analyzována pomocí jednocestné ANOVA ($p < 0,001$) a ke srovnávání jednotlivých vzorků byl ke kontrolnímu vzorku použit Dunnettův test (* $P < 0,05$, ** $p < 0,01$). Chybové úsečky v grafech představují průměr \pm SD z pěti nezávislých experimentů.

4.4 Působení hormonu AKH na oxidační stres

V další části projektu jsem vyhodnocovala vliv použitých subletálních dávek na hladinu adipokinetického hormonu (AKH). Mnou získané výsledky ukázaly, že použitá dávka parakvatu pozitivně korelovala se zjištěnou hladinou AKH (Obr. 4), a tedy že nejvyšší

nárůst hladiny AKH byl zaznamenán u nejvyšší koncentrace parakvatu, tedy 10^{-1} mM, a nejnižší u kontroly s nulovou dávkou parakvatu.



Obr. 4: Vyhodnocení titru AKH. Hladina AKH byla hodnocena po akutním vystavení much 20mM parakvatu, jejichž linie byly po pět generací vystaveny chronickému působení zvolených dávek parakvatu. Stanovení AKH bylo prováděno ve vypitvaných mozcích, jejichž součástí je *corpora cardiaca* nesoucí zásoby AKH. Data byla analyzována pomocí jednocestné ANOVA ($p < 0,001$) a ke srovnávání jednotlivých vzorků byl ke kontrolnímu vzorku použit Dunnettův test (* $P < 0,05$, ** $p < 0,01$). Chybové úsečky v grafech představují průměr \pm SD z pěti nezávislých experimentů.

4.5 Vyhodnocení hladiny transkriptů *HeT-A* po aplikaci syntetického AKH

Posledním bodem mé práce bylo vyhodnocení výše transkriptu telomerického elementu *HeT-A* u much, jejichž larvy byly vystaveny krátkodobé aplikaci hormonu AKH pro zjištění, jestli uměle zvýšená hladina AKH může ovlivňovat telomerickou aktivitu. Nicméně, žádné statisticky signifikantní rozdíly mezi kontrolními mouchami a mouchami po aplikaci AKH zaznamenány nebyly (výsledky neukázány).

5 Diskuze

Hlavním úkolem mé diplomové práce bylo navázat na předchozí studie týkající se vlivu oxidačního stresu na délku a transkripční aktivitu telomer u *D. melanogaster*. V těchto studiích bylo zjištěno, že při působení subletálních dávek parakvatu jsou aktivovány antioxidační mechanismy drozofily (Krůček et al., 2015) a navíc nízké dávky volných radikálů mají za následek prodlužování telomerické délky (Szakosova, 2015). Fyziologická podstata pozorovaných jevů ovšem objasněna nebyla.

Proto jsem se v první řadě zaměřila na to, zda u much, které byly vystaveny subletálním dávkám parakvatu po několik generací, dochází ke změnám v délce jejich vývoje a plodnosti. Tento experiment byl zaměřen zejména pro objasnění toho, jestli pozorované nárůsty počtu telomerických elementů a jejich transkripční aktivity jsou výsledkem dlouhodobé adaptace vůči působení oxidačního stresu či je to jen působící selekce, která s každou generací postupně eliminuje jedince s krátkými telomerami. Vzhledem k tomu, že v počtu jedinců nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi kontrolou a zejména linií ošetřovanou 10^{-4} mM parakvatem, lze se přiklonit k tomu, že pravděpodobnějším vysvětlením nárůstu telomerických elementů po působení subletálních dávek je adaptace a nikoliv selekce. V mém projektu jsem také zjistila, že mouchy vystavené nejvyšší koncentraci parakvatu potřebují pro svůj vývoj delší čas a zároveň se líhnou v menším počtu, než je tomu u much chovaných pouze na živném médiu bez parakvatu. Toto zjištění koreluje s publikovanými výsledky (Harshman et al., 2000), kdy byly mouchy testovány na relativní odolnost proti oxidačnímu stresu po vystavení parakvatu, a to se závěrem, že po působení oxidačního stresu je pro vývoj jedinců potřeba delší doby, k reprodukci tak dochází v pozdější fázi života a celkově dochází u much k prodloužení jejich života (Chaudhuri et al., 2007; Vermeulen et al., 2005).

Dalším bodem bylo zjistit, zda působení subletálních dávek parakvatu ovlivňuje odpověď na nutriční potřeby. Dle dosud nepublikované studie z naší laboratoře dochází po expozici subletálními dávkami parakvatu ke změně v energetické rovnováze, tzn., dochází ke zvýšení hladiny glukosy a glykogenu, a naopak ke snížení tukových zásob. Na základě toho jsem předpokládala, že budu pozorovat změny v odpovědi testovaných much k nutričnímu stresu. Nicméně žádná změna v citlivosti k dietnímu omezení po expozici parakvatem nebyla pozorována. Naopak dle očekávání, byly zvýšeny hladiny AKH, což se jedná o hormon, který je uvolňován z *corpora cardiaca* právě při zvýšené oxidační zátěži jako součást antioxidační obrany (Gäde et al., 1997; Kodrík, 2008; Van der Horst et al., 2001). Ve shodě

s publikovanými výsledky se rovněž jeví zvýšené hladiny AKH se současně zvýšenou hladinou glykogenu a sníženou hladinou tuků. Gálíková (2015) totiž potvrdila, že AKH hraje roli v energetické homeostázi, když u mutantů AKH prokázala zvýšenou hladinu tuků a sníženou hladinu glykogenu.

6 Závěr

Na základě mých výsledků lze souhrnně konstatovat, že chronické působení subletálních dávek parakvatu na vyvíjející se drozofily v průběhu několika generací zvyšuje rezistenci linií vůči akutnímu působení letálních dávek parakvatu. Působení parakvatu je přitom spjato, ať už přímo či nepřímo, s prodlužováním telomerické délky a lze spekulovat o tom, že se přitom jedná o adaptační proces, a nikoliv o selekci.

7 Použitá literatura

Abad JP, de Pablos B, Osoegawa K, de Jong PJ, Martín-Gallardo A, Villasante A (2004a). Genomic analysis of *Drosophila melanogaster* telomeres: full-length copies of *HeT-A* and *TART* elements at telomeres. *Molecular Biology and Evolution*. 21(9), 1613-1619.

Abdollahi M, Ranjbar A, Shadnia S, Nikfar S, Rezaie A (2004) Pesticides and oxidative stress: a review. *International medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 10(6), 141-147.

Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, ... Harley CB (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *The National Academy of Sciences*. 89(21), 10114-10118.

Barr DP, Aust SD (1993). On the mechanism of peroxidase-catalysed oxygen production. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 303, 377-382.

Bednářová A, Kodrík D, Krishnan N (2013). Adipokinetic hormone exerts its anti-oxidative effects using a conserved signal-transduction mechanism involving both PKC and cAMP by mobilizing extra- and intracellular Ca²⁺ stores. *Toxicology & pharmacology: CBP*. 158(3), 142-9.

Bednářová A, Krishnan N, Cheng ICH, Večeřa J, Lee HJ, Kodrík J (2013). Adipokinetic hormone counteracts oxidative stress elicited in insects by hydrogen peroxide: in vivo and in vitro study. *Physiological Entomology*. 38(1), 54-62.

Biessmann H, Valgeirsdottir K, Lofsky A, Chin C, Ginther B, Levis RW, Pardue ML (1992). *HeT-A*, a transposable element specifically involved in "healing" broken chromosome ends in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology*. 12(9), 3910-3918.

Biessmann H, Mason JM (2003). Telomerase-independent mechanisms of telomere elongation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60(11), 2325-2333.

Bil M, Broeckx V, Landuyt B, Huybrechts R (2014). Differential peptidomics highlights adipokinetic hormone as key player in regulating digestion in anautogenous flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *General and Comparative Endocrinology*. 208, 49-56.

Blackburn E H (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*. 350, 569-573.

- Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *In Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*. 15(4), 186-190.
- Burlakova EB, Zhizhina GP, Gurevich SM, Fatkullina LD, Kozachenko AI, Nagler LG, Zavarykina TM, Kashcheev VV (2010). Biomarkers of oxidative stress and smoking in cancer patients. *Journal of Cancer Research Therapeutics*. 6, 47-53.
- Cadenas E, Sies H (1998). The lag phase. *Free Radical Research*. 28(6), 601-9.
- Calabrese EJ (2008). Converging concepts: adaptive response, preconditioning, and the Yerkes-Dodson law are manifestations of hormesis. *Ageing Research Reviews*. 7(1), 8-20.
- Capkova Frydrychova R, Mason JM, Archer TK (2008). HP1 is distributed within distinct chromatin domains at *Drosophila* telomeres. *Genetics*. 180, 121- 131.
- Capkova Frydrychova R, Mason JM, Biessmann H (2009) Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenetic and Genome Research*. 122, 356- 364.
- Capkova Frydrychova R, Mason JM (2013). Telomeres: Their structure and maintenance. David Stuart (ed.) *The Mechanisms of DNA Replication*. *Intech, Open Access Publisher, Rijeka, Croatia*. pp. 423-443.
- Cenci G, Ciapponi L, Gatti M (2005). The mechanism of telomere protection: a comparison between *Drosophila* and humans. *Chromosoma*. 114, 135-145.
- Conner EM, Grisham MB (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*. 12(4), 274-277.
- Danilevskaya ON, Arkhipova IR, Pardue ML, Traverse KL (1997). Promoting in tandem: the promoter for telomere transposon *HeT-A* and implications for the evolution of retroviral LTRs. *Cell*. 88(5), 647-655.
- Danilevskaya ON, Traverse KL, Hogan NC, DeByryshe PG, Pardue M-L (1999). The two *Drosophila* telomeric transposable elements have very different patterns of transcription. *Molecular and Cellular Biology*. 19, 873-881.
- Dröge W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 82(1), 47-95.

- Ermak G, Davies JAK (2002). Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Molecular Immunology*. 38(10), 713-21.
- Essick EE, Sam F (2010). Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 3, 168-177.
- Felton GW, Summers CB (1995). Antioxidant systems in insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 29, 187-197.
- Finkel T, Holbrook NJ (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 408(6809), 239-247.
- Fisher-Wellman K, Bloomer RJ (2009). Acute exercise and oxidative stress: a 30 year history. *Dynamic Medicine*. 8(1), 1.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W (1995). DNA Repair and Mutagenesis. *American Society for Microbiology Press*. Washington, DC.
- Frydrychova RC, Biessmann H, Mason JM (2008). Regulation of telomere length in *Drosophila*. *Cytogenetic and Genome Research*. 122(3-4), 356.
- Gäde G, Hoffmann KH, Spring JH (1997). Hormonal regulation in insects: Facts, gaps, and future directions. *Physiological Reviews*. 77, 963-1032.
- Gáliková M, Diesner M, Klepsatel P, Hehlert P, Xu Y, Bickmeyer I, Predel R, Kühnlein RP (2015). Energy homeostasis control in *Drosophila* adipokinetic hormone mutants. *Genetics*. 201, 665–683.
- George JA, Pardue ML (2003). The promoter of the heterochromatic *Drosophila* telomeric retrotransposon, HeT-A, is active when moved into euchromatic locations. *Genetics*. 163, 625-635.
- George JA, DeBaryshe PG, Traverse KL, Celniker SE, Pardue ML (2006). Genomic organization of the *Drosophila* telomere retrotransposable elements. *Genome Research*. 16(10), 1231-1240.
- Goldsworthy G, Opoku-Ware K, Mullen L (2002). Adipokinetic hormone enhances laminarin and bacterial lipopolysaccharide-induced activation of the prophenoloxidase cascade in the African migratory locust, *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*. 48, 601-608.

- Halliwell B (1991). Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *The American Journal of Medicine*. 91(3), S14-S22.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (1999). Free radicals in biology and medicine (3rd ed.). *Oxford University Press*.
- Hari KL, Cook KR, Karpen GH (2001). The *Drosophila* Su(var)2-10 locus regulates chromosome structure and function and encodes a member of the PIAS protein family. *Genes & Development*. 15, 1334-1348.
- Harshman LG, Haberer BA (2000). A Robust Correlated Response to Selection in Extended Longevity Lines of *Drosophila melanogaster*? *Journals of Gerontology Series A: Biological Science and Medical Science*. 55(9), B415-B417.
- Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*. 25(3), 585-621.
- Hochstrasser M, Mathog D, Gruenbaum Y, Saumweber H, Sedat JW (1986). Spatial organization of chromosomes in the salivary gland nuclei of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Cell Biology*. 102, 112-123.
- Chan SW, Blackburn EH (2002). New ways not to make ends meet: Telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene*. 21, 553-563.
- Chan SR, Blackburn EH (2004). Telomeres and telomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 359(1441), 109-122.
- Chance B (1952). The effect of Ph upon the equilibria of catalase compounds. *Journal of Biological Chemistry*. 194, 483-496.
- Chaudhuri A, Bowling I, Funderburk C, Lawal H, Inamdar A, Wang Z, O'Donnell JM (2007). Interaction of genetic and environmental factors in a *Drosophila* Parkinsonism model. *Journal of Neuroscience*. 27(10), 2457-2467.
- Cheng SE, Lee IT, Lin CC, Kou YR, Yang CM (2010). Cigarette smoke particle-phase extract induces HO-1 expression in human tracheal smooth muscle cells: role of the c-Src/NADPH oxidase/MAPK/Nrf2 signaling pathway. *Free Radical Biology and Medicine*. 48(10), 1410-22.

- Choi H, Jedrychowski W, Spengler J, Camann DE, Whyatt RM, Rauh V, Tsai WY, Perera FP (2006). International studies of prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and fetal growth. *Archives of Environmental Health Perspectives*. 114(11), 1744-50.
- Jose MM, Gomez CP, De castro IN (1999). Antioxidants enzymes and human diseases. *Clinical biochemistry*. 32(8), 595-603.
- Kodrík D (2008). Adipokinetic hormone functions that are not associated with insect flight. *Physiological Entomology*. 33, 171-180.
- Kodrík D, Vinokurov K, Tomčala A, Socha R (2012). The effect of adipokinetic hormone on midgut characteristics in *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera). *Journal of Insect Physiology*. 58, 194-204.
- Knight JA (2000). Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 30(2), 145-158.
- Krokan H, Standal R, Slupphaug G (1997). DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochemical Journal*. 325, 1-16.
- Krůček T, Korandová M, Šerý M, Frydrychová RČ, Szakosová K (2015). Effect of low doses herbicide paraquat on antioxidant defense in *Drosophila*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*.
- Levis RW, Ganesan R, Houtchens K, Tolar LA, Sheen FM (1993). Transposons in place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere. *Cell*. 75(6), 1083-1093.
- Linger BR, Price CM (2010). Conservation of Telomere protein complexes: Shuffling through Evolution. *National Institutes of Health Public Access*. 44, 434-446.
- Magder S (2006). Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life. *Critical Care*. 10(1), 208.
- Marnett LJ (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 21(3), 361-370.
- Mason JM, Frydrychova RC, Biessmann H (2008). *Drosophila* telomeres: an exception providing new insights. *Bioessays*. 30(1), 25-37.

- Mattson MP (2003). Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. *Neuromolecular Medicine*. 3, 65-94.
- Mendis E, Rajapakse N, Kim SK (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 581-587.
- Miller DM, Buettner GR, Aust SD (1990). Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Radical Biology & Medicine*. 8, 95-108.
- Mollace V, Iannone M, Muscoli C, Palma E, Granato T, Rispoli V, Nisticò R, Rotiroti D, Salvemini D (2003). The role of oxidative stress in paraquat-induced neurotoxicity in rats: protection by non peptidyl superoxide dismutase mimetic. *Neuroscience letters*. 335(3), 163-6.
- Nasir NFM, Kannan TP, Sulaimann SA, Shamsuddin S, Ahmad A, Stangaciu S (2014). Telomeres and oxidative stress. *British Journal of Medicine & Medical Research*. 4, 57-67.
- Nielsen L, Edstrom JE (1993). Complex telomere-associated repeat units in members of the genus *Chironomus* evolve from sequences similar to simple telomeric repeats. *Molecular and Cellular Biology*. 13(3), 1583-9.
- Olovnikov AM (1973). A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*. 41(1), 181-190.
- Paoletti, F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A (1986). A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide-dismutase activity in tissue-extracts. *Analytical Biochemistry*. 154, 536-541.
- Pardue ML, DeBaryshe PG (2003). Retrotransposons provide an evolutionarily robust non-telomerase mechanism to maintain telomeres. *Annual Review of Genetics*. 37(1), 485-511.
- Rashkova S, Karam SE, Pardue ML (2002). Element-specific localization of *Drosophila* retrotransposon Gag proteins occurs in both nucleus and cytoplasm. *National Academy of Sciences*. 99(6), 3621-3626.

- Reddy JK, Goel SK, Nemali MR, Carrino JJ, Laffler TG, Reddy MK, Lalwani ND (1986). Transcription regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 83(6), 1747-1751.
- Ristow M, Zarse K (2010). *Experimental Gerontology*. 45, 410-418.
- Roth CW, Kobeski F, Walter MF, Biessmann H (1997). Chromosome end elongation by recombination in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 17(9), 5176-83.
- Scarborough RM, Jamieson GC, Kalish F, Kramer SJ, McEnroe GA, Miller CA, Schooley DA (1984). Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 81, 5575-5579.
- Scott M, Lubin B, Zuo L, Zuo L, Kuypers F (1991). Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 118, 7-16.
- Sies H (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 82(2), 291-295.
- Szakosova K (2015). Vliv oxidativního stresu na telomerickou délku u *Drosophila melanogaster*. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. Mgr. Thesis, in Czech. 35.
- Sheen FM, Levis RW (1994). Transposition of the LINE-like retrotransposon *TART* to *Drosophila* chromosome termini. *National Academy of Sciences*. 91(26), 12510-12514.
- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 279(6), L1005- L1028.
- Turrens JF (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Bioscience Reports*. 17, 3-8.
- Turrens JF (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. 552(2), 335-344.

- Uttara B, Singh AJ, Zamboni P, Mahajan RT (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*. 7, 65-74.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M & Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 39(1), 44-84.
- Van der Horst DJ, Van Marrewijk WJA, Diederens JH (2001). Adipokinetic hormones of insect: release, signal transduction, and responses. *International of Review of Cytology*. 211, 179–240.
- Van Heerebeek L, Meischl C, Stooker W, Meijer CJLM, Niessen HWM, Roos D (2002). NADPH oxidase (s): new source (s) of reactive oxygen species in the vascular system? *Journal of Clinical Pathology*. 55(8), 561-568.
- Velki M, Kodrík D, Večeřa J, Hackenberger BK, Socha R (2011). Oxidative stress elicited by insecticides: a role for the adipokinetic hormone. *General and Comparative Endocrinology*. 172, 77-84.
- Večeřa J, Krishnan N, Alguicer G, Kodrík D, Socha R (2007). Adipokinetic hormone-induced enhancement of antioxidant capacity of *Pyrrhocoris apterus* hemolymph in response to oxidative stress. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*. 146(3), 336-42.
- Vermeulen CJ, Van De Zande L, Bijlsma R (2005). Resistance to oxidative stress induced by PQ correlates well with both decreased and increased lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*. 6(6), 387–395.
- Vinokurov K, Bednářová A, Tomčala A, Stašková T, Krishnan N, Kodrík D (2014). Role of adipokinetic hormone in stimulation of salivary gland activities: The fire bug *Pyrrhocoris apterus* L. (Heteroptera) as a model species. *Journal of Insect Physiology*. 60, 58-67.
- Watson JD (1972). Origin of concatemeric T7DNA. *Nature*. 239(94), 197-201.
- Wiseman H & Halliwell B (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *The Journal of Biochemistry*. 313, 17-29.

- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW (1996). Telomerase Activity in Human Germline and Embryonic Tissues and Cells. *Developmental Genetics*. 18, 173-179.
- Yang JH, Lee HC, Lin KJ, Wei YH (1994). A specific 4977- bp deletion of mitochondrial DNA in human aging skin. *Archives of Dermatological Research*. 286, 386-390.
- Zangar RC, Davydov DR, Verma S (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 199(3), 316-331.
- Zemanová M, Stašková T, Kodrík D (2016). Role of adipokinetic hormone and adenosine in the anti-stress response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology*. 91-92, 39-47.
- Zhu H, Belcher M, van der Harst P (2011). Healthy aging and disease: role for telomere biology? *Clinical Science*. 120, 427-440.