

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Diferenciální genová exprese mezi krátkověkou kastou  
dělníků a dlouhověkou kastou neotenických králů termita  
*Prorhinotermes simplex***

Diplomová práce

**Bc. Miloslav Brejcha**

Školitelka: RNDr. Radmila Čapková Frydrychová Ph.D.

České Budějovice 2023

Brejcha, M., 2023: Diferenciální genová exprese mezi krátkověkou kastou dělníků a dlouhověkou kastou neotenických králů termita *Prorhinotermes simplex*. [Differential gene expression between the short-lived worker caste and the long-lived neotenic king caste of the termite *Prorhinotermes simplex*. Mgr. Thesis, in Czech.] -156 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace:

Transcriptomes of workers and young and old neotenic kings of the termite *Prorhinotermes simplex* were sequenced. The sequencing results were subjected to differential gene expression analysis to reveal the genes underlying the differences in lifespans between these two castes. Differentially expressed genes were functionally annotated and subjected to gene enrichment analysis. Weighted gene co-expression network analysis was also used.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

České Budějovice, 8. 12. 2023

Miloslav Brejcha

# Obsah

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. TEORIE STÁRNUTÍ A JEHO MECHANISMY .....	1
1.1.1. <i>Neevoluční teorie – mechanismy stárnutí</i> .....	1
1.1.1.1. Volné kyslíkové radikály a oxidační stres .....	1
1.1.1.2. Mitochondriální dysfunkce .....	3
1.1.1.3. Narušení proteinové homeostáze .....	4
1.1.1.4. Akumulace somatických mutací a nestabilita genomu.....	5
1.1.1.5. Změny v na živiny citlivých signálních drahách a vliv dietární restrikce 6	
1.1.1.6. Změny v aktivitě imunitního systému a zánětlivé odpovědi .....	9
1.1.2. <i>Evoluční teorie</i> .....	10
1.2. EUSOCIALITA A TERMITI .....	12
1.2.1. <i>Definice eusociality a známý eusociální hmyz</i> .....	12
1.2.2. <i>Termiti (Isoptera)</i> .....	14
1.2.2.1. Kastovní systém termitů, návaznost na styl hnízdění a kastovní determinace	16
1.3. STÁRNUTÍ U SOCIÁLNÍHO HMYZU .....	21
1.4. PRORHINOTERMES SIMPLEX (RHINOTERMITIDAE: PRORHINOTERMITINAE).....	26
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>27</b>
<b>3. METODY</b> .....	<b>27</b>
3.1. ODBĚRY VZORKŮ KAST TERMITŮ .....	27
3.2. IZOLACE CELKOVÉ RNA .....	28
3.3. PŘÍPRAVA RNA-SEQ KNIHOVNY A JEJÍ SEKVENACE (PRO TVORBU REFERENČNÍHO	
TRANSKRIPTOMU) .....	28
3.4. DE-NOVO SESTAVENÍ A ANOTACE REFERENČNÍHO TRANSKRIPTOMU.....	28
3.5. PŘÍPRAVA QUANT-SEQ KNIHOVEN A JEJICH SEKVENACE (PRO ANALÝZU	
DIFERENCIÁLNÍ EXPRESE).....	29
3.6. PRIMÁRNÍ ANALÝZA QUANT-SEQ DAT .....	30
3.7. ANALÝZA DIFERENCIÁLNÍ EXPRESE .....	30
3.8. FUNKČNÍ ANOTACE DIFERENCIÁLNÍ EXPRIMOVANÝCH GENŮ A JEJICH ENRICHMENT. 31	
3.9. KONSTRUKCE VÁŽENÉ GENOVÉ KOEXPRESNÍ SÍTĚ (WGCNA) A JEJÍ VIZUALIZACE... 31	
3.10. KORELACE MODULŮ A ZNAKŮ, VÝPOČET VLASTNOSTÍ GENOVÉ SÍTĚ A JEJICH	
KORELACE.....	32
3.11. FUNKČNÍ ANOTACE MODULŮ A JEJICH ENRICHMENT .....	33
<b>4. VÝSLEDKY</b> .....	<b>34</b>
4.1. ZÍSKANÁ SEKVENAČNÍ DATA, BUSCO A PCA ANALÝZA.....	34
4.2. VÝSLEDKY ANALÝZY DIFERENCIÁLNĚ EXPRIMOVANÝCH GENŮ .....	37
4.2.1. DEG SPOJENÉ S AUTOFÁGIÍ A APOPTÓZOU .....	37
4.2.2. DEG SPOJENÉ S ODPOVĚDÍ NA OXIDAČNÍ STRES.....	40
4.2.3. DEG SPOJENÉ SE SIGNALIZAČNÍMI DRÁHAMÍ S VLIVEM NA APOPTÓZU.....	42
4.2.4. DEG SPOJENÉ S TOLL SIGNALIZACÍ, PATERN ROZEZNÁVAJÍCÍMI RECEPTORY (PPR)	
A ANTIMIKROBIÁLNÍMI PEPTIDY (AP) .....	44

4.2.5. DEG SPOJENÉ S POŠKOZENÍM DNA, PROTEINOVOU HOMEOSTÁZÍ, SESTRÍHEM MRNA A TE .....	45
4.2.6. DEG SPOJENÉ S REGULACÍ BUNĚČNÉHO CYKLU .....	48
4.2.7. DEG SPOJENÉ S DETOXIFIKAČNÍMI MECHANISMY .....	50
4.2.8. DEG SPOJENÉ S AKTIVITOU JUVENILNÍHO HORMONU .....	51
4.2.9. DEG SPOJENÉ S METABOLISMEM LIPIDŮ .....	52
4.3. VÝSLEDKY FUNKČNÍ ANOTACE A ENRICHMENTU DIFERENCIÁLNĚ EXPRIMOVANÝCH GENŮ	53
4.4. PŘEDZPRACOVÁNÍ DATASETU GENOVÉ EXPRESE A TVORBA VÁŽENÉ GENOVÉ KOEXPRESNÍ SÍTĚ (WGCNA).....	55
4.5. IDENTIFIKACE MODULŮ ASOCIOVANÝCH SE STÁŘÍM JEDINCE ČI JEHO KASTOVNÍ PŘÍSLUŠNOSTÍ. ....	58
4.6. ANALÝZA GENOVÉ SÍTĚ VYBRANÝCH MODULŮ .....	60
4.7. FUNKČNÍ ANOTACE A TZV. ENRICHMENT ANALÝZA VYBRANÝCH GENOVÝCH MODULŮ	61
4.8. CHARAKTERIZACE PROFILŮ GENOVÉ EXPRESE U VYBRANÝCH MODULŮ, VIZUALIZACE JEJICH GENOVÉ SÍTĚ A IDENTIFIKACE HUB GENŮ. ....	62
<b>5. DISKUZE.....</b>	<b>69</b>
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>93</b>
<b>7. SEZNAM ZKRATEK.....</b>	<b>95</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>97</b>

# 1. Úvod

## 1.1. Teorie stárnutí a jeho mechanismy

Proces stárnutí, také nazývaný senescence, je neoddelitelnou součástí života náš všech, a tak hledání jeho příčiny a původu je od nepaměti předmětem lidského bádání a mnoha vědeckých výzkumů. Pro senescenci existuje velký počet, většinou v principu podobných, definic. Od komplexnějších, jako je progresivní zhoršování funkcí organismu doprovázené poklesem fertility a nárůstem mortality během postupujícího věku jedince <sup>1,2</sup>, po jednodušší, jako je zvyšující se mortality se zvyšujícím se chronologickým věkem v divoké populaci <sup>3</sup>. Ačkoliv se stárnutí může na první pohled jevit jako univerzální fenomén napříč rostlinnou a živočišnou říší, organismy nevykazující věkový nárůst v mortality nebo pokles ve fertilitě <sup>4,5</sup> nám ukazují, že tento proces nejspíše nebude jednoduše popsitelný a principy jeho fungování, či dokonce příčiny jeho vzniku, se mohou mezi některými skupinami organismů lišit.

Dosud bylo formulováno mnoho teorií zabývajících se příčinami stárnutí a v základu by se daly rozdělit na neevoluční a evoluční. Neevoluční teorie považují původ stárnutí za proces nezávislý na přírodním výběru. Vysvětlují ho buďto stochasticky, jako důsledek nahromadění náhodných chyb v molekulách buněk, vyúsťující ve fyziologický pokles a senescenci <sup>6</sup>, nebo jen čistě popisující mechanismy stárnutí, bez bližšího vysvětlení důvodu jejich existence <sup>7</sup>. Evoluční teorie naopak vidí za vznikem senescence i roli selekce a dokonce mohou stárnutí popisovat jako geneticky určený program, který je adaptací populace na prostředí <sup>8,9</sup>.

### 1.1.1. Neevoluční teorie – mechanismy stárnutí

#### 1.1.1.1. *Volné kyslíkové radikály a oxidační stres*

Oxidační stres je mechanismus velmi často spojovaný se stárnutím. Jde o škodlivé oxidační působení reaktivních forem kyslíku (ROS) na strukturu a funkčnost buněčných molekul,

jako je DNA, proteiny a lipidy<sup>10-13</sup>. ROS mohou být tzv. volnými radikály, tedy atomy a molekulami obsahujícími nespárovaný elektron, který je činí reaktivními, ale i neradikálovými sloučeninami jako je peroxid vodíků ( $H_2O_2$ ), jehož silný oxidační potenciál spočívá ve slabé jednoduché vazbě mezi kyslíky jeho molekuly. V buňkách ROS vznikají během běžných metabolických pochodů. Jejich největšími producenty jsou mitochondriální elektronový transportní řetězec, nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidáza (NADPH oxidáza) a lipoxygenáza<sup>14-16</sup>. Prvotním ROS bývá superoxid ( $O_2^-$ ). Ten pak může být enzymaticky transformován na peroxid vodíku a ten dále buďto na kyslík a vodu, nebo na hydroxylový radikál ( $OH\cdot$ ), který je z těchto tří nejreaktivnější a má na makromolekuly neníživější efekt<sup>16-19</sup>.

ROS mají velký mutagenní potenciál vůči nukleovým kyselinám, a to především mitochondriální DNA (mtDNA). To může vést k defektům v procesech dýchacího řetězce, a tedy i k vyšší produkci dalších škodlivých ROS, dysregulaci mitochondriálních procesů a celkově ke snížení bioenergetické kapacity buněk<sup>20-23</sup>. Oxidace proteinů vede k jejich tzv. cross-linkingu (zesíťování), změny v jejich funkčnosti a následné cytotoxicitě<sup>24</sup>. Peroxidace nenasycených mastných kyselin má škodlivý vliv převážně na fosfolipidy v biologických membránách<sup>25,26</sup>. Oxidované molekuly navíc mohou samy působit jako volné radikály a formou redoxní kaskády šířit toto poškození dále<sup>19,27</sup>. Oxidační stres, množství ROS a jejich následky pozitivně korelují s věkem a jsou spojeny s řadou nemocí doprovázejících stárnutí, jako je Parkinsonova choroba<sup>28</sup>. V posledních letech se navíc ukazuje, že by ROS mohly napomáhat jak globální hypometylaci tak lokální hypermethylaci DNA, fenoménům také spojených se stárnutím, ovlivňujících změny v transkripci genomu<sup>29-32</sup>.

Buňky ovšem mají své mechanismy, jak se volným radikálům bránit. Tím jsou převážně antioxidanty. Patří mezi ně celá řada enzymů, např. superoxid dismutázy, glutathionperoxidázy, peroxiredoxiny a katalázy. Vyskytují se jak v cytosolu, tak v mitochondriích a jejich funkcí je zamezovat vzniku volných radikálů, či měnit jejich stav na méně reaktivní nebo nereaktivní<sup>33-36</sup>. Výsledky mnoha studií podpořily předpoklad, že zvýšená exprese antioxidantních enzymů koreluje s dlouhověkostí a snížením oxidačním stresem<sup>7,37,38</sup>. Jiné studie ovšem tyto závěry zpochybňují<sup>39-41</sup>. Pokusy na hád'átku navíc ukázaly, že vyšší exprese superoxid dismutázy (SOD) neprodlužovala život skrze odstranění ROS, ale pravděpodobně pomocí stimulace transkripčních faktorů napomáhajících ve stresové odpovědi endoplazmatického retikula a udržení proteinové homeostáze<sup>42</sup>.

ROS ale mají i svou pozitivní roli v řadě buněčných signalizací jako energetický metabolismus, obrana proti patogenům, proliferace, apoptóza, translace nebo regulace MAPK signalizační dráhy a mohou mít i pozitivní efekt na délku života skrze roli v protektivních stresových odpovědích<sup>43–48</sup>. Společně s faktem, že dlouhověké organismy vykazují nižší únik ROS z mitochondrií do cytoplazmy<sup>49</sup>, se nabízí otázka, zda příčina negativního efektu oxidačního stresu na stárnutí není přímo škodlivé působení ROS, ale spíše změny v regulaci jejich signalizace a v mechanismech udržujících je v biologicky přijatelných koncentracích<sup>50</sup>.

#### *1.1.1.2. Mitochondriální dysfunkce*

Dalším mechanismem, stojícím za stárnutím organismů, je s věkem se zvyšující poškození a dysfunkce mitochondrií<sup>49,51</sup>. Mitochondrie zajišťují produkci energie skrze buněčné dýchání, Krebsův cyklus, glykolýzu a beta-oxidaci. Mají také roli v buněčné signalizaci nebo syntéze steroidů<sup>52–55</sup>. Mitochondriální DNA je poměrně bohatá na geny a kóduje řadu faktorů důležitých pro oxidativní fosforylaci a další mitochondriální procesy<sup>56</sup>. Ovšem vykazuje několikanásobně vyšší míru mutací oproti jaderné DNA v závislosti na živočišném druhu<sup>57</sup>. Mitochondrie sice disponují podobnými reparačními mechanismy jako buněčné jádro a jejich polymeráza  $\gamma$  má rovněž proofreadingovou aktivitu, avšak na druhou stranu mají daleko vyšší míru replikace, což má za následek častější chybovost, kterou tyto mechanismy nejsou schopné dostatečně pokrýt. To je podpořeno i již zmíněným silným oxidativním prostředím v mitochondriích, umístěním mtDNA v blízkosti vnitřní membrány, kde dochází k produkci ROS, a nepřítomností protektivních histonů v mtDNA<sup>51,58–63</sup>. Množství mitochondriální mutací a dysfunkčních mitochondrií v tkáních pak koreluje se stoupajícím věkem a je navázáno na stařecké choroby<sup>6,49,51,64</sup>. Během stárnutí také dochází k poklesu biogeneze mitochondrií a k poklesu mitofágie (mechanismu odstraňujícího poškozené mitochondrie)<sup>65</sup> a díky tomu se zvyšuje zastoupení defektních mitochondrií v buňkách a tkáních.

Ztráta funkčnosti a zvýšená produkce ROS ale nemusí být jediným příspěvkem mitochondrií ke stárnutí. V důsledku poškození mtDNA vznikají fragmenty, u nichž byla pozorována inkorporace do jaderné DNA. Množství těchto inkorporovaných fragmentů se navyšuje s přibývajícím věkem, a dokonce koreluje s kratší délkou života<sup>49,66–70</sup>. Toto vkládání se zdá

být regulované a do jisté míry nenáhodné. Fragmenty mtDNA totiž mají tendenci vyskytovat se v oblastech bohatých na adenin a thymin, v oblastech otevřeného chromatinu a v pericentromerických oblastech<sup>44,71</sup>. Fragmenty bývají po vložení také ohraničeny retrotranspozibilními elementy, pomocí kterých dochází k jejich přenosu do genových sekvencí a regulačních oblastí, a tak i k poškození těchto oblastí<sup>70,72</sup>. Zároveň jejich umístění může mít za následek i chromozomální aneuploidie a přestavby<sup>49,73,74</sup>.

### *1.1.1.3. Narušení proteinové homeostáze*

Stárnutí je úzce spojeno se zvyšující se chybovostí v molekulách proteinů, doprovázené snížením specifity a aktivity mnoha enzymů, agregací poškozených proteinů a následnou toxicitou<sup>75-77</sup>. Původ těchto defektů je převážně ve dvou různých procesech. Prvním z nich je translace, která je oproti DNA replikaci a transkripci mnohonásobně náchylnější ke vzniku spontánních chyb<sup>78,79</sup>. Tyto chyby mohou mít negativní dopad na skládání a funkci proteinů a ovlivnit tak i jejich působení v dalších buněčných procesech souvisejících se syntézou proteinů a zpětnovazebně tak způsobovat další poškození. Příkladem je věkově spojená akumulace aberantních DNA polymeráz a dalších transkripčních komponentů vedoucí k chybám při transkripcích a následně i translacích<sup>79-83</sup>. Dalším procesem způsobujícím proteinová poškození jsou neenzymatické modifikace. Sem patří výše zmiňovaná oxidace, působící buď přímo na aminokyselinové zbytky nebo jako důsledek reakce s vedlejšími produkty lipidické oxidace<sup>83-85</sup>. Druhým zástupcem těchto modifikací je glykace, což je reakce karbohydrátů, především glukózy, s volnými aminokyselinovými zbytky proteinů. Je častou příčinou poškození tkání u lidí trpících cukrovkou<sup>83,86</sup>. Produkty glykace se nazývají Amadoriho produkty a jsou to velmi reaktivní látky, které mohou dále reagovat s proteiny i lipidy a vytvářet takzvané pokročilé produkty glykace (AGE), které poškozují buňky díky svým oxidativním a prozánětlivým vlastnostem<sup>83,86-89</sup>.

Proteinová poškození jsou často ireverzibilní, a to zvláště ta vzniklá oxidací nebo glykací<sup>11,90,91</sup>. Hlavním mechanismem buněk k odstranění poškozených proteinů je aktivita proteinového komplexu zvaného proteasom. Ten rozpoznává poškozené proteiny označené pomocí ubiquitinace a následně je degraduje<sup>92-94</sup>. Pokud ale nejsou tyto proteiny proteasomem rozpoznány nebo je funkce tohoto proteolytického komplexu poškozena, dochází k jejich akumulaci v buňkách. Takovéto proteiny mohou dále oxidovat a vytvářet



kovalentní zesíťování s vedlejšími aldehydickými produkty lipidické peroxidace. Jejich zesíťování je schopno dospět až do fáze takzvaných aggresomů. Aggresomy jsou velké hydrofobní a nerozpustné agregáty poškozených a zesíťovaných proteinů, které již není možné degradovat v proteazomu, a které působí toxicky vůči buňkám<sup>85,95–99</sup>. Ve stáří lze pozorovat jejich narůstající počet a roli v řadě neurodegenerativních onemocnění<sup>100</sup>. Zároveň je během toho zaznamenáván i pokles v aktivitě proteazomu<sup>101,102</sup>. Experimentální zvýšení exprese či aktivity proteazomu pak vede k prodloužení délky života<sup>103–105</sup>.

Mezi další mechanismy zabráňujícím akumulaci proteinových chyb v buňkách patří kontrola skládání proteinů (např. pomocí chaperonů a proteinů teplotního šoku)<sup>106–108</sup>, redukce syntézy proteinů (např. pomocí snížení aktivity Insulin/TOR signalizace)<sup>109,110</sup>, či autofágie (odstranění poškozených buněčných komponent)<sup>111</sup>. Změny v těchto procesech doprovázejí proces stárnutí<sup>112–118</sup>. Společně se syntézou a degradací proteinů jsou tyto mechanismy součástí komplexního systému udržující v buňkách proteinovou homeostázi, jejíž dysregulace či kolaps může být jednou z příčin senescence<sup>119,120</sup>.

#### *1.1.1.4. Akumulace somatických mutací a nestabilita genomu*

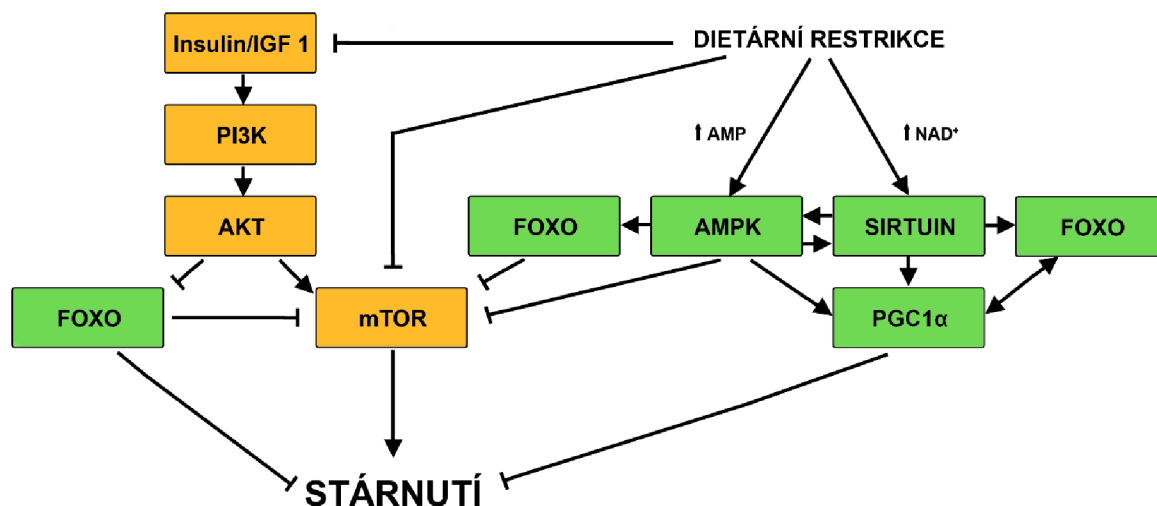
Během postupujícího života se v buňkách akumuluje velké množství somatických mutací a genetických chyb. To může ovlivnit funkci esenciálních genů a transkripci, následně vést k dalším chybám, dysfunkci buněk a až k funkčnímu selhání a smrti organismu<sup>121–124</sup>. Nejvíce patrné jsou tyto změny v případě poškození kmenových buněk, protože ty omezují dostatečnou obnovu tkání<sup>125,126</sup>. Stabilitu DNA ohrožují jak exogenní faktory ve formě ionizujících záření, či chemických mutagenů, tak faktory endogenní, jako jsou chyby v DNA replikaci nebo působení ROS. Buňky ovšem disponují obsáhlým systémem mnoha opravných mechanismů, které s velkou úspěšností těmto chybám zamezují<sup>123,127</sup>. Problém nastává v případě jejich nefunkčnosti. DNA opravná kapacita koreluje s délkou života<sup>128</sup>, defekty v opravných mechanismech způsobují urychlení stárnutí a doprovázejí syndromy překotného stárnutí, například Wernerův syndrom<sup>123,129,130</sup>.

Krom přímých změn ve struktuře DNA doprovází stárnutí i rozsáhlé změny v epigenetickém kódu. V úrovni DNA dochází k rozsáhlým hypomethylacím, ale i k hypermethylacím<sup>131–133</sup>. Hypomethylace krom změn v regulacích genové exprese, může vést i k aktivaci dříve metylací umlčených transpozibilních elementů a umožnit jim tak projevit svůj genotoxický

potenciál. Přičemž je známo, že aktivita těchto elementů ve stáří narůstá<sup>134–136</sup>. Hypermetylované oblasti DNA jsou naopak transkripčně utlumeny a k tomu s přibývajícím věkem dochází například u regulačních oblastí tumor supresorových genů<sup>131</sup>. Dále je známo, že na projev stárnutí mají vliv i některé histonové modifikace<sup>137</sup>. Například zvýšená exprese řady histon deacetyláz ze skupiny sirtuinů vede k prodloužení života u myší i bezobratlých<sup>138–142</sup>. Během stárnutí také dochází k přestavbám a redukci heterochromatinu<sup>143,144</sup>. S přibývajícím věkem dochází například ke snížení množství heterochromatinového proteinu 1α<sup>145</sup>. Tento protein byl u drozofily geneticky manipulován, přičemž při ztrátě jeho funkce docházelo ke zkrácení života a naopak při zvýšení exprese k prodloužení života<sup>146</sup>.

#### *1.1.1.5. Změny v na živiny citlivých signalizačních drahách a vliv dietární restrikce*

O dietární restrikci (DR), tedy omezeném příjmu všech či některých živin v potravě, je známo, že u modelových živočichů a mnoha dalších eukaryot způsobuje prodloužení života a zpomalení stárnutí<sup>147–153</sup>. Zdá se, že efekt DR na organismus zprostředkovávají buněčné signalizační dráhy citlivé na hladiny živin, z nichž je řada evolučně velmi konzervovaná<sup>154–158</sup>. V rámci odpovědi na nutriční stav tyto dráhy regulují mnoho buněčných pochodů jako je růst, proliferace, stresové odpovědi, oxidační stres, energetický metabolismus a reprodukce, přičemž ke změnám v regulaci a aktivitě těchto dochází právě při procesu stárnutí (podrobněji dále v textu). Jednotlivé komponenty těchto drah spolu navíc často úzce interagují (Obr. 1).



**Obr. 1: Zjednodušený model vztahu mezi na živiny citlivými dráhami s vlivem na stárnutí:** Dietární restrikce snižuje aktivitu Insulin/IGF 1 signální dráhy, což vede k poklesu aktivity fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) a k poklesu AKT a následně tak k inhibici mammalian targeted of Rapamycin (mTOR) a k aktivaci Forkhead Box O transkripčního faktoru (FOXO), který dále inhibuje mTOR. Dochází k poklesu v syntéze proteinů a proliferaci a jsou aktivovány geny s rolí v proteinové homeostázi a rezistenci vůči stresu s potlačujícím efektem na stárnutí. Dietární restrikce také stojí za zvýšenými hladinami adenosinmonofosfátu (AMP) a redukovaného nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD<sup>+</sup>), kteří aktivují AMP aktivovanou kinázu (AMPK) a sirtuiny (Sirt). Mezi AMPK a sirtuiny dochází k vzájemné stimulaci. AMPK působí inhibičně na mTOR. AMPK i Sirt aktivují FOXO a zároveň i stimulují proliferace aktivovaný koaktivátor receptoru gama 1α (PGC1α), který také koaktivuje FOXO. V důsledku toho jsou spuštěny exprese antioxidantních enzymů, dráhy s rolí v autofágii a mitofágii a další metabolické dráhy s potlačujícím vlivem na stárnutí. Obrázek a informace v popisku převzaty a upraveny z Pignatti et al. 2020 a z López-Otín et al. 2013 <sup>159,160</sup>.

Kostrou a klíčovým komponentem odpovědi na živiny se zdá být Insulin/IGF signální dráha (IIS). Ta začíná sekrecí inzulínových peptidů v odpovědi na příjem potravy, především na glukózu, ale i některé aminokyseliny. Jejich navázáním na příslušné receptory dojde k aktivaci IIS dráhy, která působí především zvýšením buněčného růstu, proliferace a anabolické produkce <sup>161–166</sup>. Tento efekt je vykonán převážně aktivací v dráze níže umístěného mTORC1 komplexu (více dále v textu). Genetické manipulace vícero komponentů IIS dráhy, vedoucí ke snížení její aktivity, způsobují prodloužení života modelových organismů <sup>167–174</sup>. Stejně tak dietní restrikce a hladovění stojí za nižší aktivitou IIS dráhy <sup>175–178</sup>. Ovšem i přirozené stárnutí je doprovázeno poklesem činnosti IIS dráhy, což by mohla být reakce organismu na stresové podmínky systematického poškození vznikajícího v průběhu života, protože omezený buněčný růst a míra metabolismu vede k nižší generaci dalších poškození a chyb <sup>179,180</sup>. Mutace této dráhy také způsobují

sterilitu<sup>167,168,181</sup>, a to by mohlo vysvětlovat pokles v reprodukci během kalorické restrikce<sup>1,182</sup>. To „společně s faktem, že IIS dráha také snižuje kapacitu opravných mechanismů buněk skrze inhibici FOXO proteinů (více o nich dále v textu), dělá z této signalizace skvělého kandidáta na jeden z mechanismů účinkujících v teoriích stárnutí, jako jsou antagonistická pleiotropie a postradatelné soma (viz. kapitola Evoluční teorie stárnutí).

Mammalian targeted of Rapamycin (mTOR) je serin/threoninová kináza figurující ve dvou proteinových komplexech mTORC1 a mTORC2, které jsou součástí IIS dráhy<sup>183</sup>. Známé jsou především vlastnosti prvního komplexu. Ten krom toho, že je aktivován insulinovou signalizací, i samostatně reaguje na hladiny aminokyselin a některých jednoduchých cukrů v organismu<sup>183–186</sup>. Podporuje buněčný růst, proliferaci a snad většinu aspektů anabolismu jako je syntéza proteinů a lipogeneze<sup>183,187–192</sup>. Stimuluje glykolýzu, ale snižuje aktivitu ostatních katabolických drah<sup>193–197</sup>. Také potlačuje autofágii a tvorbu lyzozomů, čímž tedy negativně ovlivňuje udržení proteostáze<sup>198–202</sup>. Jeho aktivita se snižuje při DR a jeho inhibice má podobné efekty jako DR<sup>203–207</sup>. Genetické a farmakologické snížení aktivity mTOR stojí za vyšší délkou života modelových organismů<sup>208–213</sup>.

Forkhead Box O transkripční faktory (FOXO) hrají velkou roli v přežívání a délce života organismu v reakci na stresové podmínky a nedostatek živin. Děje se to formou autofágie, rezistencí na stres, zastavením buněčného cyklu, potlačením zánětu, produkcí antioxidantů, aktivací DNA opravných mechanismů, mitochondriogenezi a katabolickými pochody, jako je glykogenolýza a přechod z glykolýzy na oxidaci mastných kyselin<sup>175,214–225</sup>. Veskrze jsou to tedy pochody známé pro svůj pozitivní dopad na zdraví a délku života. FOXO jsou také komponentem IIS dráhy, ve které dochází k jejich inhibici<sup>226,227</sup>.

O sirtuinech a jejich vlivu na epigenetiku bylo psáno již v přechozí podkapitole. Tyto deacetylázy se ovšem také účastní odpovědi na živiny. Konkrétně jsou aktivovány za stavu vysoké koncentrace redukovaného nikotinamid adenin dinukleotidu (NAD<sup>+</sup>), což znamená v situaci nedostatku energie během hladovění či fyzické námahy<sup>228–230</sup>. Krom vlivu na epigenom svojí deacetylační aktivitou ovlivňují velké množství enzymů zapojených jak do katabolismu, tak do anabolismu, oxidačního stresu, zánětu, autofágie a mitofágie, oprav DNA a obecně do stavu, který přispívá k přežití buněk<sup>231–245</sup>. Jejich aktivita a vliv na zmíněné buněčné pochody jsou propojeny se zdravým stářím a dlouhověkostí<sup>139,246–249</sup>. Deacetylací také umožňují aktivitu FOXO proteinů<sup>250,251</sup>.

Podobně jako sirtuiny pak na nízké stavy energie reaguje i AMP aktivovaná kináza (AMPK). Ta ovšem na místo  $\text{NAD}^+$  odpovídá na vysoké koncentrace adenosinmonofosfátu (AMP) <sup>157</sup>. Obdobně jako FOXO proteiny stimuluje katabolické procesy a upozaďuje anabolické procesy, a to především tvorbu mastných kyselin, triglyceridů a cholesterolů <sup>252,253</sup>. Také inhibuje aktivitu TORC1 <sup>254</sup> a naopak fosforylací aktivuje FOXO proteiny, skrze které inhibuje prozánětlivý transkripční faktor NF- $\kappa$ B <sup>255</sup>. Navíc má zpětnovazebný vztah se Sirtuinem 1, ve kterém si oba komponenty navzájem podporují svou aktivitu <sup>252,256</sup>. Aktivace AMPK způsobuje prodloužení života u modelových organismů <sup>257,258</sup>.

#### *1.1.1.6. Změny v aktivitě imunitního systému a zánětlivé odpovědi*

Stárnutí doprovází i dysregulace homeostáze imunitního systému a zánětlivých odpovědi, často nazývaná imunosenescence. Dochází k poklesu obranyschopnosti vůči patogenům pomocí nespecifické i adaptivní imunity, snižuje se produkce protilátek, zvyšuje se poměr paměťových buněk oproti naivním (tedy se snižuje schopnost adaptovat imunitu na nové patogeny), imunitní buňky ztrácejí schopnost fagocytózy, zhoršuje se hojení ran a zvyšuje se pravděpodobnost vzniku autoimunity <sup>259–270</sup>. Naopak se ve vyšším věku mnohdy vytváří chronický zánět, který poškozuje tkáně a orgány a doprovází rozvoj nemocí, jako je diabetes druhého typu, ateroskleróza, nemoci jater, obezita nebo revmatoidní artritida <sup>271–275</sup>. Receptory spouštějící zánětlivou signalizaci jsou aktivovány kontaktem s molekulami virového a bakteriálního původu, ale také molekulami vlastního těla, které jsou poškozené nebo chybně lokalizované <sup>268,276–278</sup>. Proto ke vzniku chronického zánětu ve stáří může docházet vlivem akumulace tkáňového poškození, neschopností imunitního systému zcela zbavovat tělo patogenů a hostitelských buněk, nebo defektem v autofágii <sup>271</sup>. Senescentní buňky jsou také známé pro svůj sklon produkovat prozánětlivé cytokiny <sup>279</sup>. Vznik zánětu pak vede k aktivaci dalších prozánětlivých drah a k narůstající produkci interleukinů, faktorů nádorové nekrózy a interferonů <sup>271,280</sup>. Během stárnutí se například zvyšuje aktivita prozánětlivého transkripčního faktoru NF- $\kappa$ B <sup>281,282</sup>. Zánět je ve stáří také vyvoláván zvýšeným příjmem živin <sup>283,284</sup>. Důvod může být jednak v působení dříve již zmiňovaných na živiny citlivých buněčných drah na pro- i proti-zánětlivé reakce (vizte předchozí podkapitolu) a jednak ve vlastnostech prozánětlivých receptorů. Ty patří mezi patern rozeznávající receptory a mají pravděpodobně společnou evoluční historii s receptory živin.

Proto některé z nich, například Toll-like receptory, reagují i na složky živin<sup>285–294</sup> a zároveň některé chemosenzorické receptory vyvolávají zánětlivé reakce<sup>295–297</sup>. Také složení střevní mikroflóry má velký vliv na imunitu a zánětlivé reakce a změny ve složení střevních mikroorganismů pak u velmi starých lidí korelují s nárůstem koncentrací prozánětlivých cytokinů<sup>298–300</sup>.

Imunosenescence se vyskytuje u obratlovců i bezobratlých, a to navzdory odlišnostem v komplexitě jejich imunitních systémů, protože bezobratlí zcela postrádají adaptivní imunitu<sup>301</sup>. Pro nalezení společných proměnných mezi obratlovcem a bezobratlými srovnávali ve studii Fabian et al. 2021 známe geny s pleiotrofními účinky na imunitu a stárnutí u člověka a tří modelových organismů – *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans* a *Drosophila melanogaster*<sup>302</sup>. Mezi nimi identifikovali celkem 7 konzervovaných signálních drah, a to Insulin/TOR signalizaci, tři MAPK (ERK, p38 a JNK), JAK/STAT, TGF- $\beta$ , a NF- $\kappa$ B dráhy. Nutno podotknout, že ne všechny jsou společné pro všechny čtyři druhy zároveň a jejich efekty na imunitu a stárnutí jsou často závislé na kontextu, jako typ tkáně, pohlaví, nebo druh patogenu.

### 1.1.2. Evoluční teorie

Nejznámější evoluční teorie stárnutí vycházejí ze společného předpokladu slabé síly selekce v postreprodukčním věku jedince<sup>303–305</sup>. Přestavme si nestárnoucí populaci s neměnicí se mírou reprodukce a vnější (na věku nezávislé) mortality napříč všemi věkovými skupinami. Nově vznikající mutace se škodlivým vlivem na fitness, tedy na schopnost přežívání a reprodukce, budou z populace selekčně odstraněny mnohem dříve a účinněji, pokud se projevují již v nízkém věku. Naopak ty projevující se ve věku vyšším jsou častěji předávány na potomky a selekci tak unikají. V průběhu generací se pak hromadí a vytvářejí senescentní populaci, ve které jsou již před přírodním výběrem skryté, protože se naplno projevují až v postreprodukčním věku<sup>9,304,305</sup>. První teorií vycházející z tohoto modelu je teorie nahromadění mutací<sup>304</sup>. V ní je senescence důsledkem mnoha škodlivých mutací, které samostatně ovlivňují fitness jen mírně a díky tomu unikají selekčnímu tlaku. Jejich nahromaděný efekt se pak ukazuje až ve vyšším věku.

Další z těchto teorií je antagonistická pleiotropie<sup>306</sup>. Pokud je gen schopen ovlivňovat více než jeden znak, je označován jako pleiotropní<sup>307</sup>. Rozdílné účinky genu se pak mohou

projevovat v odlišných časových obdobích, to znamená v různých věkových či vývojových stádiích. Navíc efekty genu mohou být protichůdné (antagonistické). Tato teorie pak říká, že objeví-li se v populaci mutace zvýhodňující fitness organismu v průběhu mládí, ale se škodlivým efektem postupně se projevujícím ve vyšším věku, je tato mutace v populaci selekčně ukotvena, protože u mladé generace zvýší reprodukční úspěšnost, zatímco její negativní působení ve stáří je skryto před přírodním výběrem.

V teorii postradatelného soma je pak předmětem zájmu „trade-off“ (kompromis) v alokaci energie mezi mechanismy udržující funkčnost somatických buněk a reprodukci<sup>305,308</sup>. Protože zdroje energie nejsou neomezené, organismy se musí rozhodnout, zda více investují do údržby svého těla, a tím pravděpodobně i vyšší délky života, nebo tyto zdroje přeměrují do svého reprodukčního potenciálu a zvýší tak svoji úspěšnost v předání genetické informace do dalších generací. Jestliže je přežití druhu v jeho prostředí nejisté, může vyšší investice do rozmnožování poskytnout oproti dlouhověkosti vyšší selekční výhodu<sup>308–310</sup>. Tato teorie bývá považována za rozšíření antagonistické pleiotropie, protože ve výsledku mluví o sadě pleiotropních genů přesouvajících metabolickou energii od údržby somatických buněk na reprodukční pochody<sup>311</sup>. Zároveň ladí s fenoménem „cost of reproduction“ (poplatek za reprodukci), který je známý u mnoha živočichů, a popisuje fakt, kdy organismy s nižší mírou rozmnožování mají delší životnost a naopak<sup>303,312,313</sup>.

Speciální podskupinou evolučních teorií jsou pak takzvané programové teorie stárnutí. Zatímco výše zmíněné evoluční a neevoluční teorie popisují stárnutí jako důsledek nahromadění defektů a nepříznivých mutací v organismu z důvodu nedostatečné síly přírodního výběru či působení opačných selekčních sil, programové teorie přímo předpokládají, že je senescence selekčně zvýhodňována a omezená délka života je evoluční výhodou<sup>314,315</sup>. Hlavní otázkou tedy je, co je tou evoluční výhodou? Většina dosavadních teorií by se dala shrnout tak, že stárnutí je jakýsi altruistický plán, který v prostorově strukturovaných populacích zajišťuje odstranění jedinců v postreprodukční fázi života. Díky tomu nedochází ke kompetici o zdroje s jejich potomstvem a zvyšuje se generační obrat, jehož výsledkem je urychlení evoluce a zvýšená schopnost populace adaptovat se na podmínky prostředí<sup>3,314,316–320</sup>. Tento program by pak mohl být vykonáván přímo „senescentními“ geny přítomnými v genomu<sup>321</sup>.

Byla publikována řada článků a studií, argumentujících ve prospěch neevolučních či evolučních, programových či neprogramových teorií<sup>1,6,7,309,314,315,322–324</sup>. Z jejich závěrů

se lze dovtípit, že zatím nebyla definována žádná teorie, která by zvládla samostatně vysvětlit veškeré známé charakteristiky stárnutí. Množství z nich je ale schopno interpretovat dílčí procesy senescence. Proto se do budoucna nabízí otázka, zda není potřeba vytvořit jakousi unifikovanou teorii stárnutí. Ta by brala v potaz poznatky teorií předchozích a na místo obhajování pravdivosti jednotlivých pohledů na věc, se mezi jednotlivými teoriemi snažila najít konsenzus<sup>325–329</sup>.

## 1.2. Eusocialita a termity

### 1.2.1. Definice eusociality a známý eusociální hmyz

Eusocialita je brána za nejvyšší úroveň sociality a většinou je definována třemi následujícími pravidly: 1) dospělí jedinci téhož druhu spolupracují v péči o potomstvo; 2) dochází k překryvu nejméně dvou dospělých generací; 3) existuje reprodukční dělba práce za přítomnosti více či méně neplodných jedinců<sup>330,331</sup>. Taková definice může být pro představení si eusociálních společenstev poněkud strohá, proto jejich podoba bude v následujících odstavcích popsána podrobněji, a to především s přihlédnutím k eusociálním zástupcům z třídy hmyzu (*Insecta*).

Reprodukční dělba práce je primárním kastovním rozdělením eusociálních společenstev na základě schopnosti rozmnožovat se, a to tedy na kasty reprodukční a kasty nereprodukční. Reprodukční kasta je většinou zastoupena jedním či několika málo jedinci, nazývanými královny a králové. V případě úspěšného založení kolonie, je hlavním posláním reprodukčních jedinců produkce potomků, tedy udržování a navyšování počtu členů hnízda. K tomu jsou vybaveni vysokou plodností, kdy například zástupci z řad eusociálního hmyzu produkují tisíce a více vajíček denně. Naopak, jedinci nereprodukční kasty se dočasně či úplně vzdávají schopnosti sami se rozmnožovat ve prospěch kasty reprodukční, s tím, že kooperativně přebírají péči o potomstvo a další práce důležité pro přežití kolonie, jako je obrana před predátory a kompeticí, obstarání potravy nebo stavba hnízda. Proto jsou označováni jako dělníci či pomocníci. Mezi dělníky pak může docházet k další dělbě práce, přičemž vznikají skupiny se specializovaným chováním či morfologickými a fyziologickými vlastnostmi, zaměřenými na konkrétní úkoly, např. obranu.<sup>330–340</sup> S ohledem na to, se zde vyskytuje další jev, který je pro eusociální druhy typický, a tím je polyfénismus.



Polyfénismus je specifickým typem fenotypové plasticity, během které tentýž genotyp může dát vzniknout fenotypově odlišným jedincům<sup>330,341,342</sup>. Veškeré činnosti vykonávané kolonií jsou navíc přesně organizované a koordinované. Komunikace probíhající mezi členy společenství má vícero podob, ať už vizuálních, např. v podobě včelích tanečků, zvukových, jako například vibrační signály termitů, ale především chemických ve formě feromonů<sup>343-345</sup>.

Z evolučního pohledu je zajímavý altruismus spojený s nereprodukčními kastami. Dělníci se totiž omezením svého reprodukčního potenciálu, nebo až svou úplnou sterilitou, vzdávají své vlastní fitness a naopak svou péčí podporují fitness reprodukčních jedinců. To je navíc podpořeno zvýšeným rizikem mortality při obraně hnízda nebo práci mimo něj a celkovou vlastností dělníků některých druhů se sebeobětovat ve prospěch celku<sup>346-351</sup>. Evoluční opodstatnění vzniku pomocného chování a altruismu u dělníků, které je jednou z příčin vzniku eusociálních společenství, se v současné době pokouší vysvětlit dva hlavní teoretické proudy. Jeden z nich využívá konceptů příbuzenského výběru (kin selection) a inkluzivní fitness. Zjednodušeně řečeno, příbuznost mezi jedinci znamená, že sdílejí část své genetické informace (v průměru 50 % mezi sourozenci a 25 % s jejich potomky), čímž může jedincova fitness narůst i nepřímo vlivem reprodukčního úspěchu jeho příbuzných, kteří předají jim společné alely do další generace. V případě, že je vlastní reprodukce spojena s vysokými riziky (nebezpečí predace při disperzi, energetická náročnost zakládání vlastního hnízda a samostatné péče o potomky, apod.), může napomáhání příbuzným jedincům zvýšit jejich fitness, a tím i vlastní nepřímou fitness, která se stane významnější než ta přímá. Ve výsledku to vede až ke vzniku altruismu a v důsledku toho i eusociálního společenství<sup>347,348,352-355</sup>. Velkou roli může mít tento princip u haplodiploidních druhů, jako jsou eusociální zástupci řádu blanokřídlých (*Hymenoptera*), kde je příbuznost mezi jedinci ještě vyšší (až 75 % mezi sourozenci a 37,5 % k potomkům sourozenců)<sup>353,356</sup>. Druhý z proudů se pak zaměřuje na roli skupinové selekce (group selection) a mutualismu v původu altruismu. Opět zjednodušeně, jednotlivci jsou součástí většího celku, skupiny, ve které spolu kooperují, protože spolupráce zvyšuje jejich individuální fitness. Zároveň fitness každého z nich je součástí fitness celé skupiny. Takovéto skupiny si pak mohou konkurovat mezi sebou. Alely stojící za eusocialitou a vznikem altruistických vlastností pak mohou zvýhodňovat fitness celé skupiny i přes to, že snižují přímou fitness jedinců, ve kterých jsou exprimované. Tato teorie pak říká, že selekce neúčinkuje jen na úrovni jedince, ale i na úrovni skupiny jako celku. V důsledku toho může vést k zvýšení

frekvencí eusociálních alel ve skupině, které celou skupinu kompetičně zvýhodňují a způsobit tak vznik eusociálních společenství<sup>333,346,357–361</sup>. Zastánci jednoho či druhého proudou přicházejí s důkazy pro podpoření či vyvrácení jedné z teorií, ale prozatím neexistuje obecná shoda na tom, který z těchto proudů má větší vliv na vznik altruismu a eusociality<sup>348,355,357,362</sup>.

V rámci hmyzu dnes známe několik málo eusociálních druhů mezi mšicemi (řád *Hemiptera*, čeleď *Aphididae*)<sup>363,364</sup>, třásněnkami (řád *Thysanoptera*)<sup>365</sup> a u brouka *Austroplatypus incomptus* (řád *Coleoptera*)<sup>366</sup>. Největší pozornosti se ale dostává řádu blanokřídlých (*Hymenoptera*), který zastupuje řada druhů včel a vos (čeledi *Apidae*, *Halictidae* a *Vespidae*)<sup>367–369</sup> a téměř všechny druhy mravenců (čeleď *Formicidae*)<sup>338</sup>. K eusociálním hmyzím druhům dále patří všechny druhy termitů (podřád *Isoptera*, řád *Blattodea*)<sup>370</sup>. Eusociální vlastnosti vedly k obrovské ekologické úspěšnosti daných druhů a dominanci nad solitárními a subsociálními druhy v oblastech jejich výskytu. Např. samotní mravenci a termity tvoří přibližně jen 2 % druhové diverzity hmyzu, přičemž ale zaujímají více než polovinu hmyzí biomasy na světě<sup>333,371</sup>.

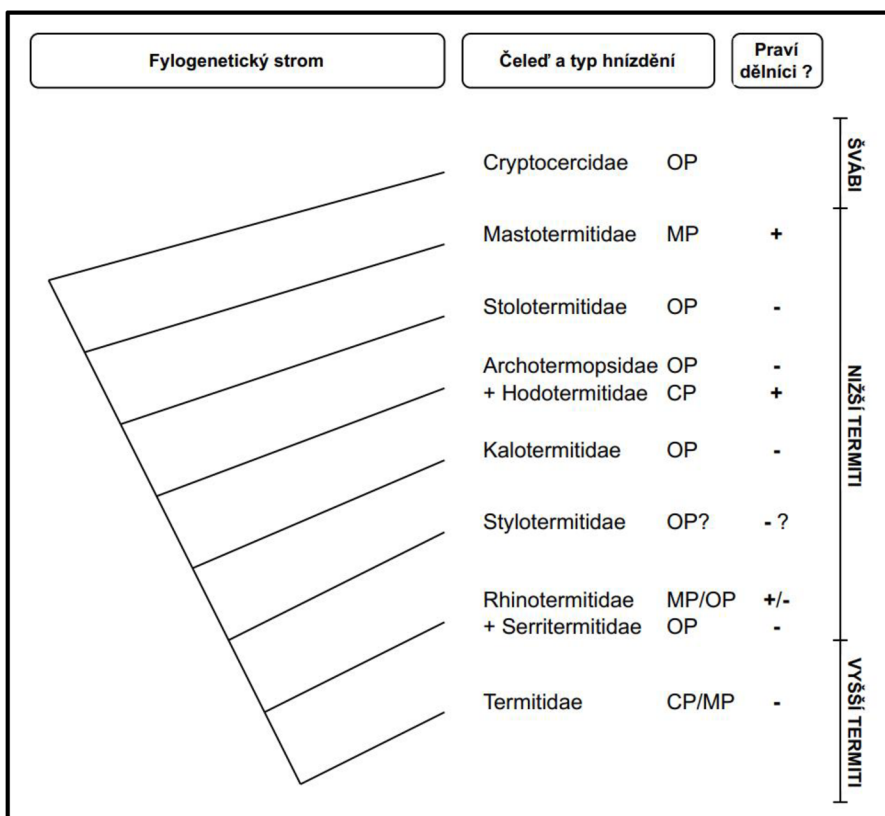
### 1.2.2. Termiti (*Isoptera*)

Infrařád *Isoptera* neboli termiti jsou monofyletickou skupinou spadající do řádu *Blattodea* neboli švábi. Vznikli pravděpodobně 130–150 miliónů let nazpět ve spodní křídě nebo svrchní juře, a to s největší pravděpodobností ze subsociálních švábích předků hnízdících a stravujících se v dřevěném materiálu. Ti byli zřejmě podobní dnešnímu rodu *Cryptocercus*, což jsou dřevní švábi, fylogeneticky určení jako sesterská skupina termitů<sup>372–375</sup>. Termiti jsou tedy eusociálními šváby a pravděpodobně fylogeneticky nejstarší eusociální hmyz. Dnes známe okolo 3000 termitích druhů rozčleněných do 9 současných čeledí (Obr. 2)<sup>372</sup>, z čehož všechny žijí eusociálně. Vykytují se ve všech terestriálních ekosystémech krom Antarktidy a dalších chladných oblastí. Jejich ekologická dominance je patrná především v oblastech tropů<sup>376</sup>. Primárně se termiti stravují dřevem a jinými zdroji celulózy. K jejímu trávení jim napomáhají mutualistické střevní mikroorganismy. Podle jejich složení také bývají děleni na nižší termity, kteří k trávení krom bakterií využívají i protista, a na vyšší termity, jejichž střeva obsahují pouze mutualistické bakterie<sup>377–380</sup>. Do vyšších termitů spadá jen jedna odvozená čeleď *Termitidae*, která ovšem zahrnuje okolo

70 % z druhové diverzity termitů<sup>372</sup>. Protože po vylihnutí termitích larev nejsou tito symbionti v jejich tělech přítomni a po každém svlékání navíc dochází k jejich ztrátě, předávají si je termiti mezi sebou pomocí proktodeální trofalaxe, tedy vzájemným krmením výkaly. To by společně s allogroomingem (vzájemným se čištěním) mohlo být jednou z predispozic termitů ke vzniku eusociality<sup>381–384</sup>.

Termiti jsou hemimetabolní hmyz. Na rozdíl od holometabolních hymenopter jsou tedy jejich larvy předobrazem tělního plánu dospělců, ke kterému se postupně přibližují skrze několik instarů ohraničených svlékáním kutikuly. Larvy se také stávají částečně nezávislé již v brzké fázi vývoje, což u mnoho druhů termitů umožňuje stát se dělníky již během nedospělé fáze života, zatímco v případě blanokřídlých jsou všichni dělníci dospělci<sup>385–387</sup>. Termiti jsou výhradně diploidní organizmy, což je jejich další rozdíl oproti haplodiploidním blanokřídlým. Díky tomu nemají jasné genetické rozdíly mezi samci a samicemi, zatímco u hymenopter jsou samci haploidní a samice diploidní<sup>388</sup>.

Termité také disponují komplexním kastovním systémem, jehož pochopení může komplikovat i poněkud složitá terminologie k popisu kast používaná.



**Obr. 2: Zjednodušený fylogenetický strom s vyznačenými typy hnízdění a přítomností (+) či nepřítomností (-) pravé kasty dělníků.** Uvedena je také sesterská skupina švábů *Cryptocercidae*. OP – termity sídlící v jednom kusu – hnízdo slouží jako úkryt a zároveň jako zdroj potravy. MP – termity sídlící v mnoha kusech – rozšiřují svá hnízda pomocí podzemních chodeb do dalších míst. CP – centrálně hnízdící termity – hnízdo odděleno od zdroje potravy. ? u *Stylotermitidae* značí nejistotu v typu hnízdění a přítomnosti pravých dělníků<sup>389</sup>. Po pravé straně je vyznačeno rozdělení na vyšší nižší termity na základě přítomnosti symbiotických protist ve střevech. Obrázek převzat z Korb a Hartfelder 2008 a upraven podle fylogenetického stromu z Hellemans et al. 2021<sup>340,390</sup>.

#### 1.2.2.1. Kastovní systém termitů, návaznost na styl hnízdění a kastovní determinace

Pro termity je typický vývoj rozdělený do dvou linií (Obr. 3), v kterých se projevuje křídelní dimorfismus<sup>340,372,385,391–394</sup>. V sexuální (někdy nazývané nymfální) linii vzniká z larválních instarů nymfa. Ta také prochází několikero instary, během nichž se postupně vyvíjí křídelní pupence a po posledním svlékání vzniká okřídlený dospělec, takzvaný alát. Aláti opouštějí hnízdo při snubních letech, páří se, shazují křídla (dealáti) a s partnery zakládají nové kolonie, v nichž vystupují jako primární reproduktivci. Druhá vývojová linie se pak nazývá apterická, protože v ní nedochází ke vzniku křídel, a která je rozdělena na jedince

reproduktivní (tzv. neoteniky) a nereproduktivní (vojáci a dělníci). Neotenici na rozdíl od alátů nemají graduální vývoj přes nymfální instary, ale mohou vzniknout z jakéhokoliv stádia (krom stádia vojáků), a to po 3. larválním instaru během jednoho svlékání, v jehož průběhu se jim vyvíjejí gonády. V porovnání s aláty jsou neotenici bez křídel, kutikula je méně sklerotizovaná a většinou nemají složené oči. Mohou nahrazovat chybějící primární reprodukce nebo sloužit jako pomocní reprodukci k těm stávajícím. Primárně tedy neopouštějí hnízdo (výjimky jsou uvedeny dále v textu). U vyšších termitů se podle původu označují buď jako nymfoidi (vyvíjejí se z nějakého nymfálního instaru) nebo jako ergatoidi (vyvíjejí se z dělníků). V apterické linii pak vznikají dvě nereprodukční kasty, a to vojáci a dělníci. Přítomnost vojáků je pro termity monofyletická, vojáci se totiž vyskytují ve všech druzích termitů, a to až na výjimky, kde byli zřejmě sekundárně ztraceni. Z larev se vyvíjejí během dvou svlékání s mezistupněm takzvaného bílého vojáka (pre-soldier). Vždy jsou sterilní a v mnoha termitích druzích jsou tak jedinou čistě altruistickou kastou. Zajišťují obranu hnízda před vnitro- i vně-druhovými kompetitory či predátory. K tomu jsou morfologicky vybaveni obrovskými mandibulami nebo obranými žlázami. Zvětšené čelisti jim v mnoha případech zabraňují samostatně se nakrmit, a tak jsou odkázáni na pomoc ostatních členů kolonie.

Tento rozvětvený vývoj se ale mezi termitími čeleděmi liší ve své plasticitě, protože k determinaci, zda se jedinec bude vyvíjet apterickou nebo sexuální cestou, dochází v odlišných fázích vývoje (Obr. 3) <sup>385,395</sup>. To se pak odráží především v přítomnosti pravé kasty dělníků. Čeledi *Stolotermitidae*, *Archotermopsidae*, *Kalotermitidae*, pravděpodobně *Stylotermitidae*, někteří *Rhinotermitidae* (rody *Prorhinotermes* a *Termitogeton*) a *Serritermitidae* nemají brzce udaný vývoj a většina členů jejich kolonií jsou takzvaní falešní dělníci (Obr. 3A) <sup>359,389,391,392,396–398</sup>. Falešní dělníci jsou nazýváni proto, že nejsou finálním vývojovým stádiem jako praví dělníci ostatních čeledí, ale jsou skupinou velkých nedospělců, složenou z vícero pozdních larválních instarů. Zachovávají si totipotenci a na základě enviromentálních podnětů (vizte níže) se z nich mohou vyvíjet jak sterilní vojáci, tak reprodukční neotenici a skrze nymfální stádia i disperze schopní alátů. Plasticita je také podpořena možností regresivního svlékání z nymfálních instarů zpět do larválních. Takoví jedinci se pak nazývají pseudergati <sup>399</sup>. Zajímavé je, že zmíněné termití čeledě mají krom falešných dělníků i společný způsob života. Řadí se totiž do skupiny v jednom kusu hnízdících termitů (one-piece nesting - OP) <sup>340,400</sup>. Tyto druhy si vytvářejí méně početnější hnízda (stovky až tisíce jedinců) uvnitř jednoho kusu dřeva, které jim zároveň slouží jako

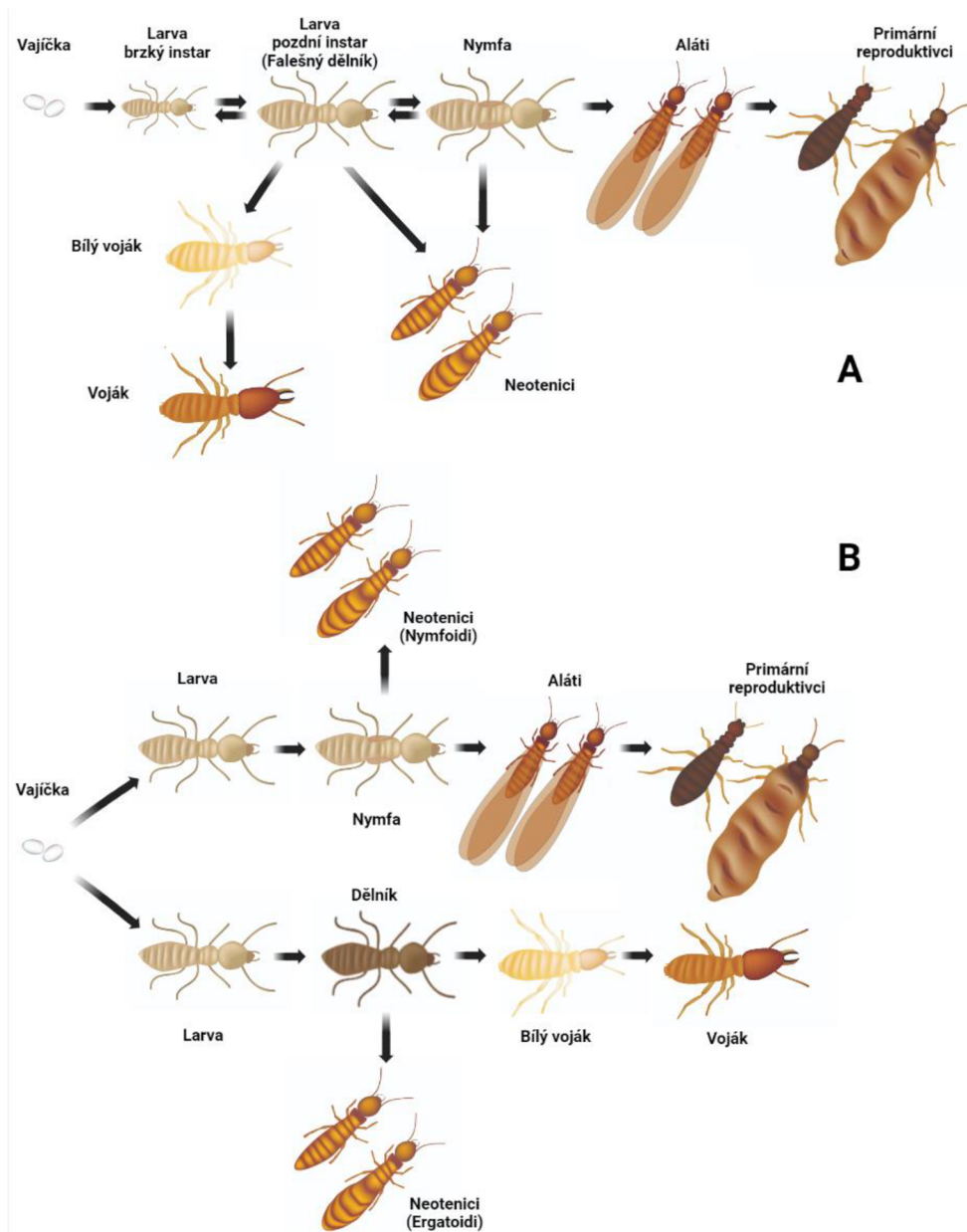
zdroj potravy. Krom alátů neopouštějí členové kolonie hnízdo a existence kolonie je závislá na bohatosti osídleného zdroje. Při jeho vyčerpání kolonie zaniká. Tomu ale předchází náhlé navýšení počtu alátů a jejich disperze<sup>401,402</sup>. Ovšem jsou zde výjimky, kdy například u některých druhů *Prorhinotermes* dochází při snižujícím se množství zásob k vyhledávání nových zdrojů v okolí a přesunu části kolonie společně s neoteniky (takzvanému pučení kolonií) do nového hnízda<sup>403</sup>. Plasticita kolonie, zajištěná přítomností falešných dělníků, tak zajišťuje rychlou odpověď kolonií na nepříznivé změny prostředí<sup>404,405</sup>. Zároveň to ale znamená, že falešní dělníci nejsou plně altruistická kasta, protože si zachovávají svůj reprodukční potenciál. Mají vysoké přímé fitness v důsledku možnosti zdědit již zavedené hnízdo nahrazením primárních reproductivců jako neotenici. Do té doby zbytečně neriskují opouštěním hnízda a jen v případě hrozby jeho zániku se šíří ve formě alátů nebo jako neotenici pučením kolonie. Takovéto chování může mít původ v opožděné disperzi ancestrálních subsociálních druhů, žijících podobným způsobem jako tito dřevo osídlující termity<sup>406,407</sup>.

V rámci čeledí *Mastotermitidae*, *Hodotermitidae*, většiny *Rhinotermitidae* (krom rodu *Prorhinotermes* a *Termitogeton*) a *Termitidae* pak již mluvíme o pravých dělnících (Obr. 3B)<sup>340,391,392</sup>. Determinace vývojové linie je totiž zajištěna již ve vajíčku nebo velmi brzo během larválního vývoje. Larvy tedy už mají dopředu definováno, zda budou procházet nymfálním vývojem na aláty, nebo apterickým vývojem na dělníky a vojáky. Už zde nedochází k přepnutí vývoje z „dělníka“ na nymfu a naopak. Avšak většina těchto druhů si, až na výjimky, zachovává možnost tvorby neoteniků, buďto z nymf anebo z pravých dělníků. Zmíněné čeledi opět krom typu dělníků sdílejí podobnost ve stylu života. *Mastotermitidae*, většina *Rhinotermitidae* a někteří *Termitidae* patří mezi takzvané v moha kusech hnízdící termity (multiple-piece nesting - MP)<sup>340,400</sup>. Ti pomocí podzemních chodeb rozšiřují svoje hnízda do dalších míst a existence kolonie tak není závislá na jednom omezeném zdroji. *Hodotermitidae* a většina *Termitidae* jsou pak skupinou centrálně hnízdících termitů (central-piece nesting - CP)<sup>340,400</sup>. Ti zase vytvářejí složitá hnízda, často ve formě hliněných nadzemních částí, která jsou oddělena od zdrojů potravy. Dělníci obou skupin vykazují členitější dělbu práce, starají se o plod a reproductivce, podílejí se na stavbě hnízda, nebo vyhledávají potravu mimo hnízdo. Správný chod celé kolonie je tak na jejich činnosti více závislý, než je v případě OP. Zvýšené riziko úmrtí při aktivitách mimo hnízdo a vyšší pomocné chování vůči ostatním členům kolonie, společně s faktem, že praví dělníci, oproti těm falešným, mají daleko menší reprodukční potenciál a v některých případech jsou

zcela sterilní, znamená, že těží daleko více z nepřímé fitness oproti té přímé a jsou další opravdu altruistickou kastou vedle vojáků<sup>384,408,409</sup>. Jejich přítomnost je tedy znakem komplexnější eusociality těchto čeledí, přibližující je do fáze jakéhosi superorganismu<sup>410</sup>.

Co má ale vliv na kastovní determinaci termitů a jejich reprodukční dělbu práce? Zdá se, že největší dopad mají interakce jedinců a celých kolonií s prostředím. Poměrné zastoupení kast je u termitů ovlivněno sezonou a změnami v teplotách<sup>411–414</sup>. Také, již zmíněná dostupnost a kvalita potravy nebo zdraví kolonie mají vliv na kastovní diferenciaci, například na vyšší produkci alátů nebo diferenciaci vojáků<sup>401,402,414,415</sup>. Obrovský vliv mají ale i sociální interakce uvnitř kolonie. Přítomnost reprodukčních jedinců má pozitivní vliv na vojáky a naopak negativní vliv na neoteniky<sup>416–419</sup>. Celková velikost kolonie pak pozitivně ovlivňuje jak počet vojáků, tak alátů<sup>402,417,420–424</sup>. Množství vojáků negativně ovlivňuje vývoj dalších vojáků<sup>416,425</sup>. Sprostředkovatelem těchto sociálních interakcí je zřejmě chemická komunikace, v čele s feromony, informující jedince o stavu celého společenstva<sup>426–429</sup>. U termitů konkrétně má velký vliv i proktodeální trofolaxe, během které jsou pravděpodobně předávány různé stimulanty či inhibitory s vlivem na kastovní diferenciaci<sup>417,430</sup>. Například vojáci jsou přednostně krmeni primárními reproductivci<sup>431</sup>. Největší donoři trofolaxe se velmi často stávají nymfami a naopak<sup>402,417</sup>.

Enviromentální kastovní determinace je zřejmá v případě čeledí s plastickým vývojem. Naopak u čeledí, kde je kastovní determinace, zvláště, co se možnosti reprodukce týče, určena již v brzké fázi vývoje, existuje předpoklad, že prostředí není jediným účastnícím se mechanismem. Hlavně výzkumy na družích z rodu *Reticulitermes* (*Rhinotermitidae*) nasvědčují přítomnosti genetické kastovní determinace, či vlivu epigenetiky a parentálního imprintingu<sup>432–437</sup>.



**Obr. 3: Rozvětvený vývoj termítů a odlišnosti v jeho plasticitě:** A. Více plastický vývoj s pozdní determinací kasty jedince, typický pro v jednom kusu hnízdicí termity. Funkci dělníků zastupují pozdní instary larev (falešní dělníci), které si zachovávají možnost jak nymfálního vývoje na okřídlené reproduktivce, tak apterického vývoje na vojáky nebo neotenické reproduktivce. Navíc může docházet k regresivním svlékáním ze stádia nymfy do stádia larvy nebo z pozdějšího instaru larvy na dřívější (vyznačeno dvojitými šipkami). B. Méně plastický vývoj s determinací kasty jedince již ve stádiu vajíčka, typický pro v mnoha kusech hnízdicí termity a centrálně hnízdicí termity. Larvy již mají předem určeno linii vývoje, kterou nemůžou opustit, a to buďto nymfální nebo apterickou. Nedochozí zde k regresivním svlékáním z nymfy na larvu. Stále mohou vznikat neoteničtí reproduktivci jak z nymf (nymfoidi) tak z dělníků (ergatoidi). Zdroj termitích ilustrací shutterstock.com.



Důležitým molekulárním mechanismem regulujícím kastovní diferenciaci je endokrinní kontrola. Juvenilní hormon (JH) spolu s ekdyzonem jsou klíčovými hormonálními faktory, které u holo – i hemimetabolního hmyzu řídí svlékání larválních i nymfálních stádií a metamorfózu<sup>438–441</sup>. Ovšem eusociální hmyz převzal roli signalizace JH i do řízení kastovní diferenciaci. Hladiny a produkce JH vykazují typické vzorce během vývoje a života jednotlivých termitích kast<sup>424,442–446</sup>. Titry JH hormonu odpovídají na výše zmíněné enviromentální vlivy, jako je teplota, strava a sociální složení kolonie<sup>413,414,424,444,447,448</sup>. Zdá se, že mezi jedinci je při interakcích a trofalaxi předáván i samotný JH nebo jeho inhibitory<sup>431,444</sup>. Kastově typické změny JH jsou doprovázeny změnami v mechanismech, se kterými JH interaguje, a to i zpětnovazebně. Těmi jsou například aktivita corpora allata<sup>424</sup>, exprese a hladiny vitellogeninů<sup>442,444,449–451</sup>, cytochromů P450<sup>450,452–455</sup>, allostatinů<sup>456</sup>, JH vazebných proteinů<sup>457,458</sup>, hexamerinů<sup>459–463</sup>, nebo aktivita IIS/TOR signálních drah<sup>451</sup>. K tomu navíc některé z těchto na JH navázaných mechanismů, jako jsou allostatiny a IIS/TOR dráhy, samy osobně interagují s vlivy vnějšího prostředí (konkrétně v jejich případě s potravou – vizte více)<sup>464,465</sup>. Vliv zmíněných mechanismů na dělbou práce a kastovní diferenciaci je dobře popsán i u včel a mravenců<sup>466–472</sup>.

### 1.3. Stárnutí u sociálního hmyzu

Mezi reprodukčními a nereprodukčními kastami eusociálního hmyzu existují obrovské rozdíly v délce života. Královny (a u termitů králové) se dožívají i 20 let a více, zatímco dělníci či vojáci umírají obvykle v řádu týdnů. A to i přes to, že všichni členové kolonie mají stejné genetické pozadí<sup>473–477</sup>. Krom toho je pro většinu života reproductivců typická i obrovská plodnost, která vzhledem k jejich dlouhověkosti odporuje již zmiňovanému fenoménu cost of reproduction. Zdá se tedy, že u eusociálních druhů nedochází ke kompromisu mezi dlouhověkostí a fertilitou, alespoň tedy v tom smyslu, v jakém je přítomen u solitérních druhů<sup>475,478–480</sup>. Většina studií dlouhověkosti je paradoxně prováděna na krátkověkých rychle se množících modelových organismech jako *Drosophila melanogaster* a myš domácí (*Mus musculus*)<sup>481–484</sup>. Eusociální živočichové se ale díky výše zmíněným vlastnostem zdají být vhodnějšími kandidáty pro tyto výzkumy.

Fylogenetické studie potvrzují, že je socialita přímo svázána se vznikem dlouhověkosti. Eusociální hmyz totiž vykazuje až 100násobný nárůst v délce života oproti solitérně žijícím

druhům, a to i k druhům blízké příbuzným, které znázorňují přechod ze solitérnosti k socialitě<sup>475,485</sup>. Hlavním důvodem tohoto nárůstu se z evolučního pohledu jeví být změny ve vnější mortalitě. Jak již bylo řečeno dříve v rámci evolučních teorií stárnutí, vysoká vnější mortalita, působící již od brzké fáze reprodukčního života, způsobuje vznik krátkověkosti<sup>306,311,486</sup>. Primární reproductivci eusociálních druhů jsou ovšem obrovskému riziku úmrtí vystaveni jen v počátku jejich dospělého života, během disperze a následného zakládání nových kolonií. To se ale odehrává ještě před zahájením jejich reprodukce. Další reprodukční jedince navíc produkují až v pozdější době, kdy je překonána křehká fáze začínající kolonie. Přírodní výběr tak na ně působí teprve v době, kdy využívají benefitů hnízda, ve formě ochrany před predací, kolektivní imunity vůči patogenům a parazitům, stabilního prostředí a péče od nereprodukčních kast, které u nich snižují vliv vnější mortality na minimum. Rizika spojená hlavně s obranou hnízda a činnostmi vykonávanými mimo jeho bezpečí na sebe naopak přebírají dělníci a vojáci, tedy kasty v porovnání s reprodukčními krátkověké<sup>338,474,475,485,487–489</sup>. Důkazem pro to může být rozdíl v délce života malých a velkých dělníků některých druhů mravenců. Velcí dělníci se v rámci dělby práce vystavují vyšším rizikům vnější mortality oproti malým dělníkům a odráží se to i v jejich kratší průměrné délce života. Ta je zachována i v případě laboratorních chovů zbavených vnější mortality<sup>490</sup>. Podobný případ je i u mravenčích druhů, kde se reprodukční kasty příliš neliší v morfologii a velikosti těla od té nereprodukční (často partenogeneticky množící se druhy). Opět, vyšší riziko vnější mortality je u nereprodukčních jedinců spojené s kratší délkou života v porovnání s reprodukcí se jedinci, a to i v laboratorních podmínkách<sup>491,492</sup>. Tyto poznatky korelují s teorií postradatelného soma, kdy důsledkem vysoké vnější mortality jsou nižší investice do údržby těla. Zároveň ukazují, že vnější mortalita má na délku života větší vliv než velikost těla, reprodukce a genotyp<sup>305,311</sup>.

Vliv by ale mohla mít také již zmiňovaná příbuzenská selekce a nepřímá fitness. Pro nereprodukční kasty se stává vzhledem k prostředí výhodnější investovat své zdroje do reprodukčního úspěchu svých příbuzných, v tomhle případě královen a králů<sup>352,353,355,370,493</sup>. Je tedy pro obě skupiny důležité, aby si reproductivci udrželi vysokou plodnost po dlouhou dobu. Důsledky můžeme pozorovat v případě poklesu fertility královen, kdy jsou tyto královny často nereprodukčními kastami zabíjeny a nahrazovány mladými, protože snižují nepřímé fitness zbytku kolonie<sup>493,494</sup>. Narůstající podíl nepřímé fitness u nereprodukčních kast pak doprovází i navyšující se komplexitu sociality kolonií – tedy jejich velikost a související nárůst v sofistikovanosti dělby práce a tedy i specializaci členů kolonie<sup>489,495,496</sup>.

Analýza desítek hmyzích druhů s rozdílnou mírou sociality pak ukázala, že se zvyšující se velikostí kolonie narůstá i rozdíl v délce života mezi nereprodukčními a reprodukčními kastami a to i mezi blízce příbuznými druhy <sup>495</sup>. Příkladem můžou být některé druhy mravenců a termitů, tvořící malé kolonie z několika stovek totipotentních dělníků. Ti mají stále možnost stát se reprodukčními jedinci a zachovávají si tedy vysokou přímou fitness. Současně v menší míře vykonávají práce mimo bezpečí hnízda, a tak se vyhýbají vnější mortalitě <sup>384,489</sup>. Obojí může mít důsledek v jejich, možná překvapivé, délce dožití až několika let <sup>497</sup>. Naopak dělníci eusociálních druhů, s koloniemi čítají i několik miliónů jedinců, mají zpravidla velmi omezený reprodukční potenciál, či bývají zcela sterilní. Jejich společenstva vyžadují sofistikovanější dělbu práce a dělníci často vykonávají rizikové práce mimo hnízdo. Spoléhají tedy čistě na nepřímou fitness a podléhají vnější mortalitě <sup>384,489</sup>). To se odráží v krátké délce života, většinou několika týdnů <sup>498</sup>. Dá se říci, že s narůstající komplexitou se kolonie stává superorganismem, kde ve shodě s teorií postradatelného soma nereprodukční kasty přebírají funkci nahraditelných buněk somatické linie a reprodukční kasty roli zárodečné linie. Kvůli efektivitě celého celku je pak výhodné investovat méně omezených zdrojů do mechanismů udržujících funkčnost organismu nereprodukčního jedince, oproti těm reprodukčním <sup>410,496</sup>.

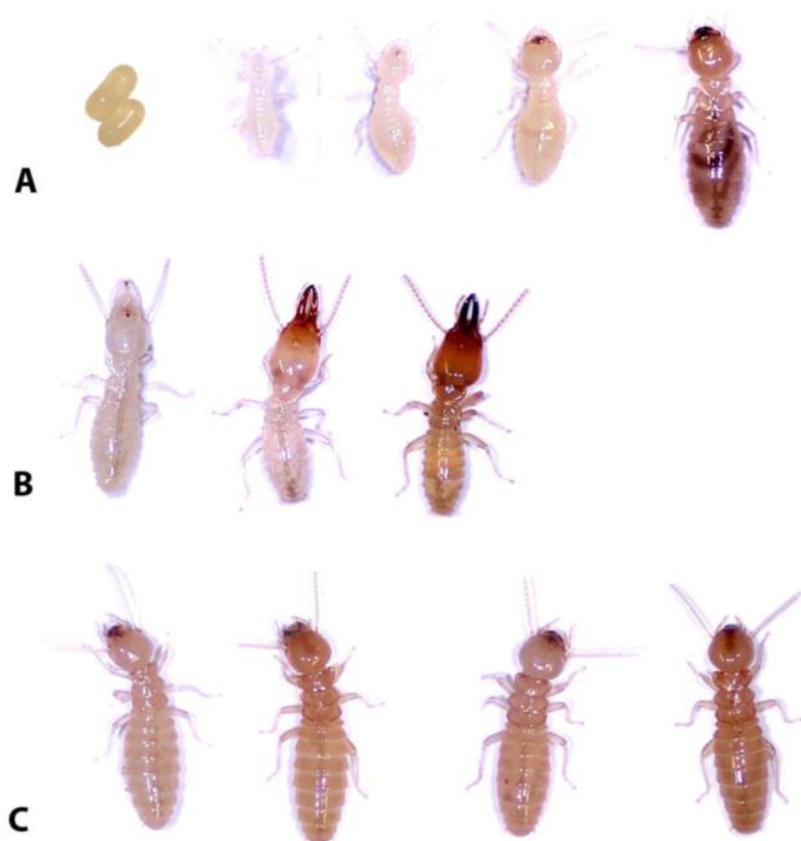
Zkoumány jsou samozřejmě i mechanistické důvody stárnutí. Stejně jako je známo u soliterních organismů, tak i u eusociálního hmyzu je senescence urychlována oxidativním stresem <sup>499–501</sup>. Studie na eusociálních druzích se pak zaměřují na hledání rozdílů v expresi či aktivitě antioxidantních enzymů a v míře karboxylace proteinů mezi reprodukčními a nereprodukčními kastami v průběhu jejich stárnutí. Z jejich výsledků lze usoudit, že mezi jednotlivými druhy neexistuje jednotný vzorec těchto změn, kromě snad SOD1, která se více exprimuje u dělníků, a peroxiredoxinu 3 (Prx3), který se více exprimuje u starých jedinců <sup>479,500,502–508</sup>. Tyto rozdíly ale mohou být i tkáňově specifické. Ačkoliv exprese antioxidantů v somatických tkáních královen včely medonosné (*Apis mellifera*) s věkem oproti dělnicím obecně klesají, v okolí a uvnitř spermatéky jsou navýšené a v tukové tkáni a trofocytech s věkem narůstají zřejmě v odpovědi na narůstající hladinu ROS <sup>509–511</sup>. U královen je také pozorován nárůst v podílu peroxidaci odolných mononenasyčených mastných kyselin v membránách <sup>477</sup>. Z termitího pohledu na věc můžeme zmínit poznatky hlavně okolo dvou zástupců. U dělníků *Cryptotermes secundus* (*Kalotermitidae* OP) dochází oproti královnám k menšímu nárůstu karboxylace proteinů a zvýšení exprese antioxidantů jako je kataláza (Cat) a SOD1, které naopak u královen klesají. Avšak královny mají

zvednuté exprese 2 glutathion-S-transferáz<sup>502,506</sup>. Při stresových podmínkách byla u dělníků navíc pozorována silnější antioxidační odpověď<sup>512</sup>. U obou kast se projevuje s věkem spojený nárůst v aktivitě imunity, což u královen může mít negativní následky ve spojení s nižší obranou proti oxidačnímu stresu<sup>506</sup>. Staré královny *Reticulitermes speratus* (Rhinotermitidae M+P) vykazují oproti dělníkům velmi vysoké exprese Cat a Prx. Expresy SOD (víceero typů) jsou mezi kastami stejné, ale aktivita je vyšší u reproduktivců. Královny mají také méně oxidativně poškozené proteiny, lipidy i DNA<sup>513,514</sup>. Z porovnání těchto dvou druhů by se tedy dalo usoudit, že totipotentní dělníci v porovnání s reprodukčními kastami investují více do obrany proti oxidačnímu stresu. Důvod by mohl být opět jejich možnost stát se reproduktivci a tedy potřeba udržovat své soma.

Další výzkumy se u eusociálního hmyzu zabíraly rolí genů starajících se o stabilitu genomu a opravu DNA. U královen mravence *Lasius niger* dochází během stárnutí k vyššímu nárůstu genů spojených s DNA opravami, než je tomu u dělníků<sup>515</sup>. U dlouhověkých králů termita *R. speratus* byla zaznamenána vysoká exprese genu BRCA1 v tukové tkáni<sup>516</sup>. Jeho produkt má roli v opravě DNA, syntéze microRNA, signalizaci antioxidantů a homologní rekombinaci<sup>517–519</sup>. Krom BRCA1 je v reprodukčních tkáních králů zvýšená i exprese dalších DNA reparačních genů<sup>516</sup>. Reproductivci *C. secundus* ukazují s věkem spojený pokles v expresi proteinů důležitých pro opravu DNA a stabilitu genomu. V případě dělníků k tomuto poklesu také dochází, zdá se, že však mírněji<sup>506</sup>. Navíc mají ve stáří vysoké hladiny transkriptů několikerého serin/threonin kináz ATR, které se účastní koordinace oprav DNA, buněčného cyklu a zajištění stability telomer<sup>520–522</sup>. Královny a králové se k tomu ve vyšším věku potýkají s nárůstem aktivity transpozibilních elementů a poklesem exprese genů tuto aktivitu potlačujících, s rolí v piwi RNA syntéze a RNA interferenci. U dělníků je tomu naopak<sup>506,523</sup>. Naopak *Macrotermes bellicosus* (Termitidae CP) má tyto trendy v aktivitě a supresi transpozibilních elementů mezi reprodukčními a nereprodukčními kastami zcela opačné<sup>498</sup>. To vše opět nasvědčuje trendu zmíněného u oxidačního stresu, tedy, že falešní dělníci OP termitích druhů kvůli zachovalému reprodukčnímu potenciálu investují více do údržby svého těla.

V souvislosti s kompromisem mezi reprodukcí a dlouhověkostí jsou u eusociálního hmyzu asi nejvíce zkoumány JH signalizace a vitellogeniny (Vg). JH krom již zmiňované role v metamorfóze a kastovní diferenciaci má i vliv na reprodukci, hlavně skrze zvyšování produkce žlutkových proteinů a prekurzorů vaječného žloutku Vg<sup>524–528</sup>. Ovšem u modelových organismů je znám i jeho negativní pleiotropní efekt na dlouhověkost,

rezistenci vůči stresu a imunitu<sup>167,524,529,530</sup>. K tomu je jeho exprese podporována skrze na živiny citlivou IIS/TOR signalizaci, která, jak již bylo řečeno, má také na dlouhověkost škodlivý vliv<sup>39,524,529,531,532</sup>. Zmíněné komponenty tak dohromady, zdá se, tvoří jakousi centrální síť ovládající, společně s na ní navázanými efektory, kompromis mezi dlouhověkostí a plodností u hmyzu<sup>523,526,533</sup>. To by odpovídalo i známému faktu, že hladiny JH a aktivita IIS stoupají u stárnoucích dělnic včely medonosné a jsou spojeny s jejich přechodem z mladušek na létavky vykonávající práci mimo úl. Zároveň se udržují velmi nízké během života včelí královn. Naopak hladiny Vg se, jak u dělnic, tak u královen, vyskytují v opačném trendu oproti JH, tedy s největší expresí u královen<sup>533–535</sup>. Navíc se podle výzkumů také provedených na včelách zdá, že má Vg antioxidační účinky a pozitivní vliv na imunitu a množství hemocytů v hemolymfě<sup>499,536</sup>. Díky těmto vlastnostem by tak mohl mít i podporující vliv na dlouhověkost, přičemž odtržení jeho exprese od pro zdravé stáří škodlivého vlivu JH se pak jeví jako adaptace včely medonosné a některých mravenců<sup>526,533,537</sup>. Nicméně u termitů a snad i u mnoha mravenců je exprese Vg stále vázaná na JH<sup>442,528,538</sup>. Existuje ale předpoklad, že TOR/IIS-JH síť i u nich musí být nějak pozměněna, tak, aby vysvětlovala absenci „cost of reproduction“<sup>526</sup>. Ovšem Lin et al. 2021 pomocí transkripčních analýz charakterizovali tyto dráhy pro královn termita *C. secundus* a jejich výsledky zmíněný předpoklad nijak nepodpořily<sup>451</sup>. Korb et al. 2021 pak provedli komparativní transkriptomickou analýzu mezi mladými a starými jedinci jak dělníků, tak královen či králů u šesti eusociálních druhů z řad termitů, včel a mravenců. Přičemž se opět zaměřovali na TOR/IIS-JH síť a její vliv na kompromis reprodukce/dlouhověkost<sup>523</sup>. Její vliv na tento kompromis potvrdili. Ukázalo se, že paradoxně ke změnám v expresích dochází relativně málo mezi horními komponenty těchto drah (geny IIS a TOR signalizací) a že mezi nejvíce diferenciólně exprimované transkripty patří její dolní komponenty (JH signalizace) a cílové geny (jako například Vg a yellow proteiny). Silný signál projevíly i některé geny spojené se somatickou údržbou, zapojené zvláště do imunity, obrany proti oxidativnímu stresu a detoxifikace. U řady těchto genů je pak známo, že jsou transkripčními cíli právě TOR/ISS a JH signalizace.



**Obr. 4: Termít *Prorhinotermes Simplex* a jeho vývojová stádia.** (Popsáno zleva doprava) **A.** Vajíčka, larvální stádia 1-3 a falešný dělník. **B.** Bílý voják (pre-soldier), voják první den po svlékání a zralý voják s viditelnou sklerotizací a pigmentací kutikuly. **C.** Mladí neotenici (samice a samec) přibližně týden po svleku a zralí neotenici (samice a samec) s výraznější pigmentací kutikuly. Obrázek převzat z Jehlík 2017 <sup>539</sup>.

#### 1.4. *Prorhinotermes simplex* (Rhinotermitidae: Prorhinotermitinae)

Rod *Prorhinotermes* obsahuje 20 známých druhů <sup>540</sup>. Ty mají především ostrovní rozšíření v indo-pacifické oblasti a Karibském moři. V rámci pevniny se vyskytují na pobřeží Floridy, Kostariky a severní Austrálie. *Prorhinotermes simplex* konkrétně osidluje pobřeží jihovýchodní Floridy, severní Kubu, Jamajku a Puerto Rico <sup>540,541</sup>. Vytváří si malé kolonie o velikosti několika málo tisíc jedinců v naplavených a vlhkých kusech dřeva, jejichž velikostí a kvalitou je život kolonie limitován. Oproti ostatním OP termitům je u rodu *Prorhinotermes* zdokumentováno vyhledávání nových kusů dřeva vojáky v okolí hnízda, do kterých se při nedostatku zdrojů v hnízdě přesunou neotenici s částí dělníků <sup>403</sup>. Stejně jako ostatní OP termiti mají plastický vývoj a kastovní diferenciaci za přítomnosti

totipotentních falešných dělníků (Obr. 3a, 4) <sup>541–543</sup>. Dělníci a vojáci se dožívají zhruba 4 roky. Primární reproduktivci se dožívají přibližně 10 až 12 let, ale je zaznamenáno i stáří 19 let. Neoteničtí reproduktivci se po své diferenciaci z dělníků dožívají nejméně dalších 5 let <sup>544</sup>.

## 2. Cíl práce

Cílem práce je analyzovat diferenciální genovou expresi u termita druhu *Prorhinotermes simplex*, a to za využití termitích jedinců zastupujících nereprodukční krátkověké a reprodukční dlouhověké kasty a jedinců odlišného stáří. Účelem analýzy je identifikace genů a skupin genů podobných vlastností, jejichž funkce by mohla vysvětlovat rozdíly v očekávané délce života mezi těmito kastami.

## 3. Metody

### 3.1. Odběry vzorků kast termitů

Vzorky byly získány z laboratorních kolonií termita *Prorhinotermes simplex* na fakultě lesnické a dřevařské České zemědělské univerzity v Praze. Pro sekvenaci bylo použito celkem 10 „falešných“ dělníků (D) blíže neurčeného stáří, 10 neotenických králů starších jednoho roku (SK) a 7 nově indukovaných neotenických králů starých maximálně 1 týden (MK). Z důvodu vyhnutí se kontaminaci střevními symbionty byla provedena pitva vzorků, při které došlo k odstranění střevní trubice. Veškerý zbytek tkání byl zamražen v tekutém dusíku a uchováván při teplotě -80 °C do dalšího zpracování.

### 3.2. Izolace celkové RNA

RNA byla izolovaná z jednotlivých zmražených vzorků pomocí kitu Nucleospin® RNA (Machery-Nagel) a k němu přiloženému protokolu pro izolaci ze zvířecích tkání. Na konci postupu byla pro každý vzorek získána RNA rozpuštěná v 40 µl RNase-free H<sub>2</sub>O (Machery-Nagel). Její koncentrace a kvalita byla ověřena pomocí spektrofotometru (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer). Do dalšího zpracování byla RNA uchovávána při -80 °C. Vzorky celkové RNA byly na suchém ledu odeslány do Centrální laboratoře Genomika ve Středoevropském technologickém institutu (CEITEC) (Brno, Česká republika) pro jejich sekvenaci.

### 3.3. Příprava RNA-seq knihovny a její sekvenace (pro tvorbu referenčního transkriptomu)

Z RNA vzorků byla odstraněna ribosomální RNA pomocí kitu RiboCop rRNA Depletion Kit V1.2 (Lexogen). Transkriptomické knihovny byly připravené za použití kitu NEBNext® Ultra™ II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina® (NEB) a jejich kvalita byla zanalyzována použitím kitu Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen) a přístroje Agilent High Sensitivity D1000 ScreenTape System (Agilent Technologies). Multiplexované knihovny byly sekvenované na přístroji Illumina® NextSeq™ 500 Sequencing System za použití kitu NextSeq™ 500/550 High Output v2 kit (Illumina) (pair-end ready, délka 151 párů bází).

### 3.4. De-novo sestavení a anotace referenčního transkriptomu

Výstupní soubory sekvenace byly demultiplexovány a překonvertovány z Bcl formátu na Fastq formát pomocí nástroje bcl2fastq Conversion Software (v2.20.0.422, Illumina) pro vyvolávání bází. Kvalita hrubých readů byla zkontrolována skrze nástroj FastQC (v0.11.8) <sup>545</sup>. V rámci předzpracování byly ready podrobeny trimmingu (odstranění adaptérů a kvalitativní ořez) pomocí nástroje Trimmomatic (v0.36) <sup>546</sup> a korekci sekvenačních chyb nástrojem Rcorrector (v1.0.4) <sup>547</sup>. K sestavení transkriptomu došlo



za využití nástroje Trinity (v2.8.5) a to ve dvou bězích s různými délkami K-merů (21 a 25), kvůli optimalizaci výsledků, tak jak je doporučeno autory Trinity <sup>548</sup>. Dílčí sestavené transkripty byly spojeny a klastrovány na základě podobností mezi nukleotidy a aminokyselinami pomocí nástroje EvidentialGene toolset (v2017.12.21) <sup>549</sup>. Kvalita získaného setu transkriptů byla stanovena pomocí mapování hrubých readů na transkripty skrze nástroj Bowtie (v1.3.0) <sup>550</sup> a také jejich srovnáním se specifickými databázemi evolučně konzervovaných ortologních genů použitím nástroje BUSCO (v3.0.2) <sup>551</sup>. Použité byly databáze pro třídu hmyz (*Insecta*), kmen členovci (*Arthropoda*) a říši živočichové (*Metazoa*) (verze odb9). Anotace transkriptomu byla provedena pomocí nástrojů Transcoder v5.5.0 <sup>552</sup> a Tritonate v3.2.1 <sup>553</sup> a to na základě nejlepších výsledků hledání podobných sekvencí (hranice pro hodnotu  $E \leq 0,05$ ) v databázi UniProt (Swiss-Prot, verze 2019\_07) <sup>554</sup> pomocí programu Blast (v2.9.0) <sup>555</sup> a v databázi proteinových rodin Pfam (verze 33.1) <sup>556</sup> pomocí programu HMMER (v3.2.1) <sup>557</sup>. Pomocí nástroje Transcoder byly také identifikovány pravděpodobně kódující sekvence na základě délky jejich otevřeného čtecího rámce (ORF). Nakonec byla kvantifikována abundance výsledných transkriptů skrze nástroj Salmon (v0.13.1) <sup>558</sup>. Všechny výsledky a statistiky byly zpracovány skrze nástroj MultiQC do jednoho kompaktního HTML reportu <sup>559</sup>.

### 3.5. Příprava Quant-seq knihoven a jejich sekvenace (pro analýzu diferenciální exprese)

500ng celkové RNA z každého vzorku posloužilo jako vstup pro přípravu sekvenačních knihovny za použití kitu QuantSeq FWD 3'mRNA Library Prep Kit (Lexogen), který pro knihovnu selektuje sekvence obsahující polyadenylované 3' konce. Ve zkratce byla RNA přepsaná do cDNA pomocí oligodT primeru (FS1). Kvůli minimalizaci tvorby necílených produktů byl použit poloviční objem primeru oproti instrukcím poskytovaných výrobcem. Po syntéze prvního cDNA vlákna a odstranění RNA následovala syntéza druhého vlákna za využití UMI Second Strand Synthesis Mix (UUS), který obsahuje unikátní molekulární identifikátory (UMI). Ty v následných analýzách umožňují detekci a odstranění PCR duplikátů. Nakonec byly sekvenační knihovny vytvořené pomocí PCR a kitu i5 6 nt Unique Dual Indexing Add-on Kit (Lexogen). Kvalita a kvantita knihoven byla determinována skrze přístroj Fragment Analyser a kit DNF-474 High Sensitivity NGD Fragment Analysis Kit (Agilent Technologies) a kit QuantiFluor® dsDNA systém

(Promega). Nakonec byly knihovny sekvenovány na přístroji Illumina® NextSeq™ 500 Sequencing System (single-end ready, 75 párů bází dlouhé).

### 3.6. Primární analýza Quant-seq dat

Výstupní soubory sekvenace byly demultiplexovány a překonvertovány z Bcl formátu na Fastq formát pomocí nástroje bcl2fastq Conversion Software (v2.20.0.422, Illumina) pro vyvolávání bází. Následovala extrakce 6 nt dlouhých UMI (použité k deduplikaci alignovaných readů, vizte dále). Kvalita hrubých readů byla determinována skrze nástroj FastQC (v0.11.8) <sup>545</sup>. V rámci předzpracování byly ready podrobeny trimmingu pomocí nástroje Seqtk (v1.3-r106) <sup>560</sup> (odstranění 6 nt dlouhých barcode sekvencí z Lexogen Unique Dual Indexing Add-on kitu) a pomocí nástroje Trimmomatic (v0.36) <sup>546</sup> (odstranění adaptérů a kvalitativní ořez). Také došlo ke kategorizaci readů na základě jejich původu za použití nástroje BioBloomTools (v2.3.4) <sup>561</sup>, jejím cílem je kontrola kontaminace vzorků. Následně byly vytvořeny alignmenty readů s referenčním transkriptem pomocí nástroje STAR (v2.7.3a) <sup>562</sup>. Namapované ready byly deduplikovány pomocí UMI-tools (v1.0.1) <sup>563</sup>. Alignmenty podstoupily několikero kontrol kvality pomocí nástrojů Samtools (v1.5) <sup>564</sup>, Picard (v2.18.29) <sup>565</sup> a Subread (v1.6.4) <sup>566</sup>. Nakonec došlo ke kvantifikaci namapovaných readů skrze Subread funkci featureCounts <sup>567</sup> a také skrze nástroj RSEM (v1.3.1) <sup>568</sup>. Všechny výsledky a statistiky byly zpracovány skrze nástroj MultiQC do jednoho kompaktního HTML reportu <sup>559</sup>.

### 3.7. Analýza diferenciální exprese

Diferenciální genová exprese byla vypočítána pomocí Bioconductor balíčku DESeq2 (v1.20.0) <sup>569</sup>. Jako základ pro výpočet posloužily výsledné gene-counts (počty readů mapované na jednotlivé transkripty z referenčního transkriptomu) paralelně jak z featureCounts tak z RSEM. Statistické zhodnocení (p-hodnoty) bylo provedené pomocí Wald testu a pro korekci vícenásobného testování byl použit false discovery rate (FDR) přístup. Geny (transkripty) byly vyhodnocené jako diferenciálně exprimované (DEG) pokud splňovaly následující podmínky: baseMean pokrytí  $\geq 20$  (průměrný počet readů

namapovaných na transkript);  $\log_2\text{fold-change} \geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$  (dvojkový logaritmus poměrné změny v expresy);  $\text{FDR} \leq 0,05$ . Pro vizuální ověření, zda se jednotlivé skupiny vzorků (SK, MK a D) od sebe v expresích dostatečně liší a vzorky jedné skupiny jsou si dostatečně podobné, byla pomocí Bioconductor balíčku `pcaExplorer` (v2.20.2) provedena Principle component analýza (PCA) a její výsledky vyneseny do grafu <sup>570</sup>.

### 3.8. Funkční anotace diferenciální exprimovaných genů a jejich enrichment

K diferenciálně exprimovaným genům a genům původního datasetu genové exprese, které se podařilo anotovat v databázi UniProt (Swiss-Prot, verze 2019\_07) <sup>554</sup>, byly z této databáze přiřazeny i příslušné genové ontologie (GO). Geny původního datasetu genové exprese byly použity jako pozadí. Analýza obohacení (enrichmentu) byla provedena pomocí funkce `enricher` v balíčku `clusterProfiler` (v.4.4.4.) <sup>571</sup>. Nadměrné zastoupení (enrichment) termínů bylo určeno pomocí Fisherovo exaktního testu a následnou korekci pro FDR.

### 3.9. Konstrukce vážené genové koexpresní sítě (WGCNA) a její vizualizace

K vytvoření genové koexpresní sítě byl použit balíček `WGCNA` (v1.71) pro program R (v4.2.1) <sup>572</sup>. Využity byly příslušné protokoly pro tuto metodu <sup>573</sup>. Z původního datasetu genové exprese obsahujícího surové `ready` byly odstraněny geny s velkým počtem chybějících hodnot (ve vzorcích neexprimované) a také geny, jejichž průměrná exprese byla menší než 15 transkriptů ve více než 75 % vzorků. Pomocí principle component analýzy (PCA) a hierarchického shlukování byly identifikovány vzorky s odlehlými hodnotami (outlier samples) a z datasetu také vyjmuty. K tomu byly využity funkce `prcomp` (balíček `stats` v4.2.1) a `hclust` (balíček `fastcluster` v1.2.3) <sup>574</sup>. Těmito zásahy došlo k odstranění ruchu na pozadí. Následovala normalizace počtu `readů` metodou stabilizace variancí pomocí funkce `vst` z balíčku `DESeq2` (v1.36) <sup>569</sup>. Před konstrukcí `WGCNA` bylo potřeba určit tzv. měkkou prahovou hodnotu (soft-tresholding power) neboli hodnotu  $\beta$ . Ta slouží k modifikaci genových korelací v matici sousednosti tak, aby se přiblížily k prahové hodnotě a zároveň došlo k odstranění ruchu na pozadí. Musí být ovšem vybrána taková hodnota, která po aplikaci splňuje podmínku tvorby sítě s bezškálovou topologií. Pro její výběr byla použita

WGCNA funkce `pickSoftTreshold`. Zvolená hodnota  $\beta$  a upravený dataset pak byly použity k automatickému sestavení koexpresních modulů pomocí WGCNA funkce `blockwiseModules`, která je vhodná k analýze datasetů velkých rozměrů. Ve funkci bylo použito základní nastavení krom následujících: `mergeCutHeight`, neboli hranice pro sloučení dvou modulů, byla nastavena na 0,25; `networkType`, tedy typ sítě, byl zvolen `signed hybrid`; pro replikovatelnost byl `randomSeed` nastaven na 1234. Obecně se během sestavování WGCNA nejprve spočítá matice sousednosti (adjacency matrix) pomocí Pearsonovi korelace mezi všemi páry genů napříč vzorky. Z ní je pak vypočítána matice topologických přesahů (Topological overlap matrix TOM) <sup>575</sup>. Hodnoty v TOM reprezentují míru propojenosti mezi geny a shlukováním genů s vysokým topologickým přesahem se vytvářejí moduly. Ty byly identifikovány z dendrogramu pomocí funkce `cutreeHybrid` (balíček `dynamicTreeCut` v1.63-1) <sup>576</sup>. Blízce korelované moduly byly sloučeny dohromady pomocí WGCNA funkce `mergeCloseModules`. Genové sítě vybraných modulů byly nakonec vizualizovány pomocí programu Cytoscape (v3.9.1) <sup>577</sup>.

### 3.10. Korelace modulů a znaků, výpočet vlastností genové sítě a jejich korelace

Z výsledků WGCNA analýzy byly získány hodnoty modul eigengene (ME), tedy první hlavní komponenty (principal components) každého modulu <sup>573</sup>. Ty byly použity pro výpočet korelace mezi moduly a znaky starý král (SK), mladý král (MK) a dělník (D) pomocí Pearsonovy korelace, a ta statisticky vyhodnocena pomocí Studentova t-testu. Vizualizace v podobě heatmapy byla provedena pomocí funkce `CorLevelPlot` (balíček `CorLevelPlot` v0.99.0) <sup>578</sup>.

Genová signifikace (GS) je definována jako korelace mezi jednotlivými geny a znakem, a definuje tedy důležitost daného genu k danému znaku <sup>575</sup>. Spočítána byla pomocí Pearsonovy korelace mezi normalizovanými hodnotami genové exprese a daným znakem a statisticky vyhodnocena pomocí Studentova t-testu. Intramodulární konektivita (K.in) je hodnota znázorňující míru propojenosti/koexprese genů určitého modulu k ostatním genům stejného modulu <sup>575</sup>. Spočítána byla jako součet sousedností (adjacencí) skrze všechny geny v dané síti (modulu). K jejímu vyhodnocení posloužila funkce `intramodularConnectivity` balíčku WGCNA. Modul membership (MM) je definováno jako korelace mezi profilem genové exprese a modul eigengene. Měří míru příslušnosti daného genu k danému modulu

a je vypočítána pro všechny geny, nehledě na jejich originální příslušnost k modulu. Tato hodnota má velmi blízko k K.in. Geny s vysokou K.in disponují většinou i vysokou MM u daného modulu <sup>573</sup>. Spočítána byla jako Pearsonova korelace mezi normalizovanými hodnotami genové exprese a ME a statisticky zhodnocena pomocí Studentova T-testu. Korelace mezi hodnotami GS, K.in a ME byla spočítána a vizualizována pomocí WGCNA funkce `verboseScatterplot`. Použita byla Pearsonova korelace a statistické zhodnocení pomocí Studentova t-testu.

Pro určení genů, které patří do top 5% genů s jak nevyššími hodnotami GS tak i K.in a MM, byly sestaveny Vennovy diagramy pomocí balíčku `VennDiagram` (v1.7.3) <sup>579</sup>.

Profil genové exprese vybraných modulů byl vytvořen a vizualizován pomocí funkce `Heatmap` balíčku `ComplexHeatmap` (v2.12.1) <sup>580</sup>. Vstupem byly normalizované hodnoty genové exprese transformované na standardizované skóre (Z-skóre).

### 3.11. Funkční anotace modulů a jejich enrichment

Funkční anotace modulů pomocí genových ontologií (GO), KEGG pathway a UniProt Keywords (UP-KW) a jejich následné obohacení (enrichment) bylo provedeno pomocí webového nástroje Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) <sup>581</sup>. Jako pozadí byly použity všechny geny z původního datasetu genové exprese. Nadměrné zastoupení (enrichment) termínů bylo určeno pomocí Fisherovo exaktního testu a následnou korekcí pro false discovery rate (FDR).

## 4. Výsledky

### 4.1. Získaná sekvenační data, BUSCO a PCA analýza

Sekvenační analýzou bylo celkově zpracováno 27 vzorků rozdělených do tří skupin (10x SK, 10x D a 7x MK). Celkově bylo identifikováno 20944 typů transkriptů, z čehož se jich podařilo 48,5 % anotovat pomocí UniProt databáze a 20,5 % pomocí Pfam databáze.

Získaná data byla podrobena BUSCO (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs) analýze, která poskytuje kvantitativní měřítka pro hodnocení úplnosti transkriptomu na základě evolučně očekávaných sekvencí ortologních genů. Výsledky BUSCO analýzy referenčního transkriptomu vykazují 99,4 % kompletnost ve srovnání s kmenem členovců (*Arthropoda*) a 99,2 % kompletnost v případě třídy hmyzu (*Insecta*) (Tab. I)

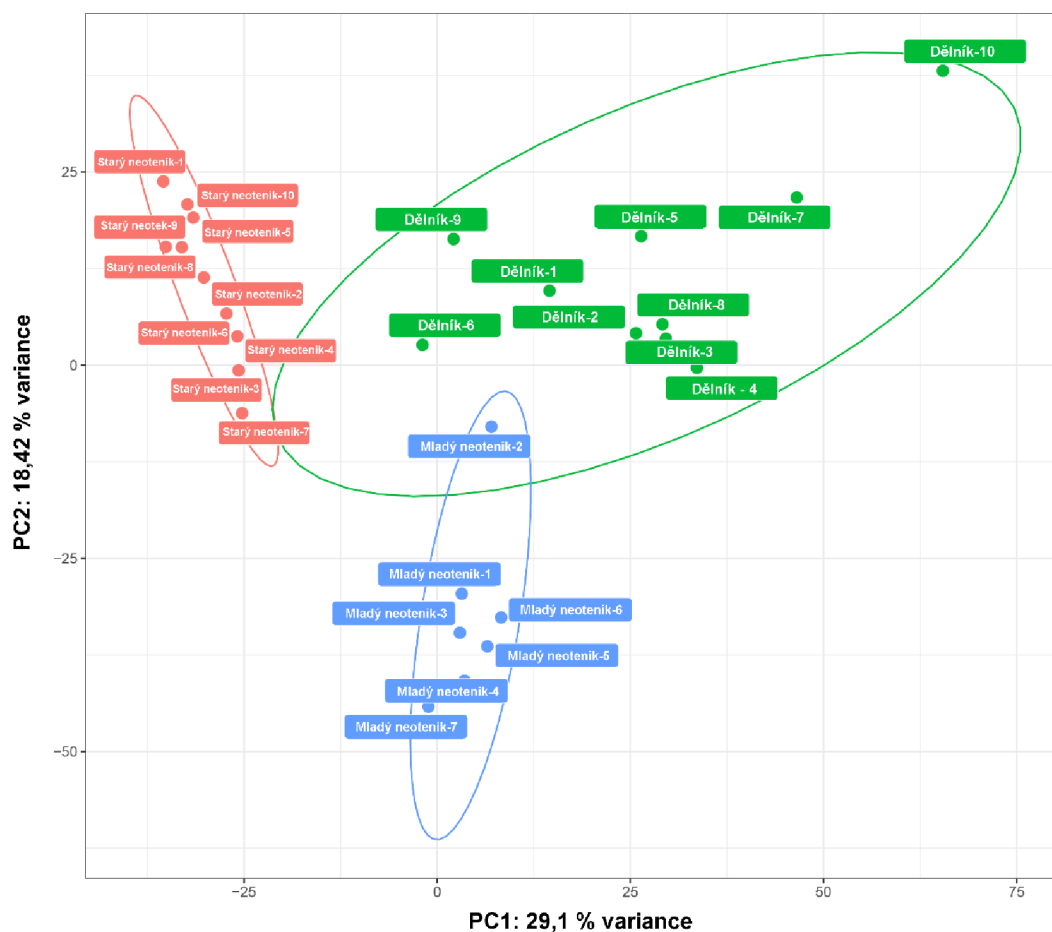
Pro celkové srovnání testovaných skupin byly vzorky dále podrobeny PCA, která data rozdělila na dvě komponenty (Obr. 5). První komponenta, umístěná na ose x, vysvětluje 29,1 % variance, s tím, že vzorky SK a MK se na této ose shlukují do dvou oddělených klastrů. Naproti tomu vzorky D jsou podél této osy rozptýlené a částečně se překrývají se vzorky MK. Druhá komponenta, umístěná na ose y, vysvětluje 18,4 % variance. Zde jsou od ostatních skupin nejvíce separovány (s výjimkou vzorku 2) vzorky MK. Vzorky SK a D se naproti tomu na ose y nachází v totožném úseku.

**Tab. I: Výsledky BUSCO analýzy (Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs).** Porovnání bylo provedeno vůči ortologním genům ze skupin *Arthropoda*, *Insecta* a *Metazoa*. První číslo vyjadřuje počet nalezených ortologů a druhé jejich procentuální zastoupení vzhledem k celkovému hledanému počtu. **C** = kompletní (disponují očekávanou délkou a rozsahem alignmentu) ortologní transkripty, s jednou či více kopiemi. **S** = kompletní ortologní transkripty s jednou kopií. **D** = kompletní ortologní transkripty s duplikovanými kopiemi. **F** = frangmentované ortologní transkripty. **M** = chybějící ortologní transkripty.

<b>BUSCO – výsledky hodnocení – arthropoda</b>	%	
Kompletní BUSCOs (C)	1060	99,4
Kompletní BUSCOs s jednou kopií (S)	949	89,02
Kompletní BUSCOs s duplikovanými kopiemi (D)	111	10,41
Fragmentované BUSCOs (F)	2	0,19
Chybějící BUSCOs (M)	4	0,38
Veškeré hledané BUSCO skupiny	1066	100,00

<b>BUSCO – výsledky hodnocení – insecta</b>	%	
Kompletní BUSCOs (C)	1645	99,2
Kompletní BUSCOs s jednou kopií (S)	1455	87,76
Kompletní BUSCOs s duplikovanými kopiemi (D)	190	11,46
Fragmentované BUSCOs (F)	7	0,42
Chybějící BUSCOs (M)	6	0,36
Veškeré hledané BUSCO skupiny	1658	100,00

<b>BUSCO – výsledky hodnocení – metazoa</b>	%	
Kompletní BUSCOs (C)	968	99,0
Kompletní BUSCOs s jednou kopií (S)	857	87,63
Kompletní BUSCOs s duplikovanými kopiemi (D)	111	11,35
Fragmentované BUSCOs (F)	4	0,41
Chybějící BUSCOs (M)	6	0,61
Veškeré hledané BUSCO skupiny	978	100,00



**Obr. 5: PCA analýza sekvenačních dat všech sekvenovaných vzorků:** Pomocí PCA analýzy byla vizualizována variance transkripčního profilu mezi vzorky. Transkripčním profilem je myšlena množina počtů čtení (read) všech sekvenovaných typů transkriptů (genů). Na grafu PCA analýzy můžeme vidět, zda se transkripční profily odlišných typů vzorků (např. dělník a starý král) od sebe dostatečně liší, nebo zda jsou transkripční profily stejných typů vzorků (např. dělník a dělník) dostatečně podobné. Na ose x nalezneme první hlavní komponentu vysvětlující 29,1 % variance a na ose y druhou hlavní komponentu vysvětlující 18,42 % variance.



## 4.2. Výsledky analýzy diferenciálně exprimovaných genů

Výsledky analýzy diferenciální genové exprese všech 3 porovnání (D oproti SK, MK oproti D a MK oproti SK) jsou v tabulce v příloze I. Geny byly považované za diferenciálně exprimované (DEG) pokud splňovaly následující podmínky:  $\text{baseMean} \geq 20$ ;  $\log_2\text{fold-change} \geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ;  $\text{FDR} \leq 0,05$ . Mezi D a SK bylo nalezeno 459 DEG, přičemž z toho je 192 DEG více exprimováno u SK a 267 více u D. Mezi D a MK bylo nalezeno 383 DEG, z toho je 147 více exprimováno u MK a 236 u D. Mezi SK a MK je 370 DEG, z toho je 140 více exprimováno u SK a 230 více exprimováno u MK.

Informace o vlastnostech a funkcích jednotlivých DEG byly dohledány skrze veřejně dostupné internetové zdroje, přičemž byl kladen důraz na jejich potenciální vliv na dlouhověkost a stárnutí. Na základě dohledaných vlastností bylo identifikováno 9 skupin DEG, které spojuje to, že společně ovlivňují určité buněčné pochody, které mají dopad na délku života a průběh stárnutí. Těmito skupinami jsou: 1) DEG spojené s autofágií a apoptózou; 2) DEG spojené s odpovědí na oxidační stres; 3) DEG spojené se signalizačními dráhami ovlivňujícími apoptický proces; 4) DEG spojené s Toll signalizací, patern rozeznávajícími receptory a antimikrobiálními peptidy; 5) DEG spojené s odpovědí na poškození DNA, proteinovou homeostází, sestřihem mRNA a transpozibilními elementy; 6) DEG spojené s regulací buněčného cyklu; 7) DEG spojené s detoxifikačními mechanismy; 8) DEG spojené s aktivitou juvenilního hormonu; 9) DEG spojené s metabolismem lipidů.

### 4.2.1. DEG spojené s autofágií a apoptózou

V rámci DEG souvisejících s autofágickým procesem bylo při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenáno šest DEG, přičemž je pět DEG více exprimováno u D a jeden DEG u MK. Při porovnání skupiny D se skupinou SK bylo zaznamenáno sedm DEG, přičemž všechny mají vyšší expresi u D. Při porovnání skupiny MK a SK bylo zaznamenáno sedm DEG, přičemž všechny mají vyšší expresi u MK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese ( $\text{Log}_2\text{FC}$ ) a popisu jejich vztahu k autofágii, jsou zaznamenány v Tab. II.

**Tab. II: DEG spojené s procesem autofágie:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese ( $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král.

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q5RFT1	ANT2BP	ANT2-binding protein	8,99295	5,99174	3,00122	Společně s ANT2 regulace potenciálů mitochondriální membrány a podpora mitofágie stabilizací PINK1 <sup>582</sup> .
Q9FPF0	DJ1A	Protein DJ-1 homolog A	6,76898	3,82608	2,94290	Účastní se mitofágie vyvolané působením PINK1/PARKIN <sup>583</sup> . Absence genu u drozofily zkracuje délku života a způsobuje sterilitu <sup>584</sup> .
P17721	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,	6,65489	4,29463	2,36026	Jeho sulfhydratace, fosforylace nebo nitrosilace způsobuje transport do jádra. Zde může stabilizovat autofagický Sirt1 nebo apoptickou Siah1 <sup>585-589</sup> .
Q70KH2	GBA	Acid beta-glucosidase	6,41073	1,93010	4,48062	Hydrolyza glukosylceramidů v lysozomu – součást autofagického procesu <sup>590-593</sup> . Absence genu vedla mitochondriálním dysfunkcím, pravděpodobně vinou absence mitofágie <sup>594</sup> .
Q8VCN5	CGL	Cystathionine gamma-lyase	6,02297	3,41480	2,60817	Sulfhydratace GAPDH -> nepřímá stabilizace Sirt1 <sup>588,595</sup> . Produkuje H <sub>2</sub> S – také schopný spouštět autofagii <sup>596</sup> .
Q9Z265	Chk2	Serine/threonine-protein kinase Chk2	2,49897	0,17778	2,32119	Inhibuje Sirt1 <sup>597</sup> .
A4QNN3	usp30	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 30	1,61975	0,47692	1,14283	Inhibice mitofágie hydrolyzací ubiquitinů připevněných na mitochondriální proteiny skrze PARKIN <sup>598,599</sup> .
P50430	Arsb	Arylsulfatase B	0,11486	-1,67816	1,79302	Lysozomální protein jehož úroveň se zvedá během autofágie <sup>600</sup> .

V rámci DEG souvisejících s pozitivní regulací apoptického procesu bylo při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenáno šest DEG, přičemž jsou čtyři DEG více exprimovány u D a dva DEG u MK. Při porovnání skupiny D se skupinou SK bylo zaznamenáno šest DEG, přičemž pět DEG je více exprimováno u D a jeden DEG u SK. Při porovnání skupiny MK a SK bylo pozorováno devět DEG, přičemž sedm DEG má vyšší expresi u MK a dva DEG u SK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese ( $\text{Log}_2\text{FC}$ ) a popisu jejich vztahu k apoptóze, jsou zaznamenány v Tab. III.

**Tab. III: DEG spojené s pozitivní regulací apoptického procesu:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese (Log2FC  $\geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (Uniprot nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q6PFP6	ndor1	NADP-dependent difflavin oxidoreductase 1	7,97309	4,13348	3,83960	Během oxidativního stresu se odděluje od proti-apoptického Ciapin1, přesouvá se do mitochondrií a pozitivně reguluje apoptický proces <sup>601,602</sup> .
Q15392	DHCR24	Delta(24)-sterol reductase	2,66543	1,91426	0,75117	Zabraňuje oxidačním stresem a amyloid-beta indukované apoptóze redukcí aktivity kaspázy 3 <sup>603,604</sup> . Při akutním stresu zabraňuje vazbě inhibitoru MDM2 na p53 <sup>605</sup> . V jiných buněčných typech naopak navyšuje vazbu MDM2 na p53 <sup>606</sup> .
Q9Z265	Chk2	Serine/threonine-protein kinase Chk2	2,49897	0,17778	2,32119	Účastní se odpovědi na poškození DNA, inhibice buněčného cyklu a spuštění apoptózy. Stabilizuje p53, zamezuje jeho inhibici skrze MDM2, aktivuje apoptický transkripční faktor E2-F1, inhibuje Sirt1 inhibující p53 <sup>597,607-615</sup> .
PF03145	SINA-TRAF	Seven in absentia protein family	2,37897	0,24393	2,13504	Expresе savčích homologů je p53 dependentní, napomáhají zastavení buněčného cyklu a účastní se apoptózy degradací jaderných proteinů <sup>589,616-618</sup> .
Q9NTG7	Sirt3	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin3	2,11884	0,12319	1,99565	Pozitivně reguluje apoptické funkce FOXO3 <sup>619,620</sup> . Centrální regulátor propojení změn mitochondriálního membránového potenciálu, intracelulární pH a mitochondriálních apoptických drah, který má pro- i proti-apoptické vlastnosti <sup>619,621-623</sup> .
P29216	APP	Amyloid-beta A4	1,20480	1,90936	-0,70457	Nadměrná exprese způsobuje oxidační stres a indukuje apoptózu skrze protein BAX a kaspázy <sup>624,625</sup> .
PF15815	MKRN1_C	E3 ubiquitin-protein ligase makorin	0,39737	-1,47911	1,87648	Negativně reguluje aktivitu p53 a p21. Během stresových podmínek ale upřednostňuje p21 a p53 je aktivní <sup>626</sup> .
PF15297	CKAP2_C	Cytoskeleton associated protein 2-c terminus	0,18459	-2,30330	2,48789	Zvýšená exprese v reakci na tetraploidii aktivuje apoptózu a zastavuje buněčný cyklus skrze p53 <sup>627,628</sup> .
O42249	RACK1	Receptor of activated protein kinase C	0,09742	-2,01577	2,11319	Oligomerizací pro-apoptického BAX zabraňuje jeho inhibici skrze anti-apoptický BCL2L <sup>629</sup> . Potlačuje aktivitu Scr, který potlačuje aktivitu p53 <sup>630,631</sup> .
P50876	RNF144A	E3 ubiquitin-protein ligase RNF144A	-1,51152	0,92930	-2,44083	Expresovaná v p53 dependentním způsobu. Ubiquitinací označuje k degradaci DNA-Pkcs a podílí se tak na apoptóze <sup>632</sup> .
P49756	RBM25	RNA-binding protein 25	-1,67293	2,22917	-3,90210	Alternativní sestřič BCL2L1 na pro-apoptickou formu L <sup>633</sup> .

V rámci DEG souvisejících s negativní regulací apoptického procesu bylo při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenáno deset DEG, přičemž všechny mají vyšší expresi u D. Při porovnání skupiny D se skupinou SK bylo zaznamenáno deset DEG, přičemž všechny mají zvýšenou expresi u D. Při porovnání skupiny MK a SK bylo pozorováno devět DEG, přičemž všechny mají zvýšenou expresi u MK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese (Log2FC) a popisu jejich vztahu k apoptóze, jsou zaznamenány v Tab. IV.

**Tab. IV: DEG spojené s negativní regulací apoptického procesu:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese ( $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q5RFT1	ANT2BP	ANT2-binding protein	8,99295	5,99174	3,00122	Ve spolupráci s ANT2 zabraňují apoptóze <sup>634-636</sup>
P42650	14-3-3-3	14-3-3 protein 3	7,25548	3,66689	3,58859	Role v inhibici apoptických proteinů BAD a BAX, regulují aktivitu p53 a E2-F1 <sup>637-640</sup> .
Q5XHK2	YWHAB-A	14-3-3 protein beta/alpha-A	6,87280	3,85337	3,01943	
Q9FPF0	DJ1A	Protein DJ-1 homolog A	6,76898	3,82608	2,94290	Zabraňuje apoptóze vyvolané oxidačním stresem. Znemohňuje vazbu p53 na DNA. Snižuje transkripci pro-apoptického BAX a aktivaci kaspázy 3 <sup>641-644</sup> . Absence genu u drozofily zkracuje délku života a způsobuje sterilitu <sup>584</sup> .
P17721	GAPDH	Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	6,65489	4,29463	2,36026	Jeho sulfhydratace, fosforylace nebo nitrosilace způsobuje transport do jádra. Zde může stabilizovat autofagický/antiapoptický Sirt1 nebo apoptickou Siah1 <sup>585-589</sup> .
Q8VCN5	CGL	Cystathionine gamma-lyase	6,02297	3,41480	2,60817	Sulfhydratace GAPDH -> nepřímá stabilizace Sirt1, který inhibuje aktivitu p53 <sup>588,595615</sup> .
Q92982	NINJ1	Ninjurin-1	3,69071	1,62470	2,06602	Během programované buněčné smrti indukuje prasknutí buněčné membrány <sup>645</sup> . Je exprimován v p53 dependentním způsobu, avšak sám potlačuje expresi p53 a tedy i další apoptózu <sup>646,647</sup> .
Q15392	DHCR24	Delta(24)-sterol reductase	2,66543	1,91426	0,75117	Zabraňuje oxidačním stresem a amyloid-beta indukované apoptóze redukcí aktivity kaspázy 3 <sup>603,604</sup> . Při akutním stresu zabraňuje vazbě inhibitoru MDM2 na p53 <sup>605</sup> .
P70406	Ucp2	Mitochondrial uncoupling protein 2	2,40708	2,36975	0,03733	Reguluje tok protonů přes vnitřní mitochondriální membránu, snižuje produkci ROS mitochondriemi a předchází tak oxidačním stresem indukované p53 apoptóze. Zamezuje uvolnění cytochromu C z membrány během apoptózy <sup>648-652</sup> . Její aktivita je spojena s prodloužením života u myši <sup>653,654</sup> . Je pravděpodobně utlumována skrze TGF- $\beta$ dráhu <sup>655</sup> .
Q9NTG7	Sirt3	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin3	2,11884	0,12319	1,99565	Pozitivně reguluje apoptické funkce FOXO3 <sup>619,620</sup> . Centrální regulátor propojení změn mitochondriálního membránového potenciálu, intracelulární pH a mitochondriálních apoptických drah, který má pro- i proti-apoptické vlastnosti <sup>619,621-623</sup> .
Q2TA06	AURKA	Aurora kinase A	0,58333	-1,34049	1,92382	Destabilizuje p53 protein <sup>656</sup> . Zvyšuje expresi anti-apoptického BIRC5, skrze nepřímou inhibici FBXCL7 <sup>657</sup> .
P61023	Chp1	Calcineurin B homologous protein 1	0,56333	1,97580	-1,41248	Negativní regulátor aktivity pro-apoptické kinázy STK17B <sup>658</sup> .

#### 4.2.2. DEG spojené s odpovědí na oxidační stres

V rámci DEG souvisejících s odpovědí na oxidační stres bylo při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenáno sedm DEG, šest DEG je více exprimováno u D a jeden DEG je více exprimován u MK. Při porovnání skupiny D se skupinou SK bylo zaznamenáno devět DEG, přičemž pět DEG je více exprimováno u D a tři u SK. Při porovnání skupiny MK a SK

bylo pozorováno osm DEG, přičemž šest DEG má vyšší expresi u MK a dva DEG mají vyšší expresi u SK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese (Log2FC) a popisu jejich vztahu k oxidačnímu stresu, jsou zaznamenány v Tab. V.

**Tab. V: DEG spojené odpovědí na oxidační stres:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese (Log2FC  $\geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (Uniprot nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q9FPF0	DJ1A	Protein DJ-1 homolog A	6,76898	3,82608	2,94290	Senzor oxidačního stresu zabrahující oxidačním stresem vyvolané apoptóze <sup>641,642</sup> . Absence genu u drozofily zkracuje délku života a způsobuje sterilitu <sup>584</sup>
O14569	CYB561D2	Transmembran e reductase CYB561D2	3,89851	0,14475	3,75377	Recykluje askorbát v endoplasmatickém retikulu (ER). Udržuje tak redox potenciál v ER. Nedostatek vitamínu C v ER zvyšuje jeho oxidační stres <sup>659–662</sup> . Vitamin C má antioxidační účinky <sup>663,664</sup> .
Q15392	DHCR24	Delta(24)-sterol reductase	2,66543	1,91426	0,75117	Během akutního oxidačního stresu zvyšuje odolnost proti tomuto stresu navýšením koncentrace cholesterolu. Zabraňuje apoptóze vyvolané oxidačním stresem <sup>603,604,665</sup> .
P70406	Ucp2	Mitochondrial uncoupling protein 2	2,40708	2,36975	0,03733	Reguluje tok protonů přes vnitřní mitochondriální membránu a snižuje produkci ROS mitochondriemi <sup>648–652</sup> . Její aktivita je spojena s prodloužením života u myši <sup>653,654</sup> . Je pravděpodobně utlumována skrze TGF- $\beta$ dráhu <sup>655</sup> .
Q9NTG7	Sirt3	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin3	2,11884	0,12319	1,99565	Řídí odpověď na oxidační stres, například pozitivně reguluje aktivitu SOD a Cat a FOXO3 <sup>619,666,667</sup> .
Q6X0I2	VgR	Vitellogenin receptor	1,68469	0,55259	1,13210	Spouští vstřebávání vitellogeninů <sup>668</sup> .
P00432	Cat	Catalase	1,57712	-0,17898	1,75610	Antioxidant <sup>36</sup>
Q94637	Vg6	Vitellogenin-6	1,44321	1,76729	-0,32408	Pravděpodobně disponuje jistými antioxidačními vlastnostmi <sup>499</sup> .
Q5ZJF4	Prx6	Peroxiredoxin-6	1,15389	-0,95590	2,10978	Antioxidant <sup>669s</sup>
Q9BPS0	Vg2	Vitellogenin-2	-1,25177	-3,78123	2,52947	Pravděpodobně disponuje jistými antioxidačními vlastnostmi <sup>499</sup> .
Q9D3D0	Ttpal	Alpha-tocopherol transfer protein-like	-1,86278	-0,96234	-0,90043	Umožňuje distribuci vitamínu E lipoproteiny <sup>670</sup> . U člověka dochází k jeho zvýšené expresi při oxidačním stresu <sup>671</sup> . Vitamin E je antioxidant <sup>672</sup> .
Q9GLW7	Prx5	Peroxiredoxin-5	-2,07532	1,80651	-3,88183	Antioxidant <sup>673</sup>
P08228	SOD1	Superoxid dismutase [Cu-Zn]	-2,38821	1,87022	-4,25843	Antioxidant <sup>674</sup>

#### 4.2.3. DEG spojené se signalizačními drahami s vlivem na apoptózu

Při porovnání skupiny D a skupiny MK bylo zaznamenáno šest DEG souvisejících s MAPK signalizacemi, přičemž pět DEG je více exprimováno u D a jeden DEG je více exprimován u MK. Dále dva DEG více exprimované u D a související s regulací proteinu FOXO a čtyři DEG více exprimované u D a související s ISS/TOR signalizací. Při porovnání skupiny D se skupinou SK bylo zaznamenáno pět DEG souvisejících s MAPK signalizacemi, přičemž tři DEG jsou více exprimované u D a dva DEG u SK. Dále tři DEG více exprimované u D a související s regulací proteinu FOXO a pět DEG více exprimovaných u D a souvisejících s ISS/TOR signalizací. Při porovnání skupiny MK a SK bylo pozorováno šest DEG souvisejících s MAPK signalizacemi, přičemž pět DEG je více exprimováno u MK a jeden DEG u SK. Dále tři DEG s vyšší expresí u MK souvisely s regulací proteinu FOXO a tři DEG více exprimované u MK a jeden DEG více exprimovaný u SK souviseli s ISS/TOR signalizací. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese (Log2FC) a popisu jejich vztahu ke zmíněným drahám, jsou zaznamenány v Tab. VI.

**Tab. VI: DEG spojené s MAPK/JNK, MAPK/p38, MAPK/ERK, ISS/TOR a FOXO signalizacemi:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese ( $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
P42650	14-3-3-3	14-3-3 protein 3	7,25548	3,66689	3,58859	Inhibují MAPK/JNK a MAPK/p38, stimuluji MAPK/ERK, podílejí se na inhibici a aktivaci TOR, inhibují FOXO, jsou regulovány insulinovou aktivitou <sup>637-640</sup> . Jejich negativní regulace FOXO je u drozofily spojená s délkou života <sup>675</sup> .
Q5XHK2	YWHAB-A	14-3-3 protein beta/alpha-A	6,87280	3,85337	3,01943	
P15131	LIRP	Locusta insulin-related peptid	3,38863	2,70854	0,68009	Insulin-like peptid <sup>676</sup>
P49706	CycD2	G1/S specific cyclin-D2	2,67068	0,67929	1,99139	Pozitivně reguluje TORC1 <sup>677</sup> .
Q9NTG7	Sirt3	NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-3	2,11884	0,12319	1,99565	Aktivace FOXO3 <sup>619</sup>
B1A8Z2	Calmyrin	Calcium and integrin binding protein	1,87319	-0,41667	2,28986	Inhibiči kinázy ASK1 inhibuje MAPK/JNK a MAPK/p38. Stimuluje MAPK/ERK <sup>678,679</sup> .
P28840	NEC1	Neuroendocrin e convertase 1	1,63274	0,38580	1,24694	Role v syntéze peptidický hormonů, tedy i insulinu <sup>680-682</sup> .

P29216	APP	Amyloid-beta A4	1,20480	1,90936	-0,70457	Zvýšená exprese může vést k aktivaci MAPK/JNK, MAPK/ERK a MAPK/p38 <sup>683-686</sup> .
O42249	RACK1	Receptor of activated protein kinase C	0,09742	-2,01577	2,11319	Podílí se na aktivaci MAPK/JNK a MAPK/p38 <sup>687-689</sup> .
O88529	ARNTL1	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1	-1,07975	2,03884	-3,11859	Negativně reguluje aktivitu TOR <sup>690</sup>
P08228	SOD1	Superoxid dismutase [Cu-Zn]	-2,38821	1,87022	-4,25843	Potlačuje MAPK/ERK stimulovanou apoptózu <sup>691</sup>
P34722	PKCL1	Protein kinase c-like 1	-2,65820	-4,86563	2,20743	U <i>C. elegans</i> stimuluje MAPK/JNK a v rámci MAPK/p38 stimuluje sekreci AP <sup>692,693</sup> .

V rámci DEG souvisejících TGF- $\beta$  signalizací byly při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenány tři DEG, přičemž dva DEG jsou více exprimovány u D a jeden DEG je více exprimován u MK. Při porovnání skupiny D se skupinou SK byly zaznamenány čtyři DEG, přičemž jeden DEG je více exprimován u D a tři u SK. Při porovnání skupiny MK a SK bylo pozorováno pět DEG, přičemž všechny mají vyšší expresi u SK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese (Log2FC) a popisu jejich vztahu k TGF- $\beta$  signalizaci, jsou zaznamenány v Tab. VII.

**Tab. VII: DEG spojené s TGF- $\beta$ :** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese (Log2FC  $\geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q13145	BAMBI	BMP and Activine membrane-bound inhibitor homolog	3,22475	4,07798	-0,85323	Inhibitor BMP a Activin receptorů <sup>694</sup>
P23359	BMP7	Bone morphogenetic protein 7	0,30734	1,88006	-1,57272	Růstový faktor aktivují BMP dráhu <sup>695,696</sup>
P35556	FBN2	Fibrillin-2	-1,51180	1,38032	-2,89212	Interaguje s BMP faktorem a napomáhá v aktivaci TGF- $\beta$ <sup>697</sup>
Q02330	MAD	MAD protein homolog	-1,73730	0,53283	-2,27013	Transkripční faktor, součást BMP dráhy <sup>698-700</sup>
P35555	FBN1	Fibrillin-1	-1,88187	0,73435	-2,61622	Interakcí s BMP faktorem napomáhá v aktivaci TGF- $\beta$ <sup>697</sup>
Q9VWQ2	S6KL	Serine/threonine protein kinase S6KL	-3,33445	-1,74457	-1,58988	Inhibitor BMP dráhy <sup>701</sup>

#### 4.2.4. DEG spojené s Toll signalizací, patern rozeznávajícími receptory (PPR) a antimikrobiálními peptidy (AP)

V rámci DEG souvisejících Toll signalizací, PRR a AP bylo při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenáno osm DEG, přičemž sedm DEG je více exprimováno u D a jeden u MK. Při porovnání skupiny D se skupinou SK bylo zaznamenáno dvanáct DEG, přičemž devět DEG je více exprimováno u D a tři u SK. Při porovnání skupiny MK a SK bylo pozorováno jedenáct DEG, přičemž šest DEG má vyšší expresi u MK a pět DEG u SK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese (Log2FC) a popisu jejich vztahu k Toll signalizaci, PRR a AP, jsou zaznamenány v Tab. VIII.

**Tab. VIII: DEG spojené s Toll signalizací, patern rozeznávajícími receptory a antimikrobiálními peptidy:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese (Log2FC  $\geq$  1,5849 nebo  $\leq$  -1,5849) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q8VCN5	CGL	Cystathionine gamma-lysase	6,02297	3,41480	2,60817	Sulfhydratací NF- $\kappa$ B stimuluje jeho aktivitu <sup>702</sup> .
B7TB45	NT1	Neurotrophin 1	4,58318	2,93935	1,64382	Neaktivně reguluje Imd signalizaci, čímž zabraňuje nadměrné exprese AP <sup>703</sup>
A1A547	Pglrp3	Peptidoglycan recognition protein 3	4,55873	3,06755	1,49118	Reaguje na bakteriální peptidoglykany. Jeho drozofilí ortholog PGRP-LF inhibuje Imd receptor PGRP-LE, čímž negativně reguluje signální dráhu Imd a zabraňuje nadměrné produkci AP <sup>704–706</sup>
Q92982	NINJ1	Ninjurin-1	3,69071	1,62470	2,06602	U člověka pozitivně reguluje aktivitu TLR-4 <sup>707</sup> . U drozofily dochází k jeho zvýšené regulaci pomocí Toll dráhy při zranění a infekci <sup>708</sup>
PF16077	SPZ	Spaetzle	3,33278	5,07826	-1,74547	Ligand Toll receptorů, k aktivaci dochází v odpovědi na patogenní částice <sup>709–711</sup>
Q17005	LSZ-c1	Lysozyme c-1	3,22205	-0,13250	3,35455	AP <sup>712,713</sup>
Q8N0N3	GBP	Beta-1,3-glucan binding protein	2,80211	1,57832	1,22379	Reaguje na mikrobiální beta-glukany <sup>714,715</sup>
Q5SV42	Serpinb1c	Serpin b1c	2,49838	1,42432	1,07406	Inhibitor serinových proteáz, může negativně regulovat Toll signalizaci, pravděpodobně skrze blokaci proteolýzy pro-spaetzle proteinů <sup>716</sup> .
Q6R5N8	TLR13	Toll-like receptor 13	1,84272	0,57170	1,27102	Toll-like receptory (TLR) v odpovědi na patogenní částice spouštějí Toll signalizaci (Valanne, Wang, Rámet 2011; Hidmark, von Saint Paul, Dalpke 2012; Weber et al. 2003; Chowdhury et al. 2019).
P26305	LPS-BP	Hemolymph lipopolysaccharide-binding protein	1,54487	-0,59137	2,13624	Reaguje na mikrobiální lipopolysacharidy (LPS) <sup>717</sup>



Q9VKG9	SPZ4	Speatzle 4	0,41939	2,16227	-1,74289	Ligand Toll receptorů, k aktivaci dochází v odpovědi na patogenní částice <sup>709-711</sup>
Q9JK88	Serpini2	Serpin i2	0,18297	-1,62537	1,80834	Inhibitor serinových proteáz, může negativně regulovat Toll signalizaci, pravděpodobně skrze blokaci proteolýzy pro-speatzle proteinů <sup>716</sup> .
Q9VLV7	SPZ3	Speatzle 3	-0,97216	0,80375	-1,77591	Ligand Toll receptorů, k aktivaci dochází v odpovědi na patogenní částice <sup>709-711</sup>
Q0Q028	DFP-3	Putative defense protein 3	-2,07046	0,56032	-2,63078	AP <sup>718</sup>
Q9U8W7	Tech-5B	Techylectin-5B	-2,14003	-1,00218	-1,13785	AP <sup>719</sup>
COHLB7	LSZ-2	Lysozyme 2	-2,18973	2,88364	-5,07337	AP <sup>712,713</sup>

#### 4.2.5. DEG spojené s poškozením DNA, proteinovou homeostází, sestřihem mRNA a TE

V rámci DEG souvisejících s odpovědí na poškození DNA byl při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenán jeden DEG s vyšší expresí u D. Při porovnání skupiny D se skupinou SK byly zaznamenány čtyři DEG s vyšší expresí u D. Při porovnání skupiny MK a SK bylo pozorováno šest DEG, přičemž pět DEG je více exprimováno u MK a jeden u SK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese (Log2FC) a popisu jejich vztahu k odpovědi na poškození DNA, jsou zaznamenány v Tab. IX.

V rámci DEG souvisejících s proteinovou homeostází bylo při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenáno sedm DEG, přičemž pět DEG je více exprimováno u D a dva DEG jsou více exprimovány u MK. Při porovnání skupiny D se skupinou SK bylo zaznamenáno pět DEG, přičemž čtyři DEG mají vyšší expresi u D a jeden u SK. Při porovnání skupiny MK a SK bylo pozorováno devět DEG, přičemž sedm DEG je více exprimováno u MK a dva u SK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese (Log2FC) a popisu jejich vztahu k proteinové homeostázy, jsou zaznamenány v Tab. IX.

V rámci DEG souvisejících s transpozibilními elementy byl při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenán jeden DEG s vyšší expresí u MK. Při porovnání skupiny D se skupinou SK byly zaznamenány dva DEG s vyšší expresí u SK. Při porovnání skupiny MK a SK byly pozorovány dva DEG s vyšší expresí u SK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese (Log2FC) a popisu jejich vztahu k transpozibilním elementům, jsou zaznamenány v Tab. IX.

V rámci DEG souvisejících se sestřihem mRNA byly při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenány tři DEG, přičemž jeden DEG má vyšší expresi u D a dva u MK. Při porovnání skupiny D se skupinou SK byl zaznamenán jeden DEG s vyšší expresí u SK. Při porovnání skupiny MK a SK byly pozorovány tři DEG, přičemž dva DEG jsou více exprimovány u MK a jeden u SK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese (Log2FC) a popisu jejich vztahu k sestřihu messenger RNA, jsou zaznamenány v Tab. IX.

**Tab. IX: DEG spojené s odpovědí na poškození DNA, proteinovou homeostází, sestřihem mRNA a transpozibilními elementy:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese (Log2FC  $\geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

Odpověď na poškození DNA						
ID	Zkratka	název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q7T0U5	ARPC3-b	Actin-related protein 2/3 complex subunit 3-B	4,79684	1,95057	2,84627	Součástí Arp2/3 komplexu, který polymerizuje aktin během různých buněčných pochodů v cytoplasmě <sup>720</sup> . Pokud ale působí v jádře, tak má vliv na regulaci genové transkripce a opravy DNA. Zprostředkovává pohyb dvouvláknových zlomů DNA během homologní rekombinace (HR) <sup>721</sup>
Q9Z265	Chk2	Serine/threonine protein kinase Chk2	2,49897	0,17778	2,32119	V odpovědi na poškození DNA zprostředkovává blokaci buněčného cyklu v S fázi a během G2/M tranzice <sup>610,722</sup> . Spouští opravu DNA skrze HR fosforylací proteinů BRCA1 a BRCA2 <sup>723,724</sup> . Fosforylací transkripčního faktoru FOXM1 spouští expresi BRCA2 a dalších DNA opravných genů <sup>612</sup> .
PF03145	SINA-TRAF	Seven in absentia protein family	2,37897	0,24393	2,13504	Savčí homologové Siah jsou exprimovány v odpovědi na poškození DNA a degradaci beta-kateninu přispívají k zastavení buněčného cyklu <sup>616-618</sup> .
Q27415	Nlp	Nucleoplasm-in-like	1,71871	0,88566	0,83304	Dekondezuje chromatin <sup>725,726</sup> . Inhibuje biogeneze ribozomů <sup>727</sup>
Q9V464	ASF1	Histon chaperon asf1	1,36775	-0,38513	1,75288	Depozice, výměna či odstranění histonů během tvorby či rozložení nukleozomu, tvorba tichého heterochromatinu <sup>728,729</sup> . U <i>Sacharomyces Cerevisiae</i> důležitý pro normální průběh buněčného cyklu, součást RCAD komplexu důležitého pro sestavení chromatinu po replikaci a opravě DSB <sup>730</sup>
Q9VPP5	RNH2-A	Ribonuclease H2 subunit A2	1,09136	-0,54232	1,63368	Katalytická podjednotka RNázy HII, degradace RNA v RNA:DNA hybridách, důležitá během replikace DNA, odstraňuje RNA primery z Okazakiho fragemntů, účastní se opravy mismatchů v DNA způsobených chybnou inkorporací ribonukleotidů <sup>731-733</sup> .
P50876	RNF144A	E3 ubiquitin-protein ligase RNF144A	-1,51152	0,92930	-2,44083	Ubiquitinací označuje DNA-PKcs pro degradaci <sup>632</sup> . DNA-PKcs mají kritickou roli v opravě DNA skrze nehomologní spojování konců (NHEJ) <sup>734,735</sup> .
Proteinová homeostáze						
ID	Zkratka	název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
P62630	EF1a1	Elongation factor1-alpha-1	7,12588	3,96827	3,15761	Zprostředkovávají vazbu aminoacyl-tRNA na A místo během syntézy proteinů <sup>736</sup> , jeho zvýšená exprese je

P41745	EF1a (1)	Elongation factor-1-alpha (1)	6,89492	4,25248	2,64244	spojená s prodloužením délky života <sup>737</sup> , pravděpodobně hraje roli i během buněčné smrti způsobené lipotoxicitou a jeho exprese se zvedá během oxidačního a endoplasmaticko-retikulárního stresu <sup>738</sup> .
POCT32	EF1a (2)	Elongation factor-1-alpha (2)	6,29256	3,77726	2,51530	
P0CG60	PUBB	Polyubiquitin-B	5,76481	4,10570	1,65911	Poskytuje ubiquitiny pro ubiquitinaci proteinů <sup>739-741</sup>
PF08559	Cut8	Cut8 nuclear proteasome tether protein	1,15992	-1,10928	2,26920	Zajišťuje nukleární akumulaci proteazomu 26s a tedy degradaci proteinů v ubiquitin-proteazom systému během jaderné kontroly kvality proteinů <sup>742</sup> .
P43307	TRAP-α	Translocon-associated protein subunit alpha	1,03868	-0,75211	1,79079	Součástí TRAP komplexu, jenž na endoplasmatické membráně translokuje a pomáhá správně skládat proteiny <sup>743-746</sup> .
O42249	RACK1	Receptor of activated protein kianse C	0,09742	-2,01577	2,11319	Komponent ribozomální podjednotky 40S, je zahrnut v inicializaci ribozomální kontroly kvality při zaseknutí se ribozomální translace. Ve spolupráci s ZNF598 ubiquitin-protein ligázou umožňuje ubiquitinaci 40S podjednotky a v důsledku toho zničení translatované mRNA a vznikajícího proteinového řetězce a recyklaci ribozomálních podjednotek <sup>747,748</sup>
A0A0B4J1F4	ARRDC4	Arrestin domain-containing protein 4	-0,39948	1,28265	-1,68212	Adaptér pro navázání ubiquitin-protein ligázy na její substrát <sup>749-751</sup>
PF13639	Znf_RING	Ring finger domain	-1,22191	-1,69616	0,47425	Součástí řady proteinů souvisejících s transkripcí, translací, distribucí mRNA, skládáním proteinů, přestavbou chromatinu a další <sup>752</sup> . doména protein-proteinové interakce a je pro ní typická E3-ubiquitin-protein ligázová aktivita <sup>753,754</sup> .
Q9QZ04	MAGEL2	MAGE-like protein 2	-1,26653	1,72723	-2,99376	Zvyšuje aktivitu E3 ubiquitin-ligáz <sup>755,756</sup>
Q9D799	MtFMT	Methionyl-tRNA formyltransferase	-1,68793	-0,23478	-1,45315	Mitochondriální protein konvertující methionyl-tRNA na N-formyl-methionyl-tRNA, která je klíčová pro iniciaci translace. Disfunkce tohoto enzymu vede k mitochondriálním dysfunkcím <sup>757,758</sup> .

### Transpozibilní elementy

ID	Zkratka	název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
P21329	POL-JOCKEY	RNA directed DNA polymerase from mobile element jockey	-0,46377	-2,01125	1,54748	Reverzní transkriptáza, jejíž gen je součástí TE třídy LINE <sup>759,760</sup> .
Q9NBX5	NABP-Xel	Nucleic-acid binding protein from transposon X-element	-1,89564	0,40325	-2,29889	Má pravděpodobně roli v reverzní transkripci a jeho gen je součástí TE třídy LINE <sup>761,762</sup> .
P10394	POL-412	Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 412	-2,25484	-0,02278	-2,23205	Reverzní transkriptáza, jejíž gen je součástí TE třídy LTR <sup>763</sup> .

### Sestřích mRNA

ID	Zkratka	název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q9H814	PHAX	Phosphorylated adapter RNA export protein	1,29851	0,59408	1,89259	Zajišťuje transport U sn-RNA z jádra do cytoplasmu <sup>764,765</sup> . Ty se podílejí na tvorbě uRNA proteinů, které jsou pak často důležité pro sestavení spliceozomálních komplexů <sup>766</sup> .
Q2TBE0	CWF19L2 (2)	CWF19-like protein 2 (2)	1,07932	4,56352	-3,48420	Je součástí spliceozomálního komplexu <sup>767</sup> .
Q8IZ73	RPUSD2	RNA pseudouridylate synthase domain-containing protein 2	-1,42616	-2,41239	0,98623	Katalyzuje pseudouridylaci mRNA, což je posttranskripční modifikace měnící RNA-protein a RNA-RNA interakční vlastnosti <sup>768</sup> . Tyto modifikace mají ale také roli v alternativní sestřihu mRNA <sup>769</sup> .
Q28C44	CWF19L2 (1)	CWF19-like protein 2 (1)	-3,23561	-5,87162	2,63601	Je součástí spliceozomálního komplexu <sup>767</sup>

#### 4.2.6. DEG spojené s regulací buněčného cyklu

V rámci DEG souvisejících regulací buněčného cyklu bylo při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenáno dvacet tři DEG, přičemž devět DEG má vyšší expresi u D a čtrnáct u MK. Při porovnání skupiny D se skupinou SK bylo zaznamenáno dvanáct DEG, přičemž deset DEG je více exprimováno u D a dva u SK. Při porovnání skupiny MK a SK bylo pozorováno třicet DEG, přičemž dvacet osm DEG je více exprimováno u MK a dva u SK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese (Log2FC) a popisu jejich vztahu k buněčnému cyklu, jsou zaznamenány v Tab. X.

**Tab. X: DEG spojené s regulací buněčného cyklu:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese (Log2FC  $\geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
O17449	TubB1 (1)	Tubulin beta-1 chain (1)	7,30902	3,39927	3,90974	Stavební prvek mikrotubulů <sup>770</sup>
P39825	Profilin	Profilin	7,28207	3,41653	3,86554	Zajišťuje lokalizaci myosinu II v ekvatoriálním kortexu během mitotické cytokineze <sup>771</sup>
Q6VTH5	RSPH1	Radial spoke head 1 homolog	6,58610	3,55018	3,03592	Pravděpodobně role během samčí meiózy a to na základě jeho expresních změn a lokalizace u myši <sup>772</sup> .
P68373	TubA1C	Tubulin alpha-1c chain	6,40944	3,67897	2,73048	Stavební prvek mikrotubulů <sup>770</sup>
Q32TF8	EFHC2	EF-hand domain-containing family member c2	5,66597	3,53914	2,12683	Stavební prvek mikrotubulů <sup>773</sup>
P49706	CycD2	G1/S-specific cyclin-D2	2,67068	0,67929	1,99139	Spolupracuje s CDK4. Reguluje buněčný cyklus během G1/S tranzice a funguje jako integrátor různých mitogenních a anti-mitogenních signálů <sup>774,775</sup> .
Q9Z265	Chk2	Serine/threonine-protein kinase Chk2	2,49897	0,17778	2,32119	V odpovědi na poškození DNA zprostředkovává blokaci buněčného cyklu v S fázi a během G2/M tranzice <sup>610,722</sup> .
Q24560	TubB1 (2)	Tubulin beta-1 chain (2)	1,90380	1,64944	0,25436	Stavební prvek mikrotubulů <sup>770</sup>
B1A8Z2	Calmyrin	Calxium and integrin-binding protein 1	1,87319	-0,41667	2,28986	Pravděpodobně se účastní procesu endomitózy <sup>776,777</sup> . Také se zdá, že má roli v regulaci buněčného cyklu. U myších sameček, bez funkční kopie tohoto genu, docházelo ke sterilitě. Ta byla zřejmě způsobena narušením haploidní fáze spermatogeneze <sup>778</sup> .
Q6DIS8	LZTS2	Leucin zipper putative tumor suppressor 2 homolog	1,77916	2,19093	-0,41177	Potřebný pro tvorbu centrálního vřeténka a dokončení cytokineze během mitózy <sup>779,780</sup> .
Q5U4X5	NDC80	Kinetochor protein NDC80 homolog	1,23293	-0,91057	2,14350	Komponent esenciálního kinetochorového komplexu NDC80, důležitého pro segregaci chromozomů a kontrolní bod sestavení mitotického vřeténka. Zajišťuje stabilitu kinetochoru a organizaci mikrotubule vázajících míst <sup>781-783</sup> .
Q9I7I0	CycB3	G2/mitotic-specific cyclin-B3	1,12863	-1,71137	2,84000	Reguluje buněčný cyklus během G2/M tranzice. Působí ovšem jako supresor cytokineze, u které dochází ke zrychlení po jeho odstranění. Je důležitý pro fertilitu drozofilých sameček <sup>784,785</sup> .

Q9VC45	ASP	Protein abnormal spindle	0,83086	-1,79625	2,62711	Udržuje strukturu centrozomálního mikrotubulového organizačního centra během mitózy <sup>786</sup> .
P97329	KIF20A	Kinesine-like protein KIF20A	0,78189	-1,47745	2,25935	Má vliv na takzvaný chromozomální passenger komplex, který je důležitý pro správný průběh cytokineze <sup>787</sup> .
Q7ZW63	Nuf2	Kinetochor protein Nuf2	0,76158	-1,03649	1,79807	Komponent kinetochorového komplexu NDC80 <sup>788,789</sup>
PF16006	NuSAP1	Nucleolar and spindle-associated protein	0,72206	-1,18813	1,91019	Stabilizuje vřetenkové mikrotubuly během mitózy <sup>790</sup>
Q6RT24	CENPE	Centromere-associated protein E	0,67737	-1,70238	2,37974	Kinetochorový protein s rolí v konjugaci mikrotubulů ke kinetochoru, v kontrolním bodu sestavení kinetochorového vřeténka během metafáze a seřazení chromozomů <sup>791-793</sup>
Q2TA06	AURKA	Aurora A kinase / AURKA	0,58333	-1,34049	1,92382	Mitotická serin/threonin kináza. Asociuje se s centrozomem a vřetenkovými mikrotubuly během mitózy a má kritickou roli v sestavení mitotického vřeténka, duplikaci centrozomu, segregaci chromozomů, seřazení chromozomů, kontrolním bodu sestavení mitotické vřeténka a cytokinezi <sup>794,795</sup> . Aktivuje CDK1, fosforyluje p53 nebo destabilizuje BRCA1 a reguluje G2/M tranzici <sup>656,796,797</sup> .
P23572	CDK1	Cyclin-depoment kinase 1	0,47120	-1,67182	2,14302	Reguluje buněčný cyklus v rámci G1/S a G/M tranzic <sup>798-800</sup> .
P24861	CycA	G2/mitotic-specific cyclin-A	0,44892	-1,93687	2,38579	Reguluje tranzici G2/M a G1/S fází buněčného cyklu a interaguje s CDK2 <sup>801,802</sup> .
P33174	KIF14	Chromosome-associated kinesin KIF14	0,41780	-1,26548	1,68329	Interaguje s mikrotubuly a má roli během segregace chromozomů a cytokineze <sup>803,804</sup> .
E2RYF8	TPX2	Targeting protein for Xklp2 homolog	0,24043	-2,03202	2,27245	Faktor sestavení mitotického vřeténka. Cílí kinezin 15 k minus konci mikrotubulů <sup>805</sup> .
O43663	PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	0,21091	-1,43872	1,64963	Klíčový regulátor cytokineze pomocí KIF14 lokalizovaný na centrálním vřeténku <sup>803,806,807</sup> .
PF15297	CKAP2_C	Cytoskeleton associated protei 2 – c terminus	0,18459	-2,30330	2,48789	Stabilizuje mikrotubuly a reguluje na aneuploidii zastavením buněčného cyklu a iniciací apoptózy skrze p53 signalizaci <sup>627,628</sup> . Je degradován na výstupu z mitózy <sup>808</sup> .
P52304	POLO	Serine/threonine-protein kinase polo	0,12504	-2,36787	2,49290	Reguluje mitotický cyklus a cytokinezi skrze regulaci lokalizace augminového komplexu na mitotických vřeténkách <sup>809,810</sup> .
Q2HJ86	TubA1D	Tubulin alpha-1D chain	0,11147	1,90673	-1,79526	Stavební prvek mikrotubulů <sup>770</sup>
O42249	RACK1	Receptor of activated protein kinase C	0,09742	-2,01577	2,11319	Inhibuje buněčný růst prodloužením G0/G1 a G1/S fází skrze inhibici Src tyrosin kinázy <sup>811</sup> .
Q28185	POC1A	POC1 centriolar protein homolog A	-0,02709	-1,99692	1,96983	Vyžadován pro sestavení a stabilitu centriol a také pro jejich duplikaci a kontrolu délky <sup>812,813</sup>
PF18210	Kn11_RWD_C	kn11 rwd c-terminal domain	-0,19652	-1,58032	1,38380	Součást KMN sítě, která je jádrem vnějšího kinetochoru a je zodpovědná za vazbu a stabilizaci mikrotubulů ke kinetochoru a za kontrolní bod v sestavení vřeténka <sup>814</sup> .
Q15398	DAP-5	Disk large-associated protein 5	-0,45643	-2,98277	2,52634	Mitotický fosfoprotein regulovaný ubiquitin-proteazom dráhou. Potenciální regulátor mitotické fáze buněčného cyklu během přechodu mezi metafází a anafází. Nejspíše má roli ve formování centrozomu a pohybu chromozomů podél vřetének <sup>815,816</sup> .
Q9VGY6	Skeletor	Protein Skeletor	-0,52727	2,05684	-2,58411	Poskytuje strukturální podporu pro stabilizaci a organizaci mikrotubulového vřeténka během mitózy a meiózy <sup>817</sup> .
PF14932	HAUS3_N	HAUS augmin-like complex subunit 3	-0,87784	-3,82228	2,94444	Součást HAUS komplexu, který je vyžadován pro sestavení mitotického vřeténka a udržení integrity centrozomu <sup>818,819</sup> .
PF17082	Spc29	Spindle pole component 29	-2,78874	-5,83876	3,05002	Součást komplexu Spc110p, který je důležitý pro správnou duplikaci centrozomu <sup>820</sup>
Q9BYG5	PARD6B	Partitioning defective 6 homolog beta	-2,78874	-1,25685	-1,31640	Adaptérový protein podílející se na asymetrickém dělení buněk a ovlivňující orientaci mitotického vřeténka <sup>821,822</sup> .

#### 4.2.7. DEG spojené s detoxifikačními mechanismy

V rámci DEG souvisejících s detoxifikačními cykly bylo při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenáno sedm DEG, přičemž jeden DEG má vyšší expresi u D a šest u MK. Při porovnání skupiny D se skupinou SK bylo zaznamenáno osm DEG, přičemž čtyři DEG jsou více exprimovány u D a čtyři u SK. Při porovnání skupiny MK a SK byly pozorovány čtyři DEG, přičemž dva DEG jsou více exprimovány u MK a dva u SK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese (Log2FC) a popisu jejich vztahu k detoxifikaci, jsou zaznamenány v Tab. XI.

**Tab. XI: DEG spojené s detoxifikačními mechanismy:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese (Log2FC  $\geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q6IE26	EPH4	Epoxide hydrolase 4	7,69475	9,86280	-2,16805	Epoxid hydrolázy se podílí na přeměně toxických xenobiotik s epoxidovými residui na odpovídající dioly <sup>823</sup> . O funkcích EPH4 se toho ale příliš neví.
Q3ZBV9	DHRS11 (1)	Dehydrogenase/reductase SDR family member	2,01109	0,46291	1,54819	Redukuje endogenní a exogenní alfa-dicarbonylované sloučeniny a alicyklické ketony <sup>824</sup>
P42860	GST1	Glutathion S-transferase 1-1	1,95553	1,00749	0,94804	Konjuguje redukováný glutathion s exogenními a endogenními toxickými látkami, jako jsou peroxidované lipidy <sup>825</sup> .
Q3ZCJ2	AKR1A1	Aldo-keto reductase family 1 member A1	1,85407	1,20814	0,64593	Redukuje celou řadu toxických aldehydů jako je například acrolein <sup>826,827</sup> .
Q8R164	BPHL (2)	Biphenyl hydrolase-like protein (2)	-0,97838	-1,81428	0,83590	Je možné, že mají roli v detoxifikačních procesech
Q86WA6	BPHL (1)	Biphenyl hydrolase-like protein (1)	-1,05848	-2,21817	1,15969	alfa-aminokyselinových esterů <sup>828</sup> .
O97951	UGT 2B18	UDP-glucuronosyltransferase 2B18	-1,15528	-1,10934	2,26461	Podílí se na glukuronidaci potenciálně toxických endo- i exogenních sloučenin <sup>829,830</sup> .
P16662	UGT 2B7	UDP-glucuronosyltransferase 2B7	-1,26618	-1,75361	0,48743	
Q8WN97	UGT 2B30	UDP-glucuronosyltransferase 2B30	-1,72169	-2,90270	1,18101	
Q6UWP2	DHRS11 (2)	Dehydrogenase/reductase SDR family member 11 (2)	-2,15888	-0,23365	-1,92523	Redukuje endogenní a exogenní alfa-dicarbonylované sloučeniny a alicyklické ketony <sup>824</sup> .
P22673	Uro	Uricase	-3,77432	-8,99638	5,22205	Zprostředkovává první krok přeměny kyseliny močové na allantoin, tedy konečné fáze purinového katabolismu a kroku v exkreci dusíkatého odpadu <sup>831</sup> .
Q9TSL6	UGT 2B23	UDP-glucuronosyltransferase 2B23	-7,91423	-9,25213	1,33790	Podílí se na glukuronidaci potenciálně toxických endo- i exogenních sloučenin <sup>829,830</sup> .

#### 4.2.8. DEG spojené s aktivitou juvenilního hormonu

V rámci DEG souvisejících s aktivitou juvenilního hormonu bylo při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenáno osm DEG, přičemž čtyři DEG mají vyšší expresi u D a čtyři u MK. Při porovnání skupiny D se skupinou SK bylo zaznamenáno osm DEG, přičemž čtyři DEG jsou více exprimovány u D a čtyři u SK. Při porovnání skupiny MK a SK bylo pozorováno sedm DEG, přičemž šest DEG je více exprimováno u MK a jeden u SK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese (Log2FC) a popisu jejich vztahu k juvenilnímu hormonu, jsou zaznamenány v Tab. XII.

**Tab. XII: DEG spojené s regulací juvenilního hormonu:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese (Log2FC  $\geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q17127	HEX	Hexamerin	8,59519	3,44080	5,15439	Larvální zásobní proteiny <sup>832</sup> . U termitů navíc známo, že se jejich exprese zvyšuje v odpovědi na morfogenní JH a že pravděpodobně potlačují JH dependentní diferenciaci dělníků na vojáky <sup>462,463</sup> . Jejich exprese v odpovědi na JH je známá i u včel a mravenců, s tím že pravděpodobně sekvstrují JH v hemolymfě a tím omezují jeho biologickou dostupnost <sup>470,833</sup> .
Q25641	ACrPI (HEX)	Allergen Cr-PI (HEX)	7,82699	-0,59765	8,42465	Larvální zásobní protein švábů, pravděpodobně také Hexamerin <sup>834</sup>
PF06585	HJHB	Hemolymph JH binding protein	3,03757	1,12435	1,91322	Váže se na JH během jeho distribuce hemolymfou a chrání ho před působením esteráz <sup>835</sup>
Q6X0I2	VgR	Vitellogenin receptor	1,68469	0,55259	1,13210	Spouští vstřebání vitellogeninu pomocí endocytózy a jeho exprese se podařilo indukovat pomocí JH analogu methoprenu <sup>668</sup> .
P10776	NPA	Neuroparsin-A	1,45141	1,98832	-0,53691	Multifunkční neurohormon s vlivem na absorpci tekutin a množství lipidů a sacharidu trehalózy v hemolymfě <sup>836,837</sup> . Také je ovšem schopný inhibovat aktivitu JH <sup>838</sup> . JH také indukuje jeho zvýšenou expresi <sup>839</sup> .
Q94637	Vg6	Vitellogenin 6	1,44321	1,76729	-0,32408	Vitellogeniny jsou produkovány v odpovědi na JH <sup>442,528</sup> .
Q8WPA2	AR	Allostatin-A receptor	1,02383	1,73721	-0,71337	Receptor Allostatinu inhibující syntézu JH <sup>840</sup> .
Q6R7M4	MFE	Methyl farnesoate epoxidase	0,93482	-0,79943	1,73425	Zajišťuje poslední krok v tvorbě Juvenilního hormonu III <sup>453,527</sup>
Q9NH03	GGPS (4)	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase / Farnesyl diphosphate synthase (4)	0,58673	-2,33434	2,92107	V mevalonátové dráze se nacházejí v jakémsi bodě větvení, protože jejich produkty mohou dávat za vznik cholesterolům (ne u hmyzu), isoprenoidům, a nebo Juvenilnímu hormonu <sup>527</sup> .
Q9BPS0	Vg2	Vitellogenin 2	-1,25177	-3,78123	2,52947	Vitellogeniny jsou produkovány v odpovědi na JH <sup>442,528</sup> .
P54961	HMGCS-1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase 1	-2,34091	-0,97771	-1,36320	Zajišťuje tvorbu HMG-CoA z acetyl-CoA a acetoacetyl-CoA, tedy jeden z prvních kroků v mevalonátové dráze <sup>527</sup> .

Q9WTN0	GGPS (3)	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase / Farnesyl diphosphate synthase (3)	-3,19582	-0,24741	-2,94841	V mevalonátové dráze se nacházejí v jakémisi bodě větvení, protože jejich produkty mohou dávat za vznik cholesterolům (ne u hmyzu), isoprenoidům, a nebo Juvenilnímu hormonu <sup>527</sup> .
P56966	GGPS (2)	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase / Farnesyl diphosphate synthase (2)	-3,86165	-2,44981	-1,41184	
O95749	GGPS (1)	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase / Farnesyl diphosphate synthase (1)	-5,43196	-6,88182	1,44986	

#### 4.2.9. DEG spojené s metabolismem lipidů

V rámci DEG souvisejících s lipidickým metabolismem bylo při porovnání skupiny D a skupiny MK zaznamenáno deset DEG, přičemž šest DEG má vyšší expresi u D a čtyři u MK. Při porovnání skupiny D se skupinou SK bylo zaznamenáno sedmnáct DEG, přičemž jedenáct DEG je více exprimováno u D a šest u SK. Při porovnání skupiny MK a SK bylo pozorováno deset DEG, přičemž šest DEG je více exprimováno u MK a čtyři u SK. Všechny tyto geny, včetně hodnot jejich diferenciální exprese (Log2FC) a popisu jejich vztahu k lipidickému metabolismu, jsou zaznamenány v Tab. XIII.

**Tab. XIII: DEG spojené s metabolismem lipidů:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese (Log2FC  $\geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MkvSK (Log2FC)	Funkce
Q8VBX1	ELip	Endothelial lipase	8,27827	8,47084	-0,19257	Má fosfolipázovou i triglycerid lipázou aktivitu, ovšem je více aktivní jako fosfolipáza <sup>841,842</sup> . Také je aktivní vůči HDL lipoproteinům <sup>841</sup>
O60488	LCACL4	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4	7,94686	-1,55445	9,50131	Tvoří acyl-CoA z dlouhých mastných kyselin, které se pak využívají jak při beta-oxidaci tak při syntéze dlouhých kyselin. Preferuje jako substrát AA a eicosapentenovou kyselinu <sup>843-845</sup>
Q70KH2	GBA	Acid beta-glucosidase	6,41073	1,93010	4,48062	V lysozomech katalyzuje hydrolýzu glucosylceramidů na ceramidy a glukózu <sup>590-593</sup> .
P51909	APOD	Apolipoprotein D	4,08755	3,54408	0,54347	Apolipoprotein spojovaný s dlouhověkostí, obranou proti oxidačnímu stresu <sup>846-851</sup> . Zabraňuje oxidaci volné arachidonové kyseliny a hydrolýze jejich membránových forem <sup>852,853</sup> .
PF01442	APOA_E	Apolipoprotein A1/A4/E domain	3,31888	3,50071	-0,18183	Protein obsahující domény apolipoproteinů A/E. Některé alely apoE jsou spojovány s dlouhověkostí u lidí <sup>854</sup> .
O44390	ACD11DS	Acyl-CoA Desaturase(11)	2,91984	0,83510	2,08475	Tvorba nenasycených mastných kyselin <sup>855</sup>



Q15392	DHCR24	Delta(24)-sterol reductase	2,66543	1,91426	0,75117	Přeměna potravně přijímaných fytoosterolů na cholesterol <sup>856,857</sup> .
Q3ZBV9	DHRS11 (1)	Dehydrogenase/reductase SDR family member 11(1)	2,01109	0,46291	1,54819	Podílí se na tvorbě steroidních hormonů <sup>824</sup> .
Q9U943	APOphoriny	Apolipoporphorins	1,84912	0,13702	1,71210	Formují lipoproteiny <sup>858-860</sup> .
Q9QZU7	GBBD	Gamma-butyrobetaine dioxygenase	1,71958	0,50431	1,21528	Syntéza karnitinu <sup>861,862</sup>
Q0VC74	TMLD	Trimethyllysine dioxygenase	1,60588	0,77721	0,82867	Syntéza karnitinu <sup>861,862</sup>
O46108	Lip3	Lipase 3	1,56651	2,07621	-0,50970	Má fosfolipázovou i triglycerid lipázou aktivitu <sup>863,864</sup>
Q0P4F7	MCACL-ACSF2	Medium-chain acyl-CoA ligase	1,49751	1,71249	-0,21497	Tvorba acyl-CoA z mastných kyselin <sup>865</sup>
Q5ZJF4	Prx6	Peroxiredoxin 6	1,15389	-0,95590	2,10978	Přeměňuje lysofosfatidylcholin na fosfatidylcholin a vykazuje fosfolipázovou A2 aktivitu a nezávislou na vápníku <sup>866,867</sup> .
A0A0R4IVV0	MTTP	Microsomal triglycerid transfer protein large subunit	0,91186	-0,88633	1,79818	Transport triglyceridů a cholesterol esterů mezi buněčnými membránami, napomáhá sestavení apolipoproteinů B <sup>868-870</sup>
Q9D8B1	FAHFAH AIG1	Fatty acid esters of hydroxy fatty acids hydrolase AIG1	-0,45558	1,27502	-1,73060	Hydrolyza esterů mastných kyselin a hydroxymastných kyselin <sup>871</sup> .
Q6T707	SCDS4	Stearoyl-CoA desaturase 4	-0,96294	-2,36290	1,39996	Tvorba nenasycených mastných kyselin <sup>872,873</sup> .
Q92038	ACDS	Acyl-CoA desaturase	-1,04411	-2,27758	1,23347	Tvorba nenasycených mastných kyselin <sup>872,873</sup> .
Q7M4I5	PLA2 (1)	Phospholipase A2	-1,48684	0,24644	-1,73329	Hydrolyzuje membránové fosfolipidy, uvolňuje z nich volné mastné kyseliny. Má preferenci k arachidonové kyselině, a tím zvyšuje množství její volně cirkulující formy <sup>874,875</sup>
P16354	PLA2 (2)	Phospholipase A2 isozymes PA3A/PA3B/PA5	-1,73284	-0,43970	-1,29314	
Q9VCY8	AdipoR	Adiponectin receptor	-1,81085	-1,50632	-0,30453	Receptor hormonu adiponectinu <sup>876</sup> . Aktivace stimuluje lipidický katabolismus <sup>877</sup> .
Q6UWP2	DHRS11 (2)	Dehydrogenase/reductase SDR family member 11(2)	-2,15888	-0,23365	-1,92523	Podílí se na tvorbě steroidních hormonů <sup>824</sup> .
P80035	Glip	Gastric triacylglycerol lipase	-2,33196	-0,92300	-1,40895	Hydrolyza dietárních triglyceridů <sup>878</sup>
Q61263	SOAT1	Sterol O-acyltransferase 1	-2,57454	-1,13689	-1,43765	Tvorba cholesterol-esterů <sup>879,880</sup>
A5PK46	PLip-RP2	Pancreatic lipase-related protein 2	-3,59624	-0,97542	-2,62082	Hydrolyza dietárních triglyceridů <sup>881</sup>
Q9VG17	CYP304a1 (1)	Cytochrome P450 304a1 (1)	3,84964	3,52722	0,32242	Pravděpodobně mají roli v syntéze ecdysteroidů <sup>882,883</sup>
Q9NGX9	CYP302a1 (2)	Cytochrome P40 304a1 (2)	2,18480	0,95848	1,22632	
Q9VYY4	CYP4g15	Cytochrome P450 4g15	-0,67583	-1,99350	1,31767	
Q9V4U7	CYP6a14	Cytochrome P450 6a14	1,08301	-0,85681	1,93982	

#### 4.3. Výsledky funkční anotace a enrichmentu diferenciálně exprimovaných genů

U všech 3 datových souborů diferenciální exprese (D oproti SK, MK oproti D a MK oproti SK) byla provedena funkční anotace a tzv. enrichment, a to za účelem bližšího prozkoumání biologických funkcí těchto diferenciálně exprimovaných genů. K analýze byla využita funkce enricher z balíčku clusterProfiler (v.4.4.4.)<sup>571</sup>. Geny byly funkčně anotované pomocí

GO: biologický proces získaných z databáze Uniprot. Všechny významně obohacené termíny (FDR < 0,05), pro každé ze 3 porovnání, jsou zobrazeny v Tabulce XIV. Kompletní výsledky enrichment analýz jsou dostupné v příloze V. Jako pozadí pro enrichment analýzu byl použit základní datový soubor genové exprese získaný sekvenací. Nevýhodou použitého souboru bylo, že pouze 48,5% ze všech 20944 typů identifikovaných transkriptů se podařilo anotovat v proteinové databázi UniProt, takže jen k necelé polovině pozadí bylo možno přiřadit funkční anotace. Podíl pomocí UniProt anotovaných genů byl mezi diferencially exprimovanými geny mírně vyšší: 56,4 % D oproti SK, 55,9 % MK oproti D a 59,5 % MK oproti SK. Nejvíce významně obohacený termín v rámci všech tří porovnání diferencially exprese je „polysacharidový katabolický proces“ (polysaccharide catabolic process, FDR = 1,48e<sup>-7</sup> pro DvMK; 7,60e<sup>-7</sup> pro DvSK; 1,52e<sup>-7</sup> pro MKvSK).

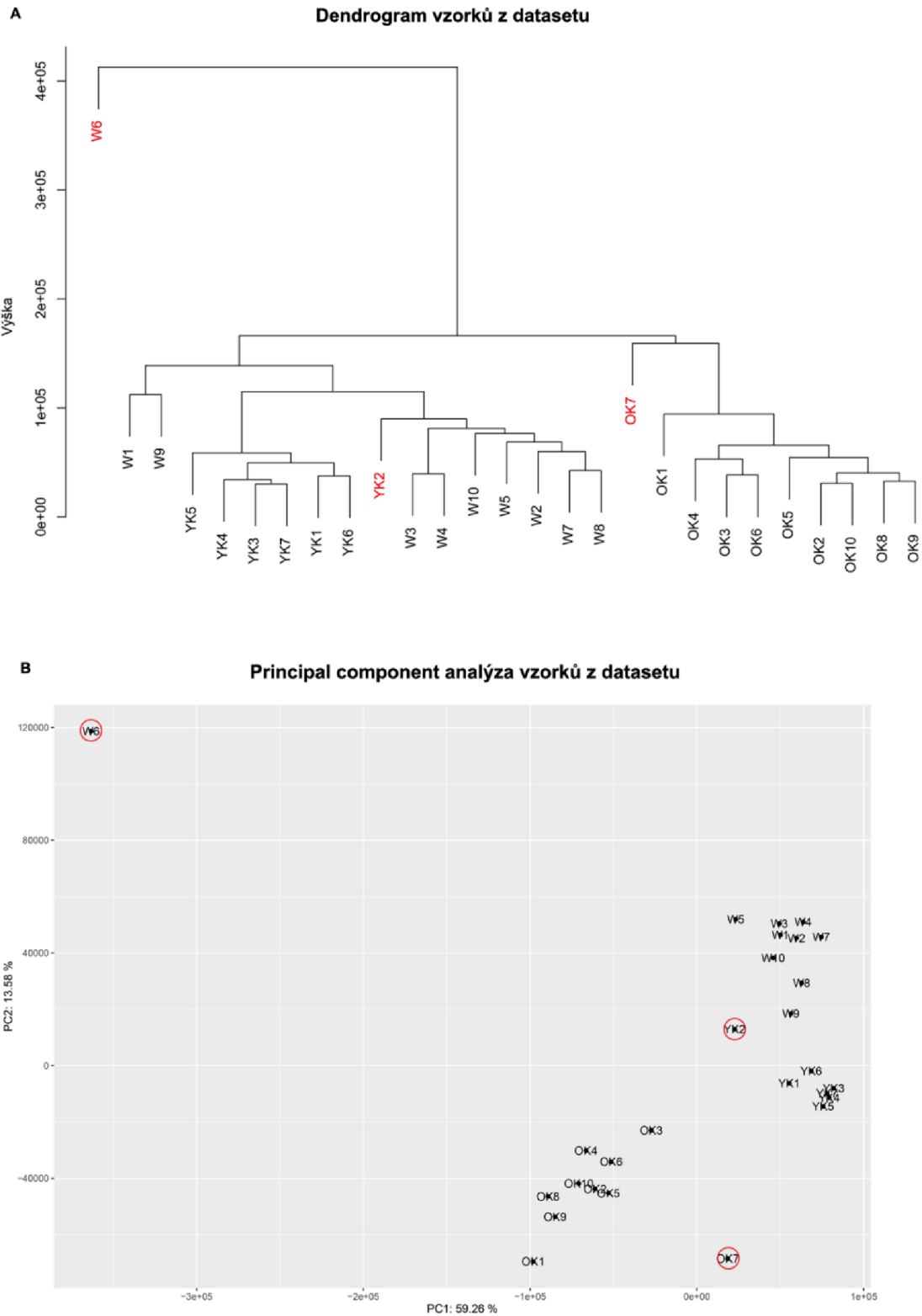
**Tab. XIV: Nejvíce obohacené termíny GO mezi diferencially exprimovanými geny 3 porovnávaných dvojic typů vzorků:** GO ID = id genové ontologie, P hodnota – Fisherův exaktní test, FDR – false discovery rate.

Porovnávané znaky	GO: ID	Termín	P hodnota	FDR
<b>Dělník Mladý král</b>	GO:0000272	polysaccharide catabolic process	2,75E-10	1,48E-07
	GO:0008152	metabolic process	6,01E-10	1,56E-07
	GO:0030245	cellulose catabolic process	1,63E-08	2,53E-06
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	3,68E-07	3,64E-05
	GO:0007052	mitotic spindle organization	4,54E-05	3,22E-03
	GO:0006096	glycolytic process	7,73E-04	4,31E-02
<b>Dělník Starý král</b>	GO:0000272	polysaccharide catabolic process	2,00E-09	7,60E-07
	GO:0030245	cellulose catabolic process	3,81E-09	9,63E-07
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	8,34E-09	1,26E-06
	GO:0008152	metabolic process	6,50E-08	7,04E-06
	GO:0006096	glycolytic process	3,92E-05	2,48E-03
	GO:0040003	chitin-based cuticle development	7,66E-05	4,15E-03
	GO:0008202	steroid metabolic process	1,94E-04	8,63E-03
	GO:0051017	actin filament bundle assembly	3,59E-04	1,51E-02
	GO:0006629	lipid metabolic process	5,32E-04	1,92E-02
	GO:0008299	isoprenoid biosynthetic process	5,88E-04	2,03E-02
	GO:0007586	digestion	1,18E-03	3,73E-02
<b>Mladý král Starý král</b>	GO:0000272	polysaccharide catabolic process	2,05E-10	1,52E-07
	GO:0030245	cellulose catabolic process	6,32E-10	2,35E-07
	GO:0005975	carbohydrate metabolic process	5,00E-08	7,43E-06
	GO:0008152	metabolic process	2,97E-07	3,15E-05
	GO:0006096	glycolytic process	1,03E-05	9,50E-04
	GO:0007017	microtubule-based process	1,25E-04	7,70E-03
	GO:0006094	gluconeogenesis	1,02E-03	3,99E-02

#### 4.4. Předzpracování datasetu genové exprese a tvorba vážené genové koexpresní sítě (WGCNA)

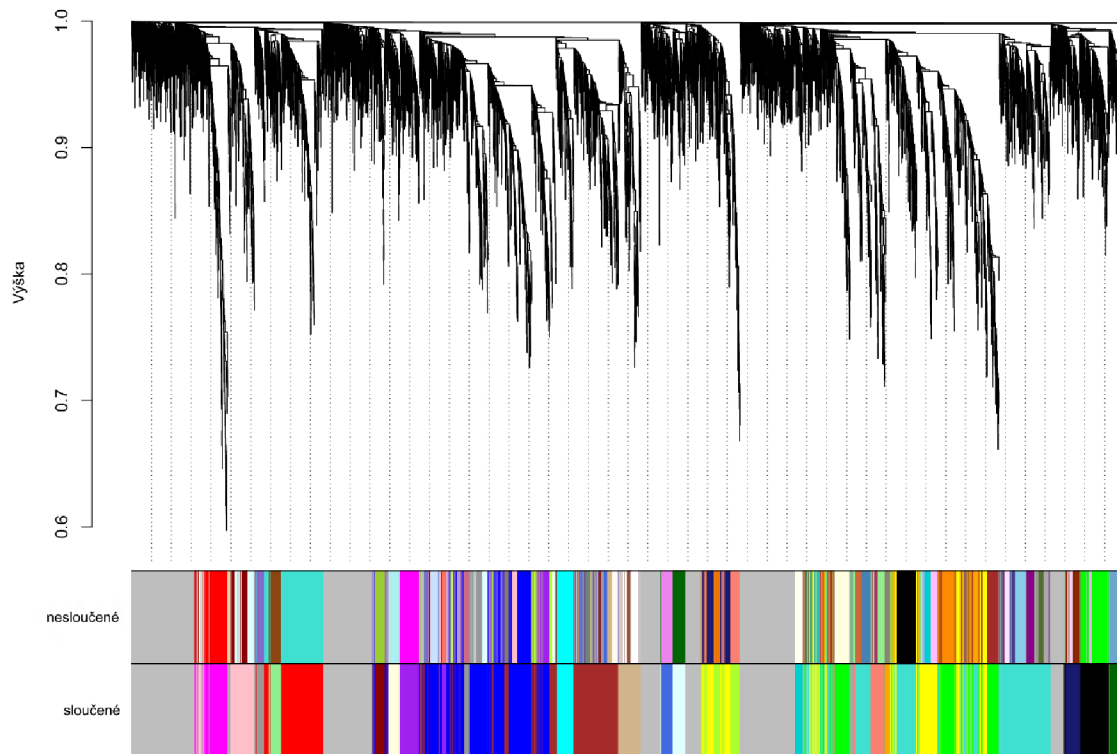
Sekvenací získané soubory dat byly dodatečně zpracovány ještě pomocí analýzy WGCNA, která dokáže odhalit skupiny, tzv. moduly, genů asociované se zkoumanými znaky a jejich vzájemné propojení.

Sekvenační analýzou bylo celkově zpracováno 27 vzorků rozdělených do tří skupin (10x SK, 10x D a 7x MK). Celkově bylo identifikováno 20944 typů transkriptů. Ze získaných surových dat byly za účelem odstranění šumu pozadí vyjmuty geny s velkým počtem chybějících hodnot a s příliš nízkou průměrnou expresí. Po těchto zásazích v souboru dat zůstalo 7511 genů. Pomocí hierarchického shlukování a PCA byly vzorky SK7, D6 a MK2 identifikovány jako vzorky obsahující příliš odlehle hodnoty a byly pro další analýzu ze souboru dat vyjmuty (Obr.6). Následně byly surové počty readů v souboru normalizovány a soubor dat použit pro konstrukci WGCNA. Před její konstrukcí bylo nejprve potřeba určit, skrze analýzu topologie sítě, optimálně měkkou prahovou hodnotu (soft-thresholding power), neboli hodnotu  $\beta$ , která by splňovala podmínku udržení bezškálové sítě. Ta byla stanovena na hodnotu 8 (Obr.7). Z dendrogramu hierarchického shlukování genů, za využití dynamického řezu stromu (dynamic tree cut) a dynamického sloučení (merged dynamic), bylo vytvořeno 26 různých genových modulů označených náhodnými barvami z použitého barevného schématu (Obr.8). 1729 genů se nepodařilo začlenit do žádného z modulů, a tak byly přiřazeny k modulu s označením Grey. Tento modul byl během následných analýz ignorován. Velikost modulů je v rozsahu od 24 (modul Orange) do 892 genů (modul Turquoise). Všechny moduly s přiřazenými geny jsou v příloze II.



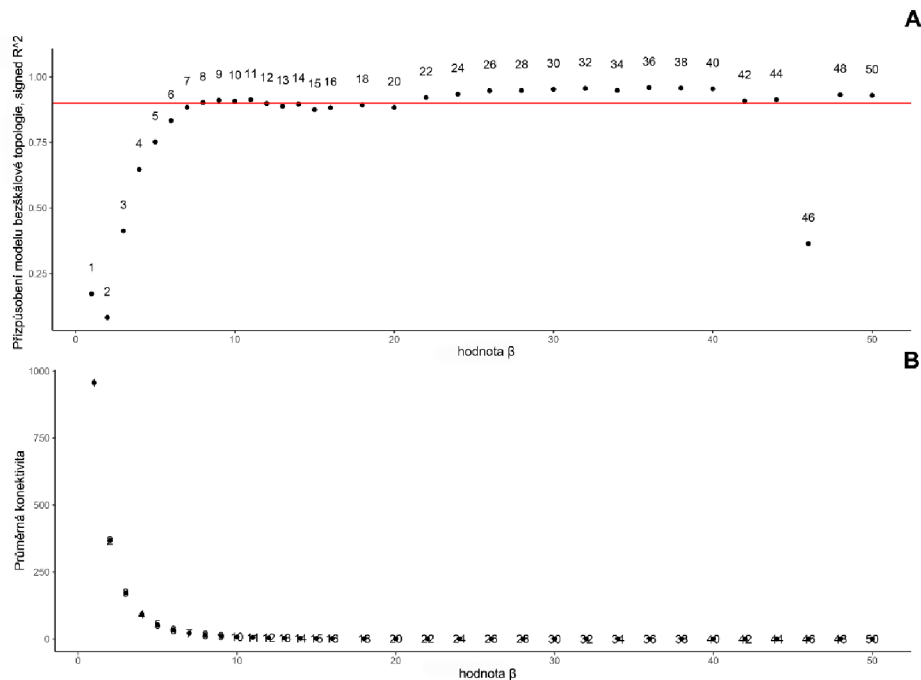
**Obr. 6: Identifikace vzorků obsahující odlehle hodnoty (tzv. outlier samples):** A. Dendrogram sestavený pomocí hierarchického shlukování vzorků v datasetu. Červeně vyznačené vzorky byly z datasetu vyjmuty. B. Analýza hlavní komponenty vzorků v datasetu. Červeně zakroužkované vzorky byly z datasetu vyjmuty. OK – starý král. YK – mladý král. W – dělník.

Shlukový dendrogram a přiřazené moduly



**Obr. 8: Shlukový dendrogram a přidělené moduly WGCNA analýzy:** Geny byly shlukovány na základě 1-TOM, neboli míry odlišnosti. Větve odpovídají modulům představujícím vysoce propojené skupiny genů. Moduly jsou reprezentovány barvami ve dvou spodních pruzích. První pruh představuje moduly před sloučením a spodní pruh po sloučení. Hranice pro sloučení modulů byla 1-TOM = 0,25. Identifikováno bylo celkem 26 modulů.

### Výběr optimální hodnoty $\beta$

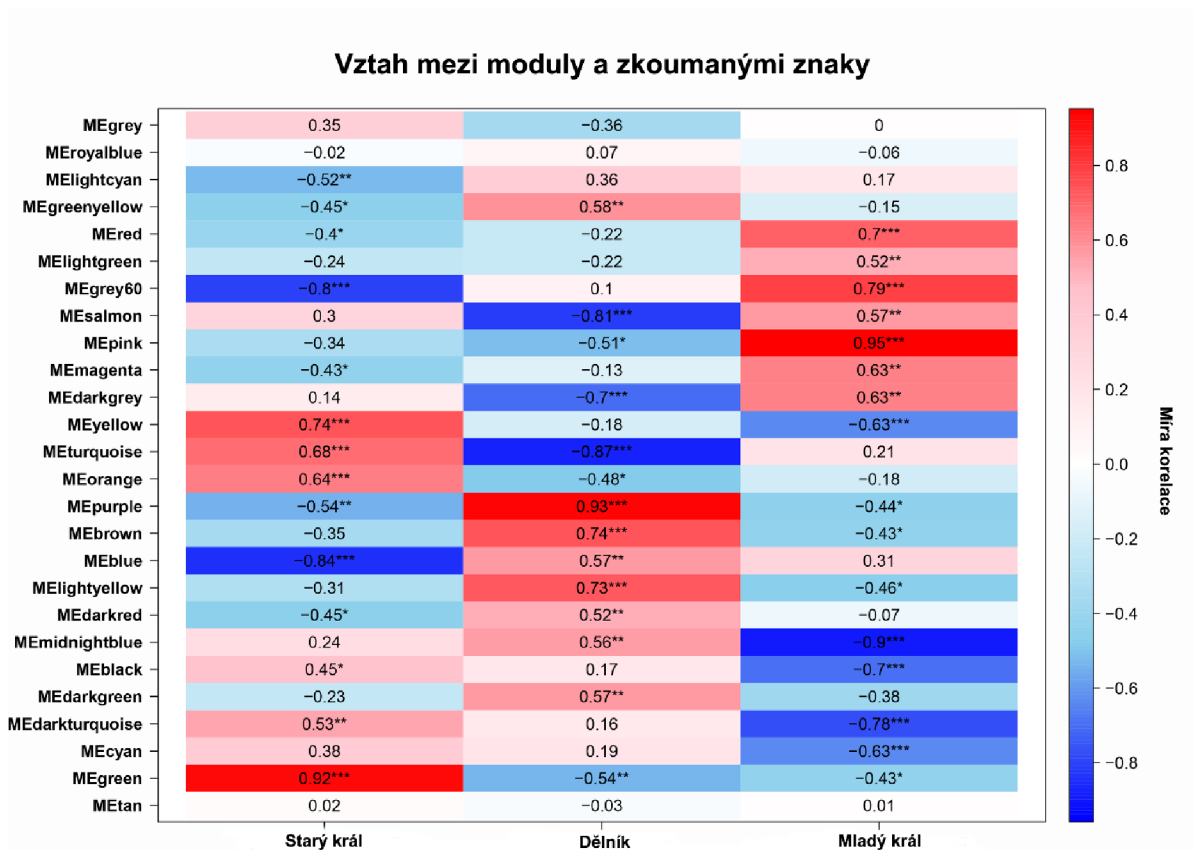


**Obr. 7: Identifikace optimální hodnoty  $\beta$ :** A. Porovnání indexu modelu bezškálové topologie a hodnoty  $\beta$ . B. Porovnání průměrné konektivity a hodnoty  $\beta$ . Zvolena byla hodnota 8, která jako první přesahuje hodnotu indexu 0,9.

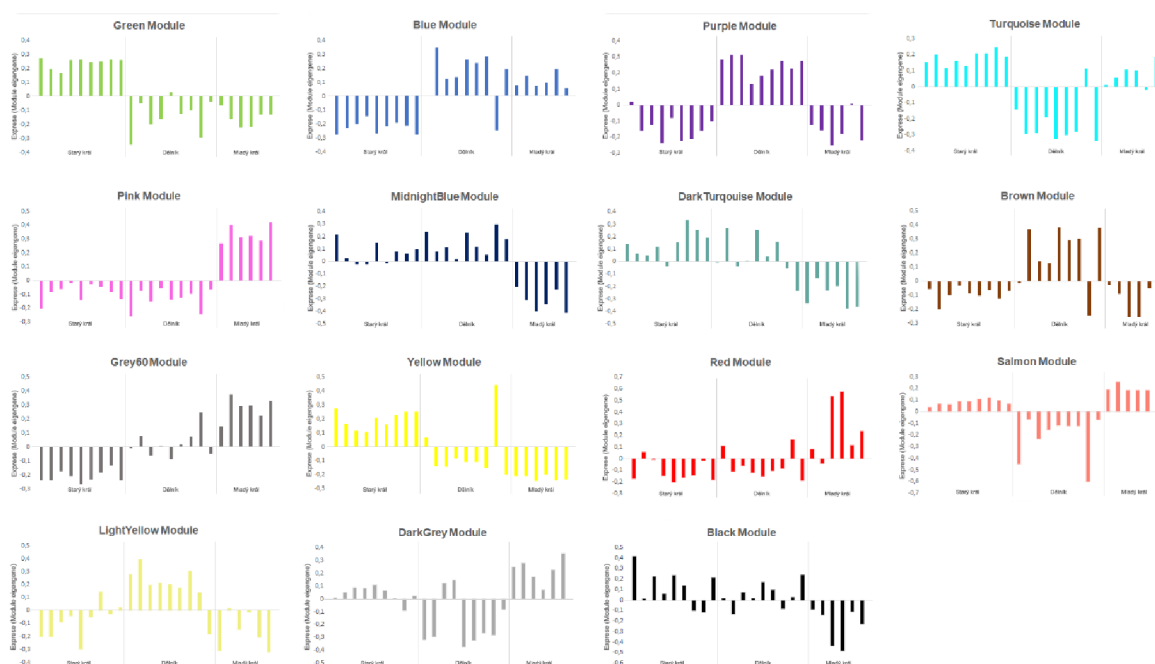
#### 4.5. Identifikace modulů asociovaných se stářím jedince či jeho kastovní příslušností.

Tzv. modul eigengene (ME) je první hlavní komponenta každého modulu, interpretována jako představitel míry exprese daného modulu<sup>573</sup>. Pro zjištění vztahu mezi jednotlivými moduly a mnou sledovanými znaky, tedy SK, D, MK, byla spočítána korelace mezi ME modulů a znaky (Příloha III). Následně bylo provedeno hierarchické shlukování a výsledky byly znázorněny pomocí heatmapy (Obr .9). Čtyři moduly, s označením Yellow, Turquoise, Orange, Green, byly pozitivně korelovány se znakem SK ( $r < 0,5$  a  $p < 10^{-2}$ ) a dva moduly (Grey60, Blue) byly s tímto znakem korelovány negativně ( $r < -0,5$  a  $p < 10^{-2}$ ). Se znakem D byly pozitivně korelovány tři moduly (Purple, Brown, Lightyellow) a negativně korelovány také tři moduly (Salmon, Darkgrey, Tuquoise). Se znakem MK byly pozitivně korelovány čtyři moduly (Red, Grey60, Pink, Yellow) a čtyři moduly korelovány negativně (Midnightblue, Black, Darkturquoise, Cyan). Vztah těchto modulů k daným znakům byl také znázorněn pomocí histogramů znázorňující ME profil exprese daných

modulů ve vztahu k jednotlivým vzorkům (Obr. 10). O pozitivně korelovaných modulech bylo uvažováno jako o těch, které podporují daný znak, a naopak o negativně korelovaných modulech jako o těch, které daný znak nepodporují.



**Obr. 9: Heatmapa korelace modů se znaky SK, MK a D:** Modul eigengene každého modulu byla korelována s každým ze znaků. Řady odpovídají modulům a sloupce znakům. Míra korelace každého porovnání je znázorněna jednak číselně a jednak barevně. Korelace dosahuje hodnot od -1 do +1. Čím zápornější hodnota tím sytější modrá barva a čím kladnější hodnota tím sytější červená barva. Statistický signifikance jednotlivých korelací je znázorněna pomocí znaku \*. \* -  $p < 10^{-1}$ . \*\* -  $p < 10^{-2}$ . \*\*\* -  $p < 10^{-3}$ .



**Obr. 10: Histogramy znázorňují profil modul eigengene exprese u vybraných modulů:** Osa y představuje hodnotu ME a osa x jednotlivé vzorky v datasetu. Vzorky na ose x jsou rozděleny do tří skupin podle znaku – starý král, mladý král, dělník.

#### 4.6. Analýza genové sítě vybraných modulů

U modulů vybraných v předchozí části byla podrobněji prozkoumána jejich relevance k danému znaku, a to skrze tři pro genové sítě typicky sledované vlastnosti GS, MM a K.in. Předpokladem je, že pokud má gen vysoké hodnoty ve všech těchto třech kritériích, tak pravděpodobně hraje významnou roli ve vztahu k danému znaku. Modul, jehož genové složení má hodnoty MM a K.in signifikantně korelované s hodnotami GS v daném znaku, má pro tento znak důležitou biologickou roli<sup>573,575,884</sup>. Všechny vybrané moduly, pozitivně či negativně korelované s některým z našich tří znaků, vykazovaly i signifikantní korelace jak mezi GS a MM, tak mezi GS a K.in (Příloha III). Pro každý znak byly vybrány dva moduly s nejvyšší hodnotou korelace a signifikance, a to jeden jako pozitivně korelovaný s daným znakem a druhý jako negativně korelovaný s daným znakem. Pro znak SK to byl modul Green (GS vs. MM:  $r = 0,88$ ,  $p = 2,3e^{-144}$ ; GS vs. K.in:  $r = 0,82$ ,  $p = 1,1e^{-108}$ ) a modul Blue (GS vs. MM:  $r = 0,68$ ,  $p = 5,6e^{-109}$ ; GS vs. K.in:  $r = 0,54$ ,  $p = 2,3e^{-61}$ ). Pro znak D modul Purple (GS vs. MM:  $r = 0,9$ ,  $p = 1,2e^{-64}$ ; GS vs. K.in:  $r = 0,82$ ,  $p = 5e^{-44}$ ) a modul Turquoise (GS vs. MM:  $r = 0,75$ ,  $p = 6,1e^{-162}$ ; GS vs. K.in:  $r = 0,69$ ,  $p = 4,5e^{-127}$ ). Pro znak



MK modul modul Pink (GS vs. MM:  $r = 0,94$ ,  $p = 3e^{-104}$ ; GS vs. K.in:  $r = 0,81$ ,  $p = 1,2e^{-52}$ ) a modul Midnightblue (GS vs. MM:  $r = 0,79$ ,  $p = 4,8e^{-24}$ ; GS vs. K.in:  $r = 0,73$ ,  $p = 4,7e^{-19}$ ). Pro znak SK to byl modul Green (GS vs. MM:  $r = 0,88$ ,  $p = 2,3e^{-144}$ ; GS vs. K.in:  $r = 0,82$ ,  $p = 1,1e^{-108}$ ) a modul Blue (GS vs. MM:  $r = 0,68$ ,  $p = 5,6e^{-109}$ ; GS vs. K.in:  $r = 0,54$ ,  $p = 2,3e^{-61}$ ). Pro znak D modul Purple (GS vs. MM:  $r = 0,9$ ,  $p = 1,2e^{-64}$ ; GS vs. K.in:  $r = 0,82$ ,  $p = 5e^{-44}$ ) a modul Turquoise (GS vs. MM:  $r = 0,75$ ,  $p = 6,1e^{-162}$ ; GS vs. K.in:  $r = 0,69$ ,  $p = 4,5e^{-127}$ ). Pro znak MK modul modul Pink (GS vs. MM:  $r = 0,94$ ,  $p = 3e^{-104}$ ; GS vs. K.in:  $r = 0,81$ ,  $p = 1,2e^{-52}$ ) a modul Midnightblue (GS vs. MM:  $r = 0,79$ ,  $p = 4,8e^{-24}$ ; GS vs. K.in:  $r = 0,73$ ,  $p = 4,7e^{-19}$ ).

#### 4.7. Funkční anotace a tzv. enrichment analýza vybraných genových modulů

U vybraných modulů byla provedena funkční anotace a tzv. enrichment, a to za účelem bližšího prozkoumání biologických funkcí těchto modulů. K analýze byl použit online nástroj DAVID<sup>581</sup>. Geny byly funkčně anotované pomocí GO: biologický proces, KEGG pathway a UP-KW: biologický proces. Nejvíce obohacené termíny ve všech třech kategoriích u každého modulu jsou zobrazeny v Tabulce XV. Kompletní enrichment analýza každého modulu je dostupná v příloze IV. Jako pozadí pro enrichment analýzu byl použit základní datový soubor genové exprese získaný sekvenací. Nevýhodou použitého souboru bylo, že pouze 48,5 % ze všech 20944 typů identifikovaných transkriptů se podařilo anotovat v proteinové databázi UniProt, takže jen k necelé polovině pozadí bylo možno přiřadit funkční anotace. Podíl pomocí UniProt anotovaných genů byl ale mezi vybranými moduly vyšší: od 71,9% v modulu Green po 87,3% v modulu Pink, v průměru se jednalo o  $78,68\% \pm 6,65$ . Vzhledem k tomu, že ale většina modulů neposkytla v enrichment analýze žádný nebo jen malý počet termínů, které by prošly přes statistické kritérium  $FDR < 0,05$ , nejsou výsledky této analýzy statisticky dostačující pro popsání biologických funkcí vybraných modulů. Nicméně tyto výsledky mohly být využity v kombinaci s dalšími výsledky a analýzami pro lepší orientaci v biologických vlastnostech modulů.

**Tab. XV: Nejvíce obohacené termíny GO, UP-KW a KEGG drah ve vybraných modulech:** GO = genová ontologie, UP-KW = UniProt Keywords, BF = biologická funkce. P hodnota – Fisherův exaktní test. FDR – false discovery rate.

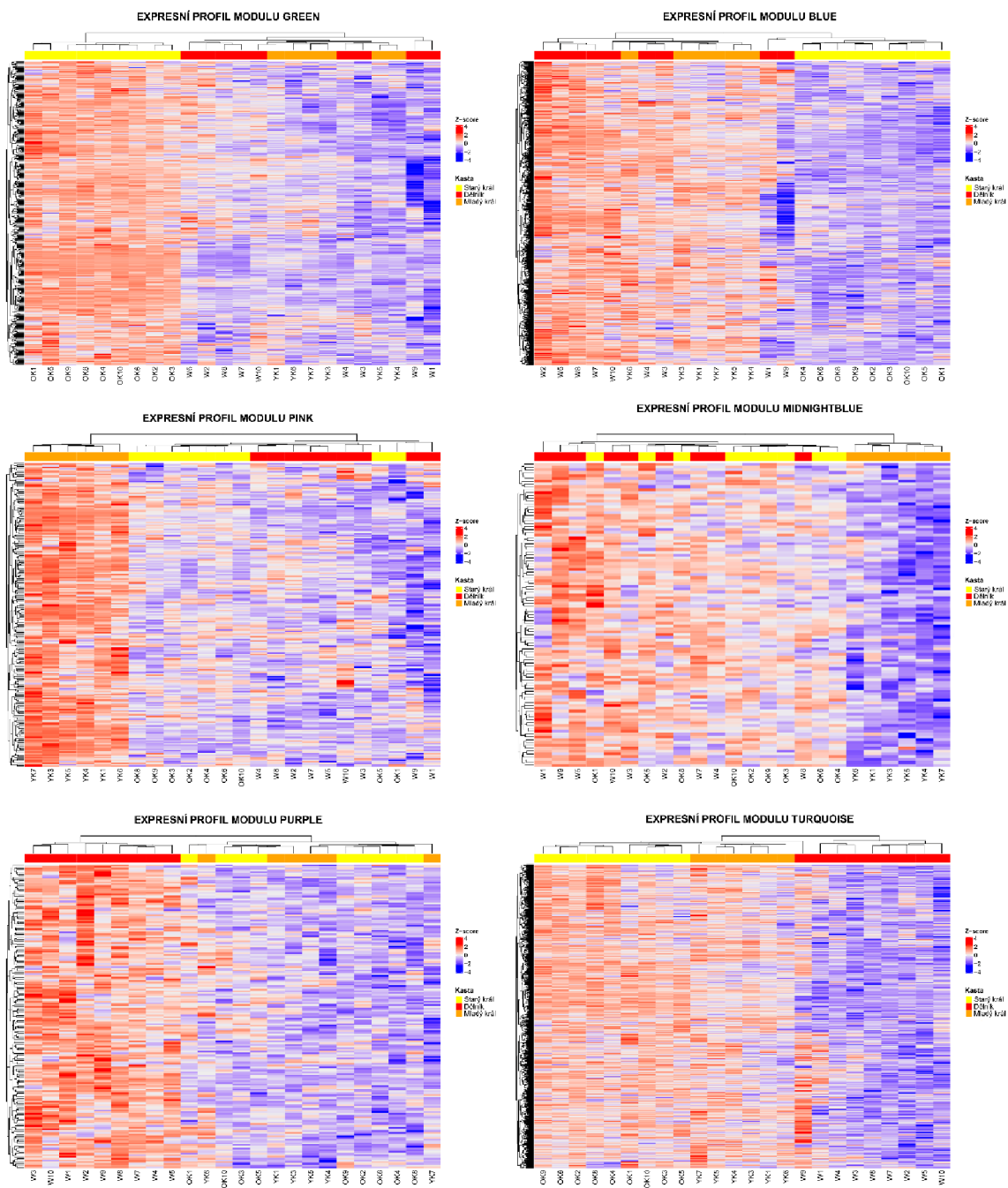
Znak	Korelace	Modul	Kategorie	Termin	P hodnota	FDR
Stary král	Pozitivní	Green	GO: BF	GO:0032981~mitochondrial respiratory chain complex I assembly	1,61E-07	2,09E-04
	Negativní	Blue	GO: BF	GO:0000398~mRNA splicing, via spliceosome	7,63E-04	1,00E+00
Dělník	Pozitivní	Purple	GO: BF	GO:0007411~axon guidance	1,64E-02	1,00E+00
	Negativní	Turquoise	GO: BF	GO:0031057~negative regulation of histone modification	4,13E-17	9,25E-14
Mladý král	Pozitivní	Pink	GO: BF	GO:0006096~glycolytic process	2,95E-03	1,00E+00
	Negativní	Midnightblue	GO: BF	GO:0006357~regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	4,33E-03	1,00E+00
Stary král	Pozitivní	Green	UP-KW: BF	KW-0679~Respiratory chain	2,61E-11	2,32E-09
	Negativní	Blue	UP-KW: BF	KW-0443~Lipid metabolism	7,71E-06	9,56E-04
Dělník	Pozitivní	Purple	UP-KW: BF	KW-0805~Transcription regulation	4,36E-05	2,18E-03
	Negativní	Turquoise	UP-KW: BF	KW-0648~Protein biosynthesis	5,65E-06	6,79E-04
Mladý král	Pozitivní	Pink	UP-KW: BF	KW-0443~Lipid metabolism	3,95E-03	2,61E-01
	Negativní	Midnightblue	UP-KW: BF	KW-0804~Transcription	5,20E-03	1,57E-01
Stary král	Pozitivní	Green	KEGG_PATHWAY	dme00190:Oxidative phosphorylation	3,01E-05	8,30E-03
	Negativní	Blue	KEGG_PATHWAY	ath01110:Biosynthesis of secondary metabolites	8,05E-04	5,01E-01
Dělník	Pozitivní	Purple	KEGG_PATHWAY	hsa05168:Herpes simplex virus 1 infection	5,01E-03	3,76E-01
	Negativní	Turquoise	KEGG_PATHWAY	dme03015:mRNA surveillance pathway	1,20E-02	1,00E+00
Mladý král	Pozitivní	Pink	KEGG_PATHWAY	mmu01100:Metabolic pathways	2,80E-03	4,79E-01
	Negativní	Midnightblue	KEGG_PATHWAY	dme00512:Mucin type O-glycan biosynthesis	5,17E-02	1,00E+00

#### 4.8. Charakterizace profilů genové exprese u vybraných modulů, vizualizace jejich genové sítě a identifikace hub genů.

U šesti vybraných modulů byl vizualizován profil jejich genové exprese napříč všemi 24 vzorky pomocí analýzy hierarchického shlukování (Obr. 11). Ke zvýšené či snížené expresi genů docházelo dle předpokladu vzhledem k pozitivní či negativní korelaci daného modulu vůči danému znaku. Ve všech případech byla genová exprese ostatních typů vzorků (oproti právě zkoumanému znaku) regulována v opačném směru, a to až na pár odchylek týkajících se především vzorků W1 a W9 v modulech Blue a Turquoise. Dále byly pro každý modul identifikované takzvané hub geny, tedy geny s největší konektivitou a korelací v síti daného modulu. Pro takové geny je obvykle typická vysoká hodnota GS pro daný zkoumaný znak a zároveň i vysoké hodnoty MM a K.in<sup>575</sup>. Z každého modulu tak byly vybrány tři skupiny genů obsahující 5 % genů s nejvyššími hodnotami GS, K.in nebo MM. Tyto skupiny byly vloženy do Vennova diagramu (Příloha III) a geny nalézající se ve všech třech skupinách najednou byly určeny jako hub geny daného modulu. Všechny zvolené geny pro všechny vybrané moduly jsou vypsány v Tabulce XVI. Také byly vytvořeny seznamy genů s největšími hodnotami GS a K.in pro daný modul a znak. Nejvýznamnější tři geny z těchto seznamů jsou také zobrazeny v Tabulce XVI. Hub geny byly těmito geny doplněny,

protože geny s vysokou genovou signifikancí nebo intramodulární konektivitou by mohly být stále biologicky významné pro zkoumaný znak, i když neprošly přes filtr vysoké hodnoty u všech tří kritérií najednou. Hodnoty diferenciální exprese (Log2FC) a vlastnosti vybraných Hub genů jsou zaznamenány v Tab. XVII-XXII.

Pro každý modul byla také v programu Cytoscape vymodelována část genové sítě, založená na hodnotách z TOM a hodnotách GS a K.in. Hub geny byly v sítích barevně zvýrazněny. Obrázky vymodelovaných sítí jsou v příloze III. Hodnoty GS a K.in kritérií se u genů ve vymodelovaných sítích pohybovaly v následujících rozmezích: Modul Green při TOM > 0,27 – hodnoty GS od 0,82 až 0,96 při průměru  $0,91 \pm 0,033$ ; hodnoty K.in od 25,78 až 60,44 při průměru  $43,7 \pm 6,64$ . Modul Blue při TOM > 0,2 – hodnoty GS od -0,25 až -0,96 při průměru  $-0,69 \pm 0,114$ ; hodnoty K.in od 9,26 až 78,69 při průměru  $41,11 \pm 11,88$ . Modul Purple při TOM > 0,085 – hodnoty GS od 0,33 až 0,98 při průměru  $0,73 \pm 0,099$ ; hodnoty K.in od 0,79 až 12,55 při průměru  $4,88 \pm 2,05$ . Modul Turquoise při TOM > 0,17 – hodnoty GS od -0,52 až -0,96 při průměru  $-0,76 \pm 0,084$ ; hodnoty K.in od 5,11 až 60,75 při průměru  $26,51 \pm 8,93$ . Modul Pink při TOM > 0,15 – hodnoty GS od 0,69 až 0,97 při průměru  $0,84 \pm 0,055$ ; hodnoty K.in od 4,26 až 24,68 při průměru  $13,78 \pm 3,17$ . Modul Midnightblue při TOM > 0,07 – hodnoty GS od -0,5 až -0,91 při průměru  $-0,72 \pm 0,065$ ; hodnoty K.in od 0,9 až 8,12 při průměru  $3,3 \pm 1,29$ .



**Obr. 11: Heatmapy znázorňující profily genové exprese u vybraných modulů.** Heatmapy byly vytvořené pomocí hierarchického shlukování. První řádek v grafu barevně symbolizuje příslušnost vzorků ke znakům (starý král, mladý král, dělník). Každý další řádek představuje jeden gen v modulu. Sloupce představují jednotlivé vzorky. Hodnoty exprese byly transformovány na standardizované skóre (Z-score). Čím kladnější hodnota Z-score tím sytější červená barva, čím zápornější hodnota tím sytější modrá barva. Kladné hodnoty představují zvýšenou expresi a záporné sníženou expresi. OK – starý král, YK – mladý král, W – dělník.

**Tab.XVI: Identifikované hub geny ve vybraných modulech: Top GS/K.in/MM – geny nalézající se v horních 5 % genů v rámci všech těchto tří charakteristik. TOP3 GS – geny s nejvyššími hodnotami GS, TOP3 K.in – geny s nejvyššími hodnotami K.in. Znaménka za názvy modulů znázorňují, zda jsou moduly pozitivně (+) či negativně (-) korelovány s daným znakem. GS – genová signifikance. K.in – intramodulární konektivita. MM – module membership. Databáze – databáze v které byl gen anotován. ID – id genu v příslušné databázi. evgLocus – geny které se nepodařilo anotovat.**

Znak	Modul	TOP GS/K.IN/MM				TOP3 GS				TOP3 K.IN			
		Databáze	ID	Název	Zkratka	Databáze	ID	Název	Zkratka	Databáze	ID	Název	Zkratka
STARÝ KRÁL	GREEN +	UniProt	evg_locus_188326.pl			UniProt	evg_locus_127256.pl						
		UniProt	Q79186	MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI1-B	MECOM1-B	UniProt	Q9V790	geranylgeranyl dihydrophosphate synthase 1	GGPS (S)	UniProt	Q96205	superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1
		UniProt	Q0V4H4	isochromate dehydrogenase Ia	IS3A3A	UniProt	Q9V790	thrombin inhibitor anaphalatin	THRN	UniProt	Q72883	MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI1-B	MECOM1-B
		UniProt	Q7W7K0	corn myoglobin haemoglobin synthase (H)	GGPS (H)								
		UniProt	Q95728	superoxide dismutase [Cu-Zn]	SOD1								
	BLUE -	UniProt	evg_locus_127256.pl										
		UniProt	Q95955	isocitrate-4	IC44								
		UniProt	Q13449	sermat thymosin kinase protein	SPKL								
		UniProt	P35502	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	ND1								
		UniProt	Q9U943	apolipoprotein A1	AP01apn1	UniProt	Q87237	hexamerin	HEX	UniProt	Q86043	apolipoprotein A1	AP01apn1
DĚLNÍK	PURPLE +	Pfam/UniProt	P13463	protein of unknown function	AP01apn1	UniProt	Q03388	lysosomal sialicidase	SA9P	UniProt	Q18817	glucosylated lysosomal beta 1	GLB1
		UniProt	Q44300	acyl-CoA dehydrogenase	ACDH105	UniProt	Q03641	allergen Cr-P (HLE)	ACR1 (HEX)	UniProt	Q44300	acyl-CoA dehydrogenase	ACDH105
		UniProt	Q92302	DNA-directed RNA polymerases I, II and III subunit RPAP6C3	RPAP6C3								
		UniProt	Q11044	glucosyltransferase beta 1	GLB1								
		UniProt	Q9B077	protein aminidase	AMN								
	TURQUOISE -	Pfam/UniProt	evg_locus_137116.pl										
		Pfam/UniProt	P09209	protein of unknown function									
		UniProt	P13695	phosphatidylinositol-binding protein 1	PIBP1								
		UniProt	Q66387	60S ribosomal protein L9	Rpl-9								
		UniProt	Q01273	Rim	RIM								
MLADÝ KRÁL	PINK +	UniProt	P14943	ribeggin 1	RIB1								
		UniProt	P13028	60S ribosomal protein S26	Rpl26								
		UniProt	Q9V617	cytochrome p450 304a1	CYP304A1	UniProt	Q9V617	CYP304A1	CYP304A1	UniProt	Q9V617	CYP304A1	CYP304A1
		UniProt	Q5XJQ5	exosome component 9	EXOSC9	UniProt	P70031	cholesterol/linoleic receptor	CCR	UniProt	Q8U056	exosome component 9	EXOSC9
		UniProt	COHBB2	glycosylated lysosomal membrane protein	GLMP	UniProt	COHBB2	glycosylated lysosomal membrane protein	GLMP	UniProt	COHBB2	glycosylated lysosomal membrane protein	GLMP
	MILK -	UniProt	P70031	cholesterol/linoleic receptor	CCR	UniProt	Q0918	CD44					
		UniProt	Q75056	low-density lipoprotein receptor-related protein 4	LRP4								
		Pfam/UniProt	PF04148	sulfur transport domain	Sulf_transport								
		UniProt	P23352	amino acid	AMC051	UniProt	Q87240	protein disulfide isomerase 2 homolog	CDIM2	UniProt	P54145	positive ammonium transporter 1	AMT-1
		UniProt	Q7C7M5	ATP citrate lyase	ACL7	UniProt	Q86028	solute carrier organic anion transporter family 4a2	SLC04A2	UniProt	Q18048	heparan-alpha-glucosaminidase h-acetyltransferase	H3S3AAT
STARÝ KRÁL	PINK +	UniProt	Q6CQ38	transmembrane protein 135L1 homolog	TMEM135	UniProt	Q82933	trehalase transporter 6mTRET1	TRET1	UniProt	P23352	solute carrier organic anion transporter family 4a1	SLC04A1
		UniProt	Q18053	EGF-unlike protein ligase 1NF170	EGF-170								
		UniProt	evg_locus_643721.pl										
		UniProt	Q86028	solute carrier organic anion transporter family 4a2	SLC04A2								
		UniProt	Q12060	protein disulfide isomerase 2 homolog	CDIM2								
	MILK -	UniProt	Q61763	serine O-acetyltransferase 1	SOAT1								
		UniProt	Q9V4M8	oligofactin 4	OF4								
		UniProt	Q08866	solute carrier family 22, member 1	SLC22A1	UniProt	Q08866	spermine oxidase	SMOX	UniProt	Q08866	solute carrier family 22, member 1	SLC22A1
		UniProt	Q07707	serine O-acetyltransferase 4	SOAT4	UniProt	Q08966	solute carrier family 22, member 1	SLC22A1	UniProt	Q07707	serine O-acetyltransferase 4	SOAT4
		UniProt	Q08164	EGF-unlike protein ligase 6	EGF6								
MLADÝ KRÁL	MILK -	UniProt	Q08678	zinc finger protein 543	ZNF543	UniProt	Q08678	zinc finger protein 543	ZNF543	UniProt	Q08678	zinc finger protein 543	ZNF543
		UniProt	Q21896	lobain, alpha 3d	TubA1D	UniProt	Q08685	actin-like family zinc finger 1	ACTL1	UniProt	Q05186	thymine nucleoside in 3S	TTN3-S

**Tab. XVII: TOP Hub geny modulu Purple pozitivně asociovaného s D: Signifikantní hodnoty diferenciální exprese (Log2FC ≥ 1,5849 nebo ≤ -1,5849) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král**

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q9VG17	CYP304a1	Cytochrom p450 304a1	3,84964	3,52721	0,32242	Pravděpodobně má roli v syntéze ecdysteroidů <sup>882,883</sup> .
Q5XJQ5	EXOSC9	Exosome component 9	0,81395	0,65002	0,16393	Nekatalytická komponenta RNA exozomálního komplexu, účastní se zpracování a degradace různých druhů RNA. V jádře má roli v maturaci rRNA, snRNA a snoRNA. V cytoplasmě degraduje nestabilní mRNA a je součástí dráhy zabraňující translaci aberantních mRNA <sup>885–887</sup>
COHBB2	GLMP	Glycosylated lysosomal membrane protein	0,66628	0,61976	0,04652	Ochrana lysozomálního transportéru MFSD1 před jeho degradací lysozomem a lokalizace MFSD1 na lysozomu <sup>888</sup>
P70031	CCR	Cholecystokinin receptor	1,22540	0,92564	0,29976	Receptor cholecystokininu aktivující fosfatidylinositol-vápníkový systém sekundárních posílů. U obratlovců moduluje chování během krmení skrze centrální a periferní nervovou soustavu. Ovlivňuje sekreci pankreatických enzymů a kontrakce břišního hladkého svalstva <sup>889–894</sup> . Drozofilí ortolog ovlivňuje lokomoci a růst neuromuskulárních spojů. Má vliv na funkci střev, trávení, hyperaktivitu či agresivitu <sup>895–897</sup> .

O75096	LRP4	Low-density lipoprotein receptor-related protein 4	0,89613	0,79873	0,09740	U savců spojen s modulací WNT a tvorbou a údržbou neuromuskulárních spojů <sup>898</sup> . Drozofilí ortolog je obohacen v membránách presynaptických terminálů a reguluje synaptickou organizaci v olfaktorických okruzích <sup>899</sup> .
PF04143	Sulf_transp	Sulphur transport domain	0,78384	0,62455	0,15929	Součást membránových proteinů transportujících síru obsahující molekuly <sup>900</sup>

**Tab. XVIII: TOP Hub geny modulu Turquoise negativně asociovaného s D:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese ( $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q61263	SOAT1	Sterol O-acyltransferase 1	-2,57454	-1,13689	-1,43764	Tvorba cholesterol esterů <sup>879,880</sup> .
Q172W0	COMM2	Protein commissureless 2	-2,07537	-1,97165	-0,10372	Role ve vývoji nervové pásky hmyzu <sup>901</sup> .
P23352	ANOS1	Anosmin 1	-1,97066	-1,16759	-0,80306	U obratlovců slouží jako chemoatraktant olfaktorických epitelových buněk <sup>902,903</sup> .
Q9VMM6	OBST-E	Obstructor-E	-1,88496	-0,97504	-0,90992	Chitin vazebný protein důležitý pro larvální vývoj hmyzí kutikuly a tvaru těla <sup>904</sup> .
Q6GQ39	TMEM135	Transmembrane protein 135 L homolog	-1,69649	-0,80066	-0,89582	Ovlivňuje mitochondriální metabolismus skrze regulaci rovnováhy mezi mitochondriální fúzí a mitochondriálním štěpením, reguluje formaci lipidických kapének, metabolismus mastných kyselin a funkci peroxizomu <sup>147,905,906</sup> . Nefunkční mutace vede u myši rohovky k fenotypovým změnám spojených se stářím a vyšší senzitivitě k oxidačnímu stresu <sup>905</sup> . U <i>Caenorhabditis elegans</i> je součástí konzervované genetické sítě ovlivňující tukové zásoby a regulující dlouhověkost. Delece tohoto genu vedla ke snížení tukových zásob, redukci mitochondriálního akčního potenciálu a ke snížení délky života. Nadměrná exprese naopak vedla k navýšení délky života při chladem vyvolaném stresu. Zvýšená exprese byla spojena i se zvýšenou regulací proteinu Daf16 (FOXO) <sup>906</sup> .
Q8K078	SLCO4A1	Solute carrier organic anion transporter family 4a1	-1,49360	-1,40732	-0,08628	Transportuje organické anionty, například hormony <sup>907,908</sup> .
Q2TCH3	ACLY	ATP citrate lyase	-1,24682	-1,14140	-0,10542	Katalyzuje štěpení citrátu na oxaloacetát a acetyl-CoA, který je dále využíván při syntéze lipidů <sup>909,910</sup> .
Q28DS3	RNF170	E3 ubiquitin-protein ligase RNF170	-0,87903	-0,70570	-0,17333	U obratlovců označuje k degradaci receptor inositol-1,4,5,-trifosfátu, který při navázání ligandu spouští vypuštění vápníku z endoplasmatického retikula <sup>911</sup> . Tento receptor má roli v endoplasmatickým retikulem stimulované apoptóze, protože vypuštěný vápník může aktivovat pro-apoptickou CaM kinázu II <sup>912</sup> . Drozofilí ortolog tohoto receptoru ovlivňuje sekreci ecdysonu a odpovídá na nutriční stress redukcí sekrece adiponekinetinu skrze CaM II. Reguluje lipidické zásoby a ovlivňuje příjem vápníku mitochondriemi během oxidačního stresu <sup>913-916</sup> .
A9ZSY3	TRET1	Facilitated trehalose transporter TRET1	-1,13429	-0,92929	-0,20500	Transport sacharidu trehalózy hemolymfou z tukového tělesa do tkání spotřeby <sup>917</sup>
P54145	AMT-1	Putative amonium transporter 1	-2,39652863	-1,28941	-1,10712	Příjem amoniaku. U drozofilí pravděpodobně role v olfaktorické detekci amoniaku <sup>918</sup> .
Q3UDW8	HGSNAT	Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase	-2,17166	-0,8230	-1,34864	Účastní se zpracování a transportu heparinu v lysozomech <sup>919</sup>

**Tab. XIX: TOP Hub geny modulu Green pozitivně asociovaného s SK:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese ( $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q9WTN0	GGPS (3)	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase / Farnesyl diphosphate synthase (3)	-3,19581	-0,24741	-2,94841	V mevalonátové dráze se nacházejí v jakémsi bodě větvení, protože jejich produkty mohou dávat za vznik cholesterolům (ne u hmyzu), isoprenoidům, a nebo Juvenilnímu hormonu <sup>527</sup>
Q9VWH4	IDH3A	Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha	-2,80470	-1,08897	-1,71573	Katalytická podjednotka enzymu katalyzujícího dekarboxylaci isocitrátu na alfa-ketoglutarát v rámci Krebsova cyklu <sup>920</sup> .
P08228	SOD1	Superoxid dismutase [Cu-Zn]	-2,38821	1,87022	-4,25843	Antioxidant <sup>674</sup> .
Q99055	LCC4	Laccase-4	-2,23747	-0,08267	-2,15480	Degradace ligninu a detoxifikace z ligninu odvozených produktů <sup>921</sup> .
B7ZRM8	MECOM-B	MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI2-B	-1,94544	-0,10761	-1,83783	Transkripční regulátor negativně i pozitivně ovlivňující exprese cílových genů. U savců je znám jako onkogen s rolí ve vývoji organismu a buněčné proliferaci a diferenciaci <sup>922,923</sup> . Ovlivňuje apoptózu skrze negativní regulaci MAPK/JNK a TGF-beta signalizací <sup>924,925</sup> . Pravděpodobně má také schopnost zvyšovat regulaci buněčného cyklu <sup>923</sup> . U <i>C. elegans</i> koordinuje zastavení buněčného cyklu během G1 fáze <sup>926</sup> .
B1WAR9	GWL	Serine/threonine kinase greatwall	-1,53014	-0,03589	-1,49425	Má klíčovou roli během vstupu do a udržení M fáze buněčného cyklu. Inaktivací protein fosfatázy PP2A nepřímo udržuje vysokou aktivitu cyklinB1-CDK1 <sup>927-929</sup> .
P33502	ND1	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	-0,85420	0,29678	-1,15098	Důležitá podjednotka NADH dehydrogenázy, tedy komplexu I mitochondriálního respiračního řetězce, který zajišťuje přenos elektronů z NADH na ubiquinon <sup>930</sup>
PF10731	THRIN	Thrombin inhibitor anophelin	-3,54466	1,41921	-4,96387	Proteinová rodina známá ze slin komárů. Jsou to inhibitory trombinu, tedy peptidázy účastníci se koagulační kaskády <sup>931</sup> . Je možné, že by v tomto případě mohli být součástí látek produkovaných obrannými žlázami termitů <sup>932</sup>

**Tab. XX: TOP Hub geny modulu Blue negativně asociovaného s SK:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese ( $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnávané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q70KH2	GBA	Acid beta-glucosidase	6,41072	1,93010	4,48062	Hydrolyza glukosylceramidů v lysozomu – součást autofagického procesu <sup>590-593</sup> . Absence genu vedla k mitochondriálním dysfunkcím, pravděpodobně vinou absence mitofágie <sup>594</sup>
O44390	ACD11DS	Acyl-CoA Delta(11) desaturase	2,91984	-0,83509	2,08474	Tvorba nenasycených mastných kyselin <sup>855</sup>
Q9U943	APOphoriny	Apolipoporphins	1,84912	-0,1370	1,71210	Formují lipoproteiny <sup>858-860</sup> .
P10493	NID1	Nidogen-1	1,50908	0,60538	0,90369	Role v interakci mezi buňkou a extracelulární matrix <sup>933,934</sup>
Q923G2	RPABC3	DNA-directed RNA polymerases I, II and III subunit RPABC3	1,23720	0,13566	1,10153	Podjednotka RNA polymeráz <sup>935</sup> .

Q9VZ23	RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	1,16303	0,31067	0,852364	Role v importu a exportu RNA a proteinů z nebo do jádra <sup>936–938</sup> . Jaderná forma má význam ve správném sestavení mitotického vřeténka <sup>939–941</sup> .
Q9BXJ7	AMN	Protein amnionless	1,03891	-0,29495	1,33387	Role v sestavení endocytického receptoru tvořeného komplexem AMN-CUBN. Tento komplex stojí za absorpcí vitamínu B12 ve střevech <sup>942–944</sup> .
P13696	PEBP1	Phosphatidylethanolamine binding protein 1	0,70369	0,02997	0,67372	Inhibitor serin proteáz jako je trombin a chymotrypsin <sup>945</sup> . Negativní regulátor MAPK/ERK signalizace <sup>946</sup> .
P13008	RpS26	40s ribosomal protein S26-A	0,75861	0,14070	0,61791	Komponent malé ribozomální podjednotky <sup>748</sup> .
Q963B7	RpL9	60s ribosomal protein L9	0,63213	0,22441	0,40773	Komponent velké ribozomální podjednotky <sup>748</sup> .
Q17127	HEX	Hexamerin	8,59519	3,44080	5,15439	Larvální zásobní proteiny <sup>832</sup> . U termitů navíc známo, že se jejich exprese zvyšuje v odpovědi na morfogenní JH a že pravděpodobně potlačují JH dependentní diferenciaci dělníků na vojáky <sup>462,463</sup> . Jejich exprese v odpovědi na JH je známá i u včel a mravenců, s tím že pravděpodobně sekvstrují JH v hemolymfě a tím omezují jeho biologickou dostupnost <sup>470,833</sup> .
Q25641	ACrPI (HEX)	Allergen Cr-PI (HEX)	7,82699	-0,59765	8,42465	Larvální zásobní protein švábů, pravděpodobně také Hexamerin <sup>834</sup>
Q03168	LASP	Lysosomal aspartic protease	1,02732	-0,03418	1,06150	Lysozomální proteáza. U <i>Aedes aegypti</i> se pravděpodobně účastní degradace proteinů stojících za syntézou vitellogeninu po ukončení vitellogenese <sup>947</sup> .

**Tab. XXI: TOP Hub geny modulu Pink pozitivně asociovaného s MK:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese ( $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
O08966	SLC22A1	Solute carrier family 22 membr 1	-2,05370	-3,90424	1,85053	Transportér organických kationtů jako jsou biogenní aminy, polyaminy a kationtové drogy a xenobiotika <sup>948–950</sup> . Také transportuje acyl-karnitin <sup>951</sup> .
Q6T707	SCDS4	Stearoyl-CoA desaturase 4	-0,96294	-2,36289	1,39995	Tvorba nenasycených mastných kyselin <sup>872,873</sup> .
Q5ZJR8	ELOVL6	Elongation of very long chain fatty acids protein 6	-0,05702	-1,12968	1,07266	Součástí elongačního cyklu dlouhých nasycených i nenasycených FA <sup>952,953</sup> .
Q99K82	SMOX	Spermine oxidase	-1,08819	-2,60656	1,51836	Flavoprotein katalyzující oxidaci sperminu na spermidin. Obecně má důležitou roli v regulaci koncentrací intracelulárních polyaminů <sup>954,955</sup> . Polyaminy a zvláště spermidin jsou kladně asociovány s dlouhověkostí a s dlouhověkostí asociovanými mechanismy jako autofágie, ochrana před oxidačním stresem, redukce zánětu a další <sup>956–960</sup> .
Q8R164	BPHL (2)	Biphenyl hydrolase-like protein [1]	-0,97838	-1,81427	0,83589	Je možné že má roli v detoxifikačních procesech alfa-aminokyselinových esterů <sup>828</sup> .



**Tab. XXII: TOP Hub geny modulu Midnightblue negativně asociovaného s MK:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese (Log2FC  $\geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou barevně zvýrazněny. Zvýšená exprese u prvního typu vzorku z porovnané dvojice je zvýrazněna červeně, zvýšená exprese u druhého typu zeleně. ID – id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam), D – dělník, MK – mladý král, SK – starý král

ID	Zkratka	Název	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Funkce
Q08ER8	ZNF543	Zinc finger protein 543	0,62222	1,88863	-1,266401	Pravděpodobně role v transkripci genu TRIM28 <sup>961</sup> . TRIM28 inhibuje působení apoptických faktorů E2-F1 a p58 <sup>962,963</sup> . Zároveň je součástí odpovědi na poškození DNA a lokalizuje se na místech DNA zlomů <sup>964</sup> .
Q2HJ86	TubA1D	Tubulin alpha-1D chain	0,11147	1,90673	-1,79525	Stavební prvek mikrotubulů <sup>770</sup>
Q99M85	SCRT1	Transcriptional repressor scratch 1	0,26957	1,02486	-0,7552943	Transkripční faktor s vlivem především na nervovou diferenciaci <sup>965,966</sup> .
Q05192	FTZF1-β	Nuclear hormon receptor FTZ-F1 beta	0,18895	0,66604	-0,47708	Kofaktor proteinu ftz, jemuž umožňuje vazbu na DNA <sup>967,968</sup> . Ftz je homeoboxový transkripční faktor aktivující segment-polarity geny <sup>969</sup> . Také má roli ve vývoji centrálního nervového systému a gonád <sup>970,971</sup> .

## 5. Diskuze

V rámci mé magisterské práce jsem porovnával genovou expresi tří skupin termitů *P. simplex* (dělníků, starých a mladých neotenických králů) s cílem pomoci identifikovat faktory, které mohou hrát roli při determinaci rozdílů v délce života termitích kast u tohoto termitého druhu. Přístupem byla metoda RNAseq, s následnou anotací získaných transkriptů a kvantifikace diferenciální exprese pomocí metody DSeq2. Získaná data byla analyzována pomocí metody GO enrichment a WGCNA, a to s cílem odhalit koexpresní sítě mezi exprimovanými geny a identifikovat moduly s testovanými charakteristikami a v rámci těchto modulů identifikovat tzv. hub geny, tj. geny s nejvyšším počtem interakcí v koexpresní síti jednotlivých modulů. Při analýze jednotlivých diferenciálně exprimovaných genů jsem se zaměřoval na diferenciálně exprimované geny hrající roli v buněčných pochodech potenciálně spjatých s regulací dlouhověkosti a stárnutí, tj. autofágie a apoptóza, oxidační stres, imunita, integrita genomu, proteinová homeostáze, regulace buněčného cyklu, detoxikace, aktivita juvenilního hormonu a metabolismus lipidů.

Autofágie a mitofágie jsou obecně považovány za významné přispěvatele k prodloužení délky života<sup>118,972–975</sup>. Nicméně, aktivita těchto procesů musí být velmi jemně regulovaná, protože jejich přílišná aktivita je spjata s řadou negativních efektů<sup>976,977</sup>. Co se týče pozitivních regulátorů autofágie/mitofágie, exprese těchto genů v mé studii je zvýšená

u dělníka, naopak snižená u starých králů. Jde o pět z osmi do této kategorie zařazených proteinů a zároveň o proteiny s vysokou diferenciální expresí. Výjimkou je protein Arsb, jehož gen má mírně zvednutou expresi u MK, ale mezi SK a D není rozdíl. Nicméně, o tomto proteinu je známo jen to, že se jeho úroveň zvedá během autofágie v lysozomech a další informace o jeho zapojení do autofágie nejsou známy<sup>600</sup>. V případě Chk2 a usp30 je exprese srovnatelná u D a MK, s tím, že u těchto dvou skupin je vyšší než u SK. Oba tyto proteiny působí proti autofágii a mitofágii a Chk2 zároveň podporuje apoptózu<sup>597-599,607,613</sup>. V rámci modulu Pink, který je pozitivně asociovaný s MK, se nalézají proteiny SMOX a TMEM135. SMOX, který oxiduje spermin na spermidin, obecně hraje roli v regulaci koncentrací intracelulárních polyaminů. TMEM135 se zase může podílet na transportu polyaminů<sup>954,955</sup>. Spermidin i ostatní polyaminy jsou pak známy pro svůj pozitivní vliv na autofágii<sup>956-960</sup>. Takže jejich zvýšená exprese pravděpodobně naznačuje zvýšenou autofágickou aktivitu u MK. Souhrnně tedy, autofagický proces je nejméně aktivní u starých králů, naopak nejvíce podpořen u dělníků.

V rámci negativní regulace apoptotického procesu je větší polovina diferenciálně exprimovaných genů (sedm z dvanácti) nejvíce exprimovaná u dělníků, a naopak nejméně u starých králů. Čtyři z nich (DJ1A, ANT2BP, GAPDH a CGL) jsou zároveň nejvíce diferenciálně exprimované proteiny ve skupině autofágie. Další dva jsou 14-3-3 proteiny, které by se mohly také zařadit i do skupiny autofágie, protože mohou negativně regulovat autofágii regulací aktivity proteinu TOR<sup>640</sup>. Sedmým je NINJ potlačující expresi p53<sup>646,647</sup>. Diferenciální exprese DHCR24 a Ucp2 je pak ve formě  $D > MK = SK$  a Chp1 ve formě  $D = SK > MK$ . Zbývá SOD1 je pak nejvíce exprimovaná u SK a kináza AURKA u MK. Pokud přihlédneme k modulu Turquoise, který je negativně asociovan s D, nalézáme zde gen RNF170. Jeho protein může apoptózu negativně regulovat skrze degradaci receptoru inositol-1,4,5-trifosfátu<sup>911,912</sup>. Naopak diferenciálně exprese genů ve skupině pozitivní regulace apoptického procesu již není tak jednoznačná. Ndor1 vykazuje také vzorec  $D > MK > SK$ , dále APP mírně vykazuje vzorec  $D > SK = MK$  a k tomu kináza Chk2, Sirt3 a SINA-TRAF vzorec  $D = MK > SK$ . Ovšem Sirt3, který funguje jako centrální regulátor homeostáze mitochondriálních membrán, může fungovat i proti-apopticky<sup>619,621-623</sup>. Oproti tomu jsou u MK zvednuté exprese RACK1, CKAP2\_C a MKRN1\_C a u SK exprese RBM25 a RNF144. Z pohledu na tyto výsledky se nedá tedy jednoznačně říci, zda je pro-apoptická regulace vyšší nebo nižší u D či MK. Nejvíce diferenciálně exprimovaný je z těchto proteinů ndor1 (Log2FC DvsSK 7,97, DvsMK 4,13), a to s největší expresí u D.

Ovšem ostatní více u D exprimované proteiny se od MK už do takové míry neliší. V modulu Midnightblue, negativně asociovaném s MK, je navíc přítomný protein ZNF543, který může skrze transkripci genu TRIM28 inhibovat apoptické faktory E2-F1 a p58<sup>961-963</sup>.

Apoptóza plní důležitou úlohu v udržení integrity a homeostáze tkání, protože odstraňuje z organismu defektní a nevhodně se chovající buňky a plní tedy roli při tumorsupresi a obnově neustále se dělících tkání, jako je například střevní epitel a plicní epidermis. Apoptická aktivita během stárnutí není však stále zcela vysvětlena a zdá se, že může mít pro organismus jak benefiční, tak škodlivé následky<sup>978-981</sup>. Nicméně, celková aktivita jak apoptózy, tak autofágie ve stárnoucích organismech klesá a zvyšuje se tak riziko hromadění defektních buněk<sup>603,982,983</sup>. Snížená aktivita těchto procesů může být spjata také s nástupem buněčné senescence ve stárnoucí tkáni. Senescence totiž mimo jiné funguje jako protektivní mechanismus nevratně zastavující růst defektních buněk, např. v odpovědi na onkogenetickou aktivitu<sup>984,985</sup>. Senescentní buňky jsou rezistentní k programované buněčné smrti a je tedy otázkou, zda za nízkou apoptickou aktivitou během stárnutí nestojí právě vyšší zastoupení senescentních buněk<sup>982,986,987</sup>.

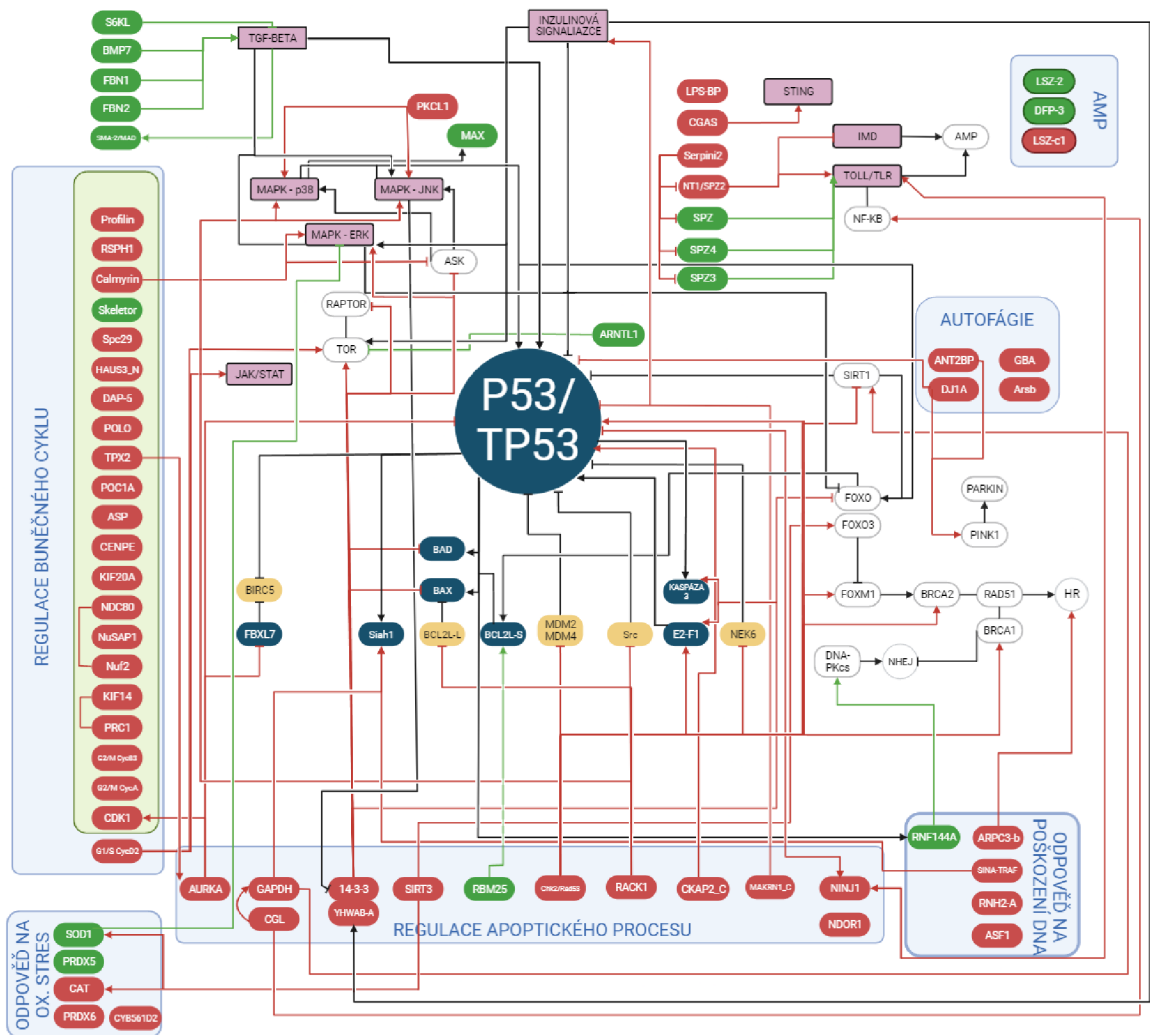
Škodlivé efekty apoptózy lze pozorovat v případě post-mitotických tkání, u nichž neúměrně zvýšená apoptická aktivita zvyšuje jejich degeneraci a dysfunkčnost. Příkladem může být řada neurodegenerativních onemocnění a úbytek svalové hmoty vlivem apoptózy myocytů<sup>988-992</sup>. Bylo pozorováno, že inhibice apoptózy u drozofily vedla k prodloužení délky života, kdy se snížil úbytek svalové tkáně a tedy se zmírnil projev fenotypového projevu stárnutí ve formě snížené lokomoce<sup>993</sup>. Zdá se tak, že pozitivní účinek apoptózy během stárnutí závisí na správné míře její regulace v kontextu typu tkáně a dysregulace těchto pochodů může mít naopak velmi negativní dopad.

Stárnutí i buněčná senescence jsou doprovázeny změnami v expresích významných apoptických genů, jako jsou p53, kaspázy nebo apoptické Bcl-2 faktory, anti-apoptické Bcl-xL (BCL2L1-L)<sup>980,982,994-996</sup>. Z těch významnějších/známějších pro- a proti-apoptických genů jsem v rámci diferenciální exprese našel pouze kinázu Chk2, která má zvýšenou expresi u D a sníženou expresi u SK. Ovšem byla zjištěna řada diferenciálně exprimovaných proteinů, které expresi pro- a proti- apoptických genů regulují, nebo regulují aktivitu jejich produktů. Z těch anti-apoptických to byly u D a MK negativně regulované MDM2 a NEK6 nebo BCL2L1-L a SRC se sníženou expresí u MK. Z těch pro-apoptických to jsou SINA a E2-F1, které vykazaly zvýšenou expresi u D a MK, a BAD a BAX, které jsou negativně

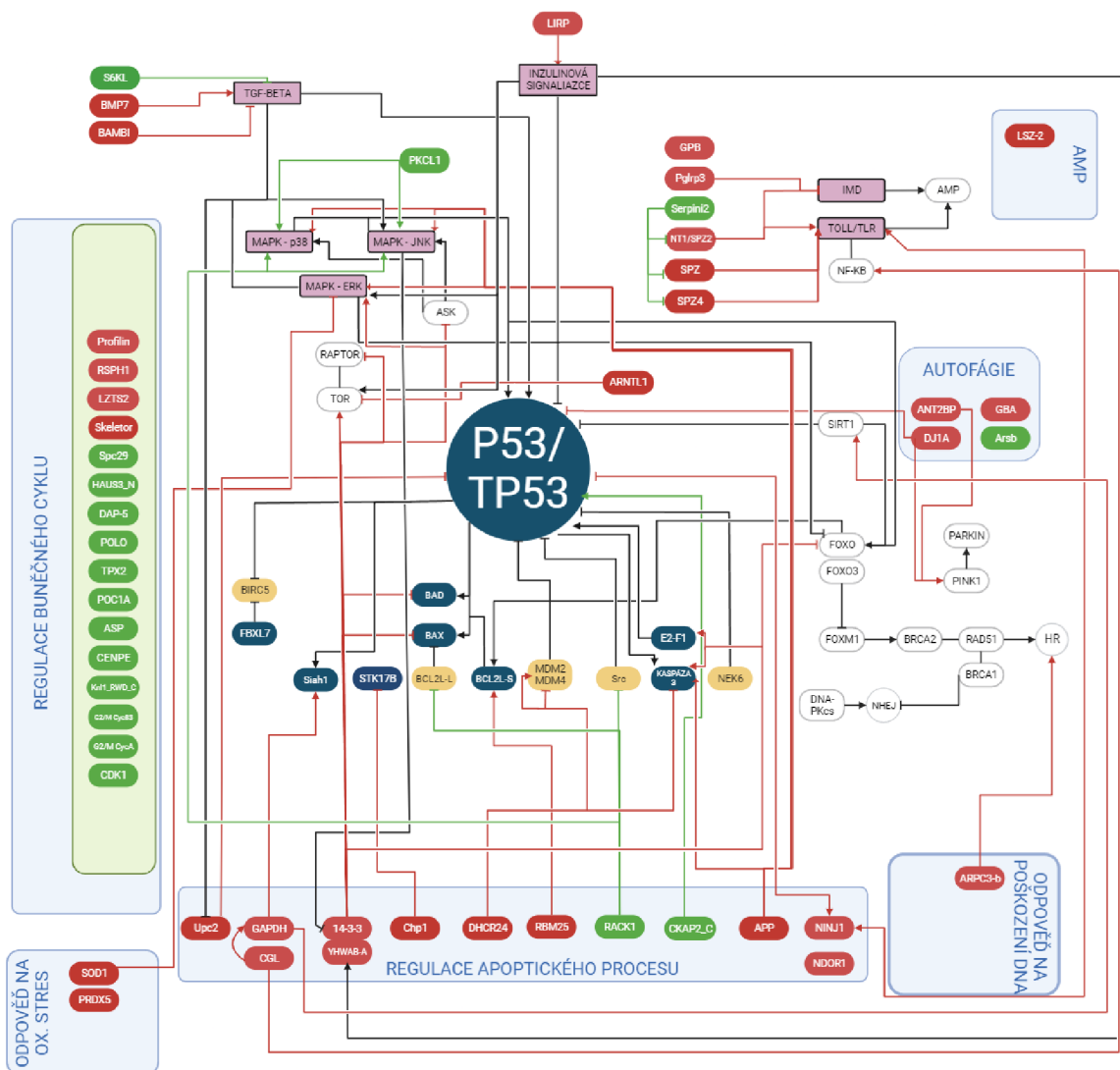
regulovány skrze proteiny 14-3-3<sup>637-640</sup>, které jsou výrazněji exprimované u D a MK, ale zároveň pozitivně regulovány skrze tvorbu BCL2L1-S u D<sup>633</sup>. Aktivační či inhibiční interakce těchto proteinů, a to v kombinaci s proteiny, které se zapojují do regulace buněčného cyklu a dalších signalizačních drah ovlivňujících apoptózu, jsou znázorněny na obrázcích 12, 13 a 14. Z těchto interakcí můžeme vyvodit to, že u MK a SK dochází ve vyšší míře k negativní regulaci pro-apoptických proteinů, s tím že u MK je tento trend výraznější skrze negativní regulaci BCL2L1-L (Bcl-xL) a Src a také s ohledem na přítomnost proteinu ZNF543 v modulu Midnightblue. To ale není zcela podloženo z druhé strany, protože u D jsou negativně regulovány proapoptické BAD a BAX a také kaspáza 3. Pro úplnost je ale třeba dodat, že inhibice BAD a BAX proteiny 14-3-3 probíhá jen pokud není buňka vystavena oxidačnímu stresu (vizte níže). Krom toho je u SK zvýšená tvorba apoptické formy BCL2L1.

Většina apoptických a anti-apoptických proteinů buď přímo reguluje funkci p53 a nebo reguluje aktivitu jeho navazujících efektorů (Tab. XXIII). Protein p53 a jeho signalizační dráha je asi nejzkoumanějším tumorsupresorem. Spouští odpověď na genotoxický stres, kdy iniciuje zastavení buněčného cyklu a opravy DNA, případně vyvolává apoptózu, autofagii či buněčnou senescenci<sup>997,998</sup>. Při poškození DNA je aktivován působením proteinových kináz ATM, ATR, Chk1 a Chk2<sup>999,1000</sup>. Jak již bylo řečeno v mých výsledcích má Chk2 zvýšenou expresi u D a MK. Při nedostatku glukózy ho může aktivovat i kináza AMPK. Krom fosforylace je regulován i skrze acetylaci a deacetylaci, a to především působením Sirtuin deacetyláz<sup>999,1000</sup>. Sirt1 má na p53 supresivní efekt<sup>615</sup> a jeho aktivita je negativně regulována skrze kinázu Chk2<sup>597</sup> a naopak pozitivně regulována skrze proteiny CGL a GAPDH<sup>588,595</sup>, které jsou více exprimované u D a MK. Za normálního nestresového stavu je p53 v buňkách udržován na nízké hladině díky působení ubiquitin ligázy MDM2, která ho označuje pro degradaci<sup>1001</sup>. Zároveň zde existuje negativní zpětná vazba, ve které aktivní p53 spouští transkripci MDM2<sup>1002</sup>. Kináza Chk2 opět negativně reguluje aktivitu MDM2<sup>607</sup> a zároveň jeho aktivitu, negativně i pozitivně ovlivňuje DHCR24<sup>605,606</sup>, který je více exprimovaný u D. Při prozkoumání obrázků 12, 13 a 14 a tabulky XXIII je zřejmé, že regulace p53 signalizace je podpořena zvýšenou expresí u D a MK oproti SK. Navíc, negativní regulátory p53 signalizace jsou exprimovány zejména u D, s výjimkou mírně zvednuté exprese AURKA u MK. Zvýšená exprese negativních regulátorů p53 u D je podpořena rovněž ZNF543 v rámci modulu Midnightblue. Naopak mezi proteiny působícími vůči p53 dráze pozitivně je to mezi expresemi D a MK vyrovnanější a pouze u MK je

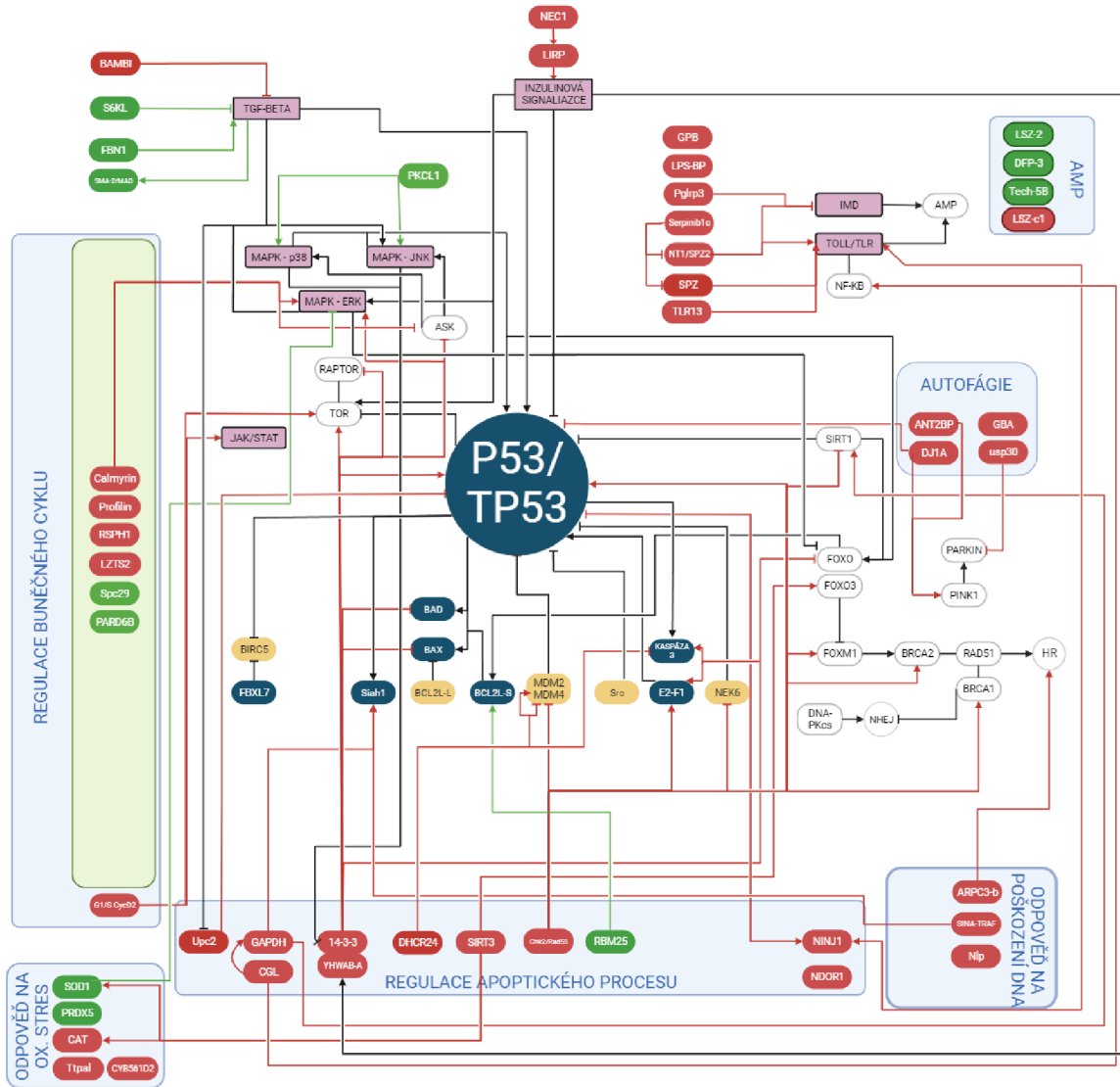
dokonce zvýšená exprese proteinu RACK1 supresujícího antiapoptické proteiny Src a BCL2L a proteinů CKAP2\_C a MKRN1\_C podporujících aktivitu p53. U SK je zvýšená pouze exprese proteinu RBM25, který může stát za tvorbou pro-apoptické formy BCL2L<sup>633</sup> a proteinu RNF144A<sup>961,962</sup> účastnícího se opravy DNA, který je exprimován v p53 dependentním stylu.



**Obr. 12: Porovnání MK vs SK, aktivací a inhibiční interakce diferencielně exprimovaných proteinů účastnících se nebo regulujících apoptózu, autofágii, odpověď na poškození DNA, buněčný cyklus a imunitu:** Interakce proteinů jsou vysvětleny v textu práce. → značí aktivaci. –| značí inhibici. Diferencielně exprimované proteiny jsou znázorněny červenými a zelenými ovály. Červené proteiny mají zvýšenou expresi u MK a zelené u SK. Diferencielně neexprimované proteiny jsou znázorněny bezbarvými ovály. Významné pro-apoptické diferencielně neexprimované proteiny jsou označeny modře a anti-apoptické běžově. Růžové hranoly znázorňují signalizační dráhy. Zkratky názvů jsou vysvětleny v textu práce a v seznamu zkratk. AMP = antimikrobiální peptidy. HR = homologní rekombinace. NHEJ = nehomologní spojování konců. Obrázek byl vytvořený za pomoci nástroje BioRender.com.



**Obr. 13: Porovnání D vs MK, aktivační a inhibiční interakce diferenciálně exprimovaných proteinů účastnících se nebo regulujících apoptózu, autofágii, odpověď na poškození DNA, buněčný cyklus a imunitu:** Interakce proteinů jsou vysvětleny v textu práce. → značí aktivaci. –| značí inhibici. Diferenciálně exprimované proteiny jsou znázorněny červenými a zelenými ovály. Červené proteiny mají zvýšenou expresi u D a zelené u MK. Diferenciálně neexprimované proteiny jsou znázorněny bezbarvými ovály. Významné pro-apoptické diferenciálně neexprimované proteiny jsou označeny modře a anti-apoptické béžově. Růžové hranoly znázorňují signální dráhy. Zkratky názvů jsou vysvětleny v textu práce a v seznamu zkratk. AMP = antimikrobiální peptidy. HR = homologní rekombinace. NHEJ = nehomologní spojování konců. Obrázek byl vytvořený za pomoci nástroje BioRender.com.



**Obr. 14: Porovnání D vs SK, aktivační a inhibiční interakce diferenciólně exprimovaných proteinů účastnících se nebo regulujících apoptózu, autofágii, odpověď na poškození DNA, buněčný cyklus a imunitu:** Interakce proteinů jsou vysvětleny v textu práce. → značí aktivaci. –| značí inhibici. Diferenciólně exprimované proteiny jsou znázorněny červenými a zelenými ovály. Červené proteiny mají zvýšenou expresi u D a zelené u SK. Diferenciólně neexprimované proteiny jsou znázorněny bezbarvými ovály. Významné pro-apoptické diferenciólně neexprimované proteiny jsou označeny modře a anti-apoptické béžově. Růžové hranoly znázorňují signální dráhy. Zkratky názvů jsou vysvětleny v textu práce a v seznamu zkratk. AMP = antimikrobiální peptidy. HR = homologní rekombinace. NHEJ = nehomologní spojování konců. Obrázek byl vytvořený za pomoci nástroje BioRender.com.

**Tab. XXIII: Míra diferenciální exprese pro- a anti-apoptických genů regulujících funkci nebo aktivitu p53 a na něj navazujících efektorů:** Signifikantní hodnoty diferenciální exprese ( $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,5849$  nebo  $\leq -1,5849$ ) jsou zvýrazněny tučným písmem. Zkratky názvů genů jsou vysvětleny jinde v textu a v seznamu zkratk. D = dělník. SK = starý král. MK = mladý král. ID = id genu v příslušné databázi (UniProt nebo Pfam).

PROTEINY INTERAGUJÍCÍ S P53 A JEHO DRÁHOU					
ID	Zkratka	DvSK (Log2FC)	DvMK (Log2FC)	MKvSK (Log2FC)	Forma interakce s p53 dráhou
P42650	14-3-3-3	<b>7,25548</b>	<b>3,66689</b>	<b>3,58859</b>	aktivace p53; aktivace E2-F1; inhibice BAX a BAD
Q5XHK2	YWHAB-A	<b>6,87280</b>	<b>3,85337</b>	<b>3,01943</b>	
Q9FPF0	DJ1A	<b>6,76898</b>	<b>3,82608</b>	<b>2,94290</b>	inhibice vazby p53 na DNA
P17721	GAPDH	<b>6,65489</b>	<b>4,29463</b>	<b>2,36026</b>	aktivace Sina; aktivace Sirt1
Q8VCN5	CGL	<b>6,02297</b>	<b>3,41480</b>	<b>2,60817</b>	
Q92982	NINJ1	<b>3,69071</b>	<b>1,62470</b>	<b>2,06602</b>	transkripce skrze p53; potlačuje exprese p53
Q15392	DHCR24	<b>2,66543</b>	<b>1,91426</b>	0,75117	inhibice/aktivace p53
Q92265	Chk2/Rad53	<b>2,49897</b>	0,17778	<b>2,32119</b>	aktivuje p53; odpovídá na p53; inhibuje MDM2; inhibuje Sirt1
P70406	Ucp2	<b>2,40708</b>	<b>2,36975</b>	0,03733	zamezení aktivaci p53
PF03145	SINA-TRAF	<b>2,37897</b>	0,24393	<b>2,13504</b>	transkripce skrze p53
Q2TA06	AURKA	0,58333	-1,34049	<b>1,92382</b>	inhibice p53
PF15815	MKRN1_C	0,39737	-1,47911	<b>1,87648</b>	regulace aktivity p53
PF15297	CKAP2_C	0,18459	-2,30330	<b>2,48789</b>	aktivuje p53
O42249	RACK1	0,09742	-2,01577	<b>2,11319</b>	inhibuje Scr; inhibice antiapoptické BCL2L1
P50876	RNF144A	-1,51152	0,92930	-2,44083	transkripce skrze p53
P49756	RBM25	-1,67293	<b>2,22917</b>	-3,90210	transkripce skrze p53; tvorba pro-apoptické formy BCL2L1

Vliv samotného p53 a jeho signalizační dráhy a délku života je značně nejednoznačný. Specificky zkrácené formy p53 vykazující hyperaktivitu byly u myši spojené s vyšší rezistencí k rakovině, avšak zároveň i s fenotypem zrychleného stárnutí<sup>1003</sup>. Naopak neaktivní p53 stojí za zvýšeným výskytem nádorů<sup>1004,1005</sup>. Při dysregulaci p53 signalizace také dochází k vyčerpání esenciálních kmenových buněk<sup>1006,1007</sup>. Na základě několikaletých studií na savcích byla navržena teorie, že je p53 prostředkem antagonistické pleiotropie, protože zatímco u mladých jedinců pravděpodobně zvýhodňuje normální vývoj, plodnost a poskytuje resistenci k rakovině, tak u starých jedinců urychluje stárnutí<sup>1008–1011</sup>. U *Caenorhabditis elegans* aktivita p53 limituje délku života hermafroditních jedinců, přičemž je tento efekt závislý na regulaci aktivity FOXO homologu Daf-16, tedy proteinu spojeného s vyšší délkou života<sup>1012</sup>. U *D. melanogaster* absence p53 genu nebo naopak jeho zvýšená exprese během vývoje není slčitelná se životem, ale jeho umírněně zvýšená exprese během vývoje vedla k prodloužení života u samečků. Zvýšená exprese p53 během dospělé části života pak prodlužuje život u samečků a zkracuje život u samiček. Naopak jeho neaktivní forma v dospělosti prodlužuje život samiček a má malý či variabilní efekt na samečky. To naznačuje, že p53 je i pohlavně antagonisticky pleiotropní<sup>1013</sup>. Délku života u drozofily prodlužuje i dominantně negativní forma p53 (DN-p53), která je neaktivní a exprimovaná pouze v mozku. Zdá se, že tento nárůst v délce života probíhá stejným



způsobem jako při kalorické restrikci (CR), protože CR nebo zvýšená exprese Sirt1 nijak nezvyšuje efekt DN-p53 na dlouhověkost. Sirt1 pozitivně reguluje aktivitu FOXO a suprimuje aktivitu p53<sup>615,1014</sup>. Stejněho efektu DN-p53 dosahuje i pokud je jeho exprese omezena pouze na mozkové buňky produkující inzulín, což je navíc doprovázeno snížením úrovně mRNA Insulin-like peptidu a redukcí insulinové signalizace v tukovém tělese<sup>1015,1016</sup>. Při absenci komponentů TOR dráhy navíc k žádnému prodloužení života vlivem DN-p53 nedochází. Zdá se tedy že p53 reguluje délku života drozofily skrze modulaci insulinové signalizace, a pravděpodobně při tom dochází k vzájemnému ovlivnění se IIS/TOR, FOXO a p53 signalizačních drah (vizte níže).

Zvýšená regulace v pozitivním směru u MK a D oproti SK by tak mohla SK chránit před negativním vlivem p53 ve stáří, zatímco u MK a D dochází k ochraně před tumorigenezí. Pokud u *P. simplex* vykazuje p53 stejný pleiotropní efekt na délku života samců a samic, je jeho pozitivní regulace u MK také výhodou. U dělníka je pak oproti MK kromě pozitivní regulace zvýšená i negativní regulace, což by mohlo naznačovat, že u něj dochází k dysregulaci této dráhy, která by teoreticky mohla mít negativní dopad na délku života.

Apoptóza je krom p53 regulována i drahami patřícími do skupiny MAPK (mitogeny aktivované proteinkinázy) signalizací, které s p53 často vzájemně komunikují. MAPK/ERK signalizační dráha odpovídá na růstové faktory a cytokiny a podporuje buněčný růst, proliferaci a přežití. Skrze protein Ras její aktivitu navyšuje i insulinová signalizace. Dá se říci, že její cíle jsou stejné či podobné jako u IIS/TOR signalizace, a to alokace zdrojů do růstu. Stejně jako IIS potlačuje aktivitu FOXO a kinázy AMPK<sup>1017–1019</sup>. Ve vztahu k apoptóze jsou této dráze přičítány především vlastnosti proti-apoptické. Ovšem vyskytují se zde výjimky, například při poškození DNA, kdy tato dráha naopak podporuje apoptózu skrze p53 a aktivitu kaspáz<sup>1020</sup>. Redukce aktivity Ras proteinu skrze redukcí aktivity insulinové signalizace i přímá redukce aktivity Ras ERK proteinů u drozofily vede k navýšení délky života<sup>1021</sup>. Toho samého bylo docíleno i u myši a kvasinek<sup>1022,1023</sup>. Naopak u *C. elegans* ztráta MAPK/ERK aktivity vedla ke zkrácení délky života<sup>1024</sup>.

Funkce MAPK/p38 a MAPK/JNK signalizačních drah je dosti podobná, s tím, že tyto dvě dráhy mezi sebou komunikují<sup>1025</sup>. Zajišťují odpověď na stresové podmínky, kdy regulují imunitu, zánětlivou odpověď, inhibují buněčný růst, regulují buněčnou diferenciaci a apoptický proces<sup>46,1020,1026–1029</sup>. Jsou považovány za spíše za pro-apoptické dráhy, protože

podporují aktivitu p53 a aktivují pro-apoptické proteiny BAX a BAD skrze zamezení jejich inhibice proteiny 14-3-3<sup>1030-1034</sup>. Naopak inhibují proti-apoptické protein Bcl-2 a Mcl-1<sup>1035-1038</sup>. JNK signalizace také v odpovědi na stres ukončuje inhibici FOXO<sup>1039,1040</sup> a to i tu, která je zprostředkována skrze 14-3-3 proteiny<sup>675,1041</sup>. Jejich regulace bude ovšem také do jisté míry závislá na kontextu, protože u obou drah byly zaznamenány i antiapoptické účinky<sup>1042-1046</sup>. Byl pozorován život prodlužující efekt p38 signalizace na svalové buňky drozofily, kde ve spolupráci s proteinovým komplexem CASA reguluje proteinovou homeostázu<sup>1047</sup>. Ovšem v nervových buňkách žádný vliv na délku života pozorován nebyl. U *C. elegans* je přítomnost p38 dráhy nezbytná k prodloužení délky života pomocí kalorické restriktce a redukce insulinové signalizace, a to pravděpodobně skrze interakci s IIS/TOR dráhou a aktivaci Daf-16<sup>1048</sup>. Ovšem efekt p38 a JNK na délku života je obecně diskutabilní s ohledem na další faktory, jako je např. tkáňová specifita či teplota prostředí<sup>1024,1049-1055</sup>.

Mezi diferenciólně exprimovanými proteiny nebyl nalezen žádný komponent těchto tří drah. Ovšem bylo nalezeno několik málo proteinů, které by se mohly podílet na regulaci jejich aktivity. Protein PKCL1, který dokáže aktivovat dráhy p38 a JNK<sup>692,693</sup>, je diferenciólně exprimován ve formě MK > SK > D. Protein RACK1, který se také podílí na aktivaci drah p38 a JNK<sup>687-689</sup>, je exprimován ve formě MK > D = SK. To by naznačovalo mírně zvýšenou aktivaci těchto dvou signalizací u mladého krále. PKCL1 u *C. elegans* zvyšuje aktivitu p38 za účelem vyšší produkce AP a tak je otázka, zda tyto změny v expresi mají vliv i na apoptózu a nebo jen na zapojení p38 do imunitní odpovědi (vizte níže). U SK je pak zvednutá exprese SOD1, která má supresivní efekt na MAPK/ERK<sup>691</sup>. Tomu odporuje přítomnost proteinu PEBP1, negativně regulujícího MAPK/ERK dráhu<sup>946</sup>, v modulu Blue, který je negativně asociovaný s SK. Co by ale mohlo naznačovat, že mezi králi a D dochází k odlišné regulaci aktivit MAPK signalizačních drah, je silně zvýšená exprese dvou 14-3-3 proteinů u D a v menší míře i u MK oproti SK. Tyto proteiny se inhibičně účastní regulace mnoha signalizací, a to včetně MAPK drah<sup>637-640,675</sup>. Za normálního stavu buňky inhibují kinázu ASK1, která je součástí p38 a JNK drah, a tak jim tedy zabraňují v jejich aktivitě. Ovšem během oxidačního stresu dochází k jejich odloučení od ASK1 a tím i k aktivaci těchto drah<sup>637</sup>. To doplňuje i zvýšená exprese proteinu Calmyrinu u D a MK oproti SK, který v reakci na nízkou koncentraci Ca<sup>2+</sup> také inhibuje kinázu ASK1<sup>678,679</sup>. MAPK/ERK signalizaci 14-3-3 proteiny naopak podporují, protože stabilizují Raf kinázy svou vazbou na ně<sup>1056,1057</sup>. Calmyrin aktivitu MAPK/ERK dráhy také podporuje<sup>678,679</sup>. Z toho lze usoudit, že jsou MAPK/p38 a JNK dráhy u D a do jisté míry i u MK inhibovány, tedy pokud

u nich není zároveň zvýšený oxidační stres. Jak uvidíme dále v textu, přítomnost oxidačního stresu je u D a MK docela pravděpodobná a v tom případě by u nich k inhibici těchto drah nedocházelo. Inhibici JNK dráhy naopak u SK podporuje přítomnost proteinu MECOM-B<sup>924</sup> v modulu Green, který je pozitivně asociovaný s SK. Ještě potřeba doplnit, že při poškození DNA 14-3-3 proteiny podporují aktivitu p53 a to přímou vazbou na něj, čímž zamezují jeho inhibici skrze MDM4<sup>1058–1061</sup>. Také během toho stabilizují pro-apoptický faktor E2-F1<sup>1062</sup>.

14-3-3 proteiny také odpovídají na insulinovou signalizaci. Jejím komponentem je kináza AKT, která na specifických místech fosforyluje proteiny PRAS40 a TSC2, čímž umožňuje proteinům 14-3-3 navázání se na ně a tedy jejich inhibici. To má za následek aktivaci TOR signalizace<sup>1063–1067</sup>. Ovšem při nedostatku energie se aktivuje kináza AMPK, které sama osobně inhibuje aktivitu TOR dráhy, ovšem také umožňuje inhibici proteinu RAPTOR pomocí 14-3-3 proteinu a tak zamezuje jeho podpůrnému efektu na TOR<sup>1068,1069</sup>. Stejně tak AKT fosforyluje pro-apoptické proteiny FOXO, BAD a BIM, které jsou následně opět inhibovány skrze navázání 14-3-3 proteinů<sup>226,1070–1072</sup>. A jak již bylo zmíněno, během oxidačního stresu aktivovaná JNK dráha naopak tuto inhibiční vazbu na proteiny BAD a BAX a FOXO přerušuje<sup>675,1032,1033,1041,1073,1074</sup>.

Jak již bylo psáno v úvodu, ISS/TOR je signální dráha známá pro svůj negativní vliv během stárnutí a zároveň negativní regulaci transkripčních faktorů FOXO, které jsou naopak známy pro svůj vliv pozitivní. Z předchozí diskuze o apoptóze, p53 a MAPK drahách a 14-3-3 proteinech si nelze nevšimnout jejich blízkého propojení s ISS/TOR signalizací a proteiny FOXO. Proto by bylo vhodné se podívat i na diferenciální expresi jejich komponentů. Bohužel mezi našimi diferenciálně exprimovanými proteiny byla zaznamenána pouze u D zvýšená exprese insulin-like peptidu LIRP. Oproti SK byla u D také zvýšená exprese proteinu NEC1, který stojí za syntézou peptidických hormonů, včetně insulinu a pravděpodobně i zmíněného LIRP<sup>680–682</sup>. LIRP by ovšem u D teoreticky mohl aktivovat insulinovou signalizaci a na to by mohla navazovat inhibice apoptických proteinů a proteinů FOXO a aktivace TOR a ERK dráhy s využitím 14-3-3 proteinů. To by opět podporovalo pravděpodobně vysokou negativní regulaci apoptózy u D. K tomu je u D a MK také zvýšená exprese cyklinu D2, který pozitivně reguluje TORC1 komplex<sup>1075</sup>. D a MK mají také zvýšenou expresi Sirt3, který naopak spouští apoptické působení FOXO<sup>619</sup>. Ovšem, jak již bylo řečeno Sirt3 může mít i antiapoptické účinky. Aktivitu FOXO také podporuje Sirt1, který je u D a MK pozitivně regulován skrze GAPDH<sup>588,1076</sup>. Zároveň je u D a MK vysoká

aktivita Chk2 kinázy, která inhibuje Sirt1<sup>597</sup>, čímž ale i zamezuje v jeho inhibičním efektu na p53. P53 je u D a MK pravděpodobně aktivní i přes přítomnost 14-3-3, a to kvůli možnému vyššímu oxidačnímu stresu (vizte níže). To samé by byl pak případ i u JNK a p38 signalizací. Vzato dohromady, u dělníka a krále jsou pravděpodobně aktivní p53, JNK a p38 apoptické dráhy a zároveň jsou u D jimi vyvolané apoptické proteiny a FOXO inhibovány vlivem zvýšené inzulinové signalizace. Vyšší aktivita IIS/TOR by ovšem také stála za potlačením autofágie, a to nekoresponduje s vyšší expresí autofágie podporujících proteinů u D.

Mezi diferenciálně exprimovanými geny byla také zaznamenáno šest proteinů souvisejících s TGF- $\beta$  (Transforming growth factor beta) signalizační dráhou. Tato dráha reaguje na TGF- $\beta$  proteinovou rodinu růstových faktorů, přičemž pro většinu z nich disponuje vlastní signalizační větví. V našem případě diferenciálně exprimované proteiny ovlivňují Aktivin a BMP větve této dráhy. TGF- $\beta$  signalizační dráha je důležitý fyziologický regulátor s rolí v embryonálním vývoji a udržení tkáňové homeostáze v dospělosti. Reguluje řadu buněčných funkcí jako buněčný cyklus, růst, diferenciace a proliferace, imunitní a zánětlivou odpověď, apoptózu, autofágií a senescenci. Podrobnější popis složení této signalizace a jejich funkcí naleznete ve člancích Morikawa, Derynck a Miyazono 2016<sup>1077</sup>, Zhang, Alexander a Wang 2017<sup>1078</sup> a Upadhyay et. al 2017<sup>1079</sup>. Regulace těchto pochodů je velmi složitá, a to samé platí i o její komunikaci s mnoha dalšími signalizačními dráhami. Například dochází k vzájemné podpoře aktivity s MAPK/ERK dráhou, avšak MAPK/ERK může vykazovat i supresivní vliv na TGF- $\beta$ , a to za účelem zamezení inhibice buněčného cyklu a apoptózy<sup>1080,1081</sup>. Komplexita tohoto vztahu i vztahů s ostatními signalizačními drahami, jako například NF- $\kappa$ B a Wnt, je popsána ve článku Luo 2017<sup>1080</sup>. TGF- $\beta$  se podílí na průběhu apoptózy zvyšováním aktivity JNK dráhy, kaspázy 3 a dalších apoptických genů<sup>1082–1089</sup>. Naopak inhibuje aktivitu anti-apoptické Bcl2<sup>1090</sup>. TGF- $\beta$  apoptická aktivita je pak potlačována skrze insulinovou signalizaci, a to pravděpodobně skrze inhibici proteinu Smad3 pomocí AKT kinázy<sup>1091,1092</sup>. Rovnováha mezi těmito dvěma drahami tak pravděpodobně rozhoduje o tom, zda buňka projde nebo neprojde apoptózou. AKT také inhibuje protein FOXO, který je, alespoň na případu *D. melanogaster*, schopný navazovat se na Aktivin a zamezovat tak jeho signalizaci. Ukázalo se, že v rámci Aktivin signalizace dochází k potlačování exprese autofagického genu Atg8a. Zvýšená exprese samotného tohoto genu ve svalech drozofily je přitom dostačující k prodloužení života<sup>1093</sup>. Tato

interakce by tak mohla být jedním z mechanismů stojících za prodloužením života jedince při supresi insulinové signalizace. To, že má TGF- $\beta$  dráha vliv na stárnutí je zřejmé již z toho, že se ve spolupráci s p53 podílí na spuštění buněčné senescence<sup>1094–1096</sup>. Změny v její aktivitě jsou asociovány s řadou se stářím spojených nemocí, jako je Alzheimerova choroba a svalová atrofie. Studie přitom naznačuje, že špatná regulace této dráhy a zvýšená regulace jejích ligandů přispívají k buněčné degeneraci, tkáňové fibróze, zánětu, nižší regenerační kapacitě tkání, metabolickým malfunkcím a stárnutí kmenových buněk (podrobně popsáno v článku Tominaga 2019)<sup>1097</sup>.

V rámci diferenciálně exprimovaných proteinů se zdá, že je TGF-beta signalizace silněji regulována u SK oproti MK a D. Protein BMP7, exprimovaný ve formě SK=D >MK, aktivátor BMP signalizační větve dráhy<sup>695,696</sup>. U SK jsou také zvednuté exprese dvou fibrillinů, což jsou proteiny extracelulární matrix, které napomáhají vazbě BMP ligandu na jeho receptor<sup>697</sup>. Avšak u SK a MK je také zvýšená exprese proteinu S6KL, který u drozofily zprostředkovává degradaci BMP receptoru<sup>701</sup>. To by naznačovalo, že navzdory vyšší expresi BMP7 je u SK snižená aktivace BMP dráhy. Tomu ovšem odporuje u SK zvýšená exprese proteinu Mad, který v rámci BMP signalizace slouží jako transkripční faktor<sup>698–700</sup>. Efekty drozofilího BMP homologu Dpp a jeho transkripční faktor Mad jsou považovány za život prodlužující<sup>1093</sup>. BMP signalizace je navíc u drozofily nezbytná pro obnovu a proliferaci zárodečných ale i somatických kmenových buněk v ovariích, přičemž prodlužuje i délku života těchto buněk. Je pravděpodobné, že BMP signalizace má takovýto dopad i na jiné kmenové buňky<sup>1098,1099</sup>. Pokud je i přes přítomnost inhibitoru S6KL u SK vyšší aktivita BMP signalizace skrze transkripční faktor MAD, mohlo by to znamenat pozitivní efekt této signalizace na délku života SK, skrze obnovu jeho kmenových buněk. U D je pak zvýšená exprese proteinu BAMBI, který je inhibitor jak BMP, tak aktivin receptorů<sup>694</sup>. To zase naznačuje, že i u D je snižená aktivita BMP signalizace navzdory vyšší expresi BMP7, přičemž u D není zvýšená exprese proteinu Mad jako u SK. Pravděpodobně vyšší aktivita insulinové dráhy u D by znamenala vyšší aktivitu Aktivin signalizace, což by se projevilo na snížení exprese autofagického Atg8a. Mezi diferenciálně exprimovanými geny ovšem nebyl nalezen a je otázka, zda jeho aktivita nějak souvisí i s ostatními autofagickými proteiny, jejichž zvýšená exprese byla u D pozorována. Protein BAMBI by navíc mohl zamezovat aktivitě Aktivin signalizace.

Všechny zmíněné pro-apoptické či autofagické dráhy se povětšinou aktivují vlivem stresových situací v buňkách právě probíhajících. Proto byly mezi diferenciálně

exprimovanými geny hledány náznaky toho, zda u některé skupiny termitů nedochází k těmto stresovým situacím ve zvýšené míře.

Jak bylo zmiňováno v úvodní kapitole Stárnutí u sociálního hmyzu, mezi druhy eusociálního hmyzu nebyl pozorován jednotný vzorec změn exprese antioxidantů, krom toho exprese SOD1 častěji narůstala u dělníku a Prx3 u starých jedinců<sup>479,500,502–508</sup>. Tomu odporuje mnou pozorovaná vysoká exprese SOD1 u SK, která je podpořena přítomností SOD1 v modulu Green, pozitivně asociovaném s SK. U starých královen *Reticulitermes speratus* a naopak u dělníku *Cryptotermes secundus* je zvýšená exprese Cat<sup>502,506,514</sup>. Mé poznatky tak odpovídají spíše druhému, protože exprese Cat je zvýšená u MK a do jisté míry i u D. U starých královen *R. speratus* byly navýšené i exprese Prx<sup>514</sup> a v našem případě tomu odpovídá vysoká exprese Prx5 u SK. Ale exprese Prx6 je vyšší u MK a nesignifikantně i u D. Nutno podotknout, že z hlediska hodnot Log2FC jsou nejvíce diferenciatně exprimované antioxidanty ty s vyšší expresí u SK. K informacím o expresích antioxidantů je ale potřeba přidat informace i o dalších odpovědích na oxidační stres. U dělníka jsou více exprimované čtyři proteiny odpovídající na oxidační stres a to Ucp2, DJ1A, Sirt3 a DHCR24. Ucp2 snižuje mitochondriální produkci ROS a zamezuje uvolnění cytochromu c z membrány během apoptózy<sup>648–652</sup>. DJ1A je senzor oxidačního stresu, podporuje aktivitu SOD1 v cytoplasmě, zamezuje buněčné smrti vyvolané oxidačním stresem, ale podporuje mitofágie<sup>583,641,642</sup>. Sirt3 pak spouští odpověď na oxidační stres a pozitivně reguluje aktivitu antioxidantů SOD1 a Cat<sup>619,666,667</sup>. DHCR24 zamezuje apoptóze vyvolané oxidačním stresem redukcí aktivity kaspázy 3<sup>603,604,665</sup>. Podíváme-li se zpátky mezi proteiny podporující apoptózu, zjistíme, že u D více exprimovaný ndor1 spouští apoptózu v reakci na oxidační stres<sup>601,602</sup> a za zvýšeným oxidačním stresem může stát nadměrná exprese APP u D<sup>624,625</sup>.

Vezmeme-li tyto poznatky dohromady, zdá se, že u D oproti SK je vyšší exprese proteinů odpovídajících na oxidační stres a tato odpověď je tak u nich i pravděpodobně aktivnější. To by mohlo znamenat, že D jsou pod větším oxidačním stresem než SK. V rámci toho vyvolávají obranu proti tomuto stresu, která se i zároveň snaží potlačit oxidačním stresem vyvolanou apoptózu postižených buněk. To by i korelovalo s vyšší expresí antiapoptických proteinů u D překrývající se s vyšší expresí některých pro-apoptických proteinů. Zároveň by to ale znamenalo, že zmíněná inhibice apoptických drah JNK a p38 proteiny 14-3-3 u dělníka je přerušena v reakci na oxidační stres. MK má stejně jako SK sníženou expresi Ucp2 a DHCR4. Exprese DJ1A je u něj vyšší než u SK, ale nižší než u D a exprese Sirt3 je

na stejné úrovni jako u D. To znamená, že obrana proti oxidačnímu stresu není u MK pravděpodobně tak silně aktivovaná jako D, ale stále silnější než u SK. Absence vyšší exprese DHCR24 a Ucp2 by korelovala s tím, že anti-apoptické proteiny u MK vykazují nižší expresi než u SK. MK by tak byl jakýmsi přechodem mezi D a SK znázorňujícím postupný pokles odpovědi na oxidační stres a apoptického procesu od stavu v nereprodukční kastě do stavu ve stárnoucí reprodukční kastě. To není nijak nerealistický pohled, z důvodu toho, že pro experiment použití králové jsou neotenici, kteří v případě *P. simplex* vznikají krom nymf i z „falešných“ dělníků a přechod mezi dělníkem a nymfou je značně plastický. Navíc u SK je sice zvýšená exprese SOD1, ale Sirt3 a DJ1A zvyšují aktivitu tohoto antioxidantu u D a MK, což by jeho nižší expresi mohlo kompenzovat. Aktivita Sirt3, Ucp2 a DJ-1 je sice u drozofily a savců pozitivně spojena s délkou života, ale jejich snížená exprese společně s faktem snížené exprese proteinů apoptické regulace u SK by mohla prostě jen znamenat, že jich není potřeba, protože SK není pod vlivem oxidačního a jiných stresů a tím pádem homeostáze jeho tkání a buněk nemusí být tak aktivně udržována. Pravděpodobnější je ale opak, tedy že u starých králů je oproti D a MK snížená aktivita odpovědi na oxidační stres a na jeho působení navázané apoptické odpovědi. K vyšší odolnosti MK k oxidačnímu stresu nabádají i SMOX a SLC22A1 v modulu Pink, pozitivně asociovaném s MK. Souvisejí totiž s metabolismem polyamidů, které jsou spojeny se zvýšenou odolností organismu k oxidačnímu stresu <sup>948,950,954,955,958,960</sup>. Navíc přítomnost proteinu ND1, podjednotky komplexu I mitochondriálního respiračního řetězce <sup>930</sup>, v modulu Green, pozitivně asociovaném s SK a obohacení genových ontologií Sestavení komplexu I mitochondriálního respiračního řetězce, Respirační řetězec a Oxidativní fosforylace u modulu Green, napovídají možné vyšší aktivitě mitochondriálního respiračního řetězce u SK, a tedy i pravděpodobné vyšší produkci ROS. Nižší obraně proti oxidativnímu stresu u SK by napovídaly výsledky studií na jiných druzích termita zmiňované již v kapitole Stárnutí u sociálního hmyzu. U *C. secundus* (OP; totipotentní dělníci) dochází u dělníků k nižším nárůstům karbonylace proteinů v důsledku oxidačního stresu <sup>502</sup>, zatímco u *R. speratus* (MP; praví dělníci) královny oproti dělníkům vykazují nižší oxidativní poškození proteinů, lipidů i DNA <sup>513,514</sup>. Mnou použitý *P. simplex* je stejně jako *C. secundus* v jednom kuse hnízdící druh s totipotentními dělníky a zvýšená exprese proteinů v odpovědi na oxidační stres by mohla znamenat, že u něj dochází k menšímu oxidativnímu poškození buněčných molekul jako v případě *C. secundus*. Zvýšenou odpověď u totipotentních dělníků oproti královnám *C. secundus* pozorovali i ve studii Rau a Korb z roku 2021 <sup>512</sup>, kde ji přičítají ve prospěch teorie, že totipotentní dělníci mají stále relativně vysokou šanci stát se

reprodukčními jedinci, nejsou tak zcela altruističtí, a investují tak do mechanismů udržujících integritu jejich tkání, tedy do mechanismů působících proti stárnutí, aby navýšili své šance. Stejná teorie se tedy dá pravděpodobně aplikovat i na termita *P. simplex*.

V rámci odpovědi na poškození DNA je důležitá především zvýšená exprese Chk2 u D a MK, která spouští p53 odpověď a podílí se na zastavení buněčného cyklu při dvouřetězcových zlomech DNA (DSB) <sup>607,610</sup>. Také zvyšuje expresi a aktivitu proteinu BRCA2 a BRCA1, které mají roli v opravě DNA skrze homologní rekombinaci <sup>612,723,724</sup>. To podporuje i zvýšená exprese ARPC3-b u D a MK, která se také podílí na homologní rekombinaci <sup>721</sup> a také zvýšená exprese SINA-TRAF napomáhající v zastavení buněčného cyklu <sup>616-618</sup>. U D je pak zvednutá exprese Nlp a u MK exprese ASF1, tedy dvou proteinů stojících za dekondukcí chromatinu <sup>725,728,729</sup>, ke které ve velké míře dochází právě při poškození DNA <sup>1100-1103</sup>. ASF1 se navíc podílí na opětovném sestavení heterochromatinu po opravě DBS a replikaci DNA <sup>730</sup>. Proti trendu jde akorát přítomnost proteinu ZNF543 v modulu Midnightblue, který je negativně asociovaný s MK. ZNF543 podporuje transkripci proteinu TRIM28, který je součástí odpovědi na poškození DNA a lokalizuje se na místech DNA zlomů <sup>961,964</sup>. To vše naznačuje, že je u D a MK aktivní odpověď na DSB poškození DNA a pravděpodobně i dochází k opravě skrze homologní rekombinaci. To by pak mohlo i znamenat, že jsou D a MK pod vyšším genotoxickým stresem, který pak u nich vyvolává námi pozorovanou zvýšenou expresi apoptických proteinů a aktivitu p53. Poškození DNA by pak mohlo být způsobené oxidačním stresem, jež by doprovázela námi pozorovaná zvýšená exprese proteinů odpovídajících na oxidační stres u D a MK.

Ovšem tyto reakce na poškození DNA a apoptózu jsou doprovázeny zastavením buněčného cyklu. To se děje i skrze inhibice komplexů CDK2/Cyc A/E a CDK1/CyclinB <sup>1104-1106</sup>. Avšak exprese CKD1, CycB3 a CycA jsou u MK zvýšené. To doprovází i velký počet proteinů účastnících se mitózy se zvýšenou expresí u MK, a to jak oproti D, tak oproti SK. V rámci porovnání MK a D je pak mezi diferenciólně exprimovanými proteiny obohacená genová ontologie Organizace mitotického vřeténka a v rámci porovnání MK v SK zase genová ontologie Proces založený na mikrotubulech. Zároveň je v modulu Green, pozitivně asociovaném s SK, přítomen protein GWL, který inhibicí fosfatáz PP2A nepřímou udržuje vysokou hladinu komplexu CDK1/CyclinB <sup>927-929</sup>. Odpověď na poškození DNA ovšem během mitózy nespouští inhibici těchto CDK-cytokin komplexů, ale pozastavuje dokončení opravy zlomů DNA, kterou odkládá do G1 fáze, protože během mitózy by mohlo vlivem nescifické NHEJ dojít k fúzi chromozomů <sup>1107</sup>. To naznačuje, že k poškození DNA u MK



dochází během mitotické fáze buněčného cyklu. V posledních letech ale narůstá důkazů, že v mitotické fázi buněčného cyklu by opravdu mohl figurovat jistý kontrolní bod pro poškození DNA<sup>1108</sup>. Zvýšená exprese mitotických proteinů, a tedy pravděpodobně vyšší míra mitotického dělení u MK, pravděpodobně souvisí růstem a jeho nedávným přechodem z nymfy/dělníka na neotenika. V modulu Blue, negativně asociovaném s SK, se k tomu navíc nachází protein RAN, podílející se na správném sestavení mitotického vřeténka<sup>939–941</sup>. U SK je zvýšená exprese RNF144A, která ubiquitinací označuje DNA-PKcs k degradaci. DNA-PKcs hrají důležitou roli v opravě DNA skrze NHEJ<sup>632,734,735</sup>. To by mohlo souviset s poklesem efektivity NHEJ v opravě DNA při senescenci<sup>1109</sup>. Vyšší exprese genů spojených s opravou DNA u D a MK tak nekoreluje s předchozími poznatky o jejich zvyšující se expresi u stárnoucích královen mravence *Lasius niger* a králů termita *R. spereratu*<sup>515,516</sup>. Naopak koreluje s poklesem jejich exprese u reprodukční kasty *C. secundus*<sup>506,523</sup>. Zřejmě tak opět narážíme na podobný fenomén vyšší údržby somatické integrity u totipotentních dělníků, jako tomu bylo u odpovědi na oxidační stres.

V úvodu byl zmiňován negativní efekt vysoké aktivity mobilních elementů na integritu genomu a stárnutí. Mezi DEG jsme objevili dva komponenty mobilních elementů s vyšší expresí u SK a jeden s vyšší expresí u MK. U starého krále by tak mohla být zvýšená aktivita těchto elementů, která byla opět pozorována i u reprodukčních jedinců *C. secunsus* a naopak bylo pozorováno její potlačení u reproductivců termita *Macrotermes bellicosus* (CP, praví dělníci)<sup>498,506,523</sup>.

Mezi králi a dělníkem také dochází ke změnám v expresi proteinů souvisejících s proteinovou homeostází. Kvalita translace by mohla být u D a MK podpořena zvýšenou expresí 3 EF1a, jejichž exprese je spojena s prodloužením života a odpovědí na oxidační a endoplasmaticko-retikulární stres<sup>737,738</sup>. To je doplněno nárůstem exprese RACK1 u MK, který má roli v ribozomální kontrole kvality translace a napomáhá ubiquitinaci a následné recyklaci podjednotek zaseklých ribozomů<sup>747,748</sup>. U MK je navíc proteinová homeostáze podpořena zvýšenou expresí endoplasmaticko-retikulárního proteinu TRAP- $\alpha$ , který napomáhá správnému skládání proteinů<sup>743–746</sup> a zvýšenou expresí Cut8 sestavující 26s proteazomální komplex v jádře<sup>742</sup>. Poškozené proteiny jsou označovány k degradaci v proteazomu pomocí ubiquitinace<sup>1110</sup>. V tom ohledu je u MK zvýšená exprese Znf-RING domény, která je často součástí E3-ubiquitin ligáz<sup>753,754</sup>, a oproti SK i Polyubiquitin-B,

který slouží jako zdroj ubiquitinů<sup>739–741</sup>. Aktivitu E3-ubiquitin ligáz ale podporují proteiny MAGEL2 a ARRDC4<sup>749–751,755,756</sup>, jejichž exprese jsou oproti MK zvýšené u SK a mírněji i u D. Obecně se dá usuzovat, že u SK a MK se zvedají exprese proteinů zkvalitňujících translaci, což je u MK doplněné vyšší expresí proteinů kontrolujících proteinovou kvalitu. Tomu ale do jisté míry odporují výsledky WGCNA, protože v modulu Blue, negativně asociovaném s SK, jsou 2 komponenty ribozomálních podjednotek RpS26 a RpL9<sup>748</sup> a také protein RPABC3, který je podjednotkou RNA polymeráz<sup>935</sup>. Zároveň jsou v modulu Purple, pozitivně asociovaném s D, přítomni proteiny EXOSC9 a GLMP. EXOSC9 je součástí RNA exozomálního komplexu účastnícího se maturace různých druhů RNA a degradace nestabilních a aberantních mRNA v cytoplasmě<sup>885,886</sup>. Ovšem modul Turquoise, negativně asociovaný s D, má signifikantně obohacenou genovou ontologii Biosyntéza proteinů a nesignifikantně obohacenou ontologii Dráha dohlížející na mRNA.

Mezi diferenciálně exprimovanými proteiny byly nalezeny i čtyři ovlivňující sestřih mRNA. CWF19L2 proteiny jsou součástí spliceozomálního komplexu<sup>767</sup>, přičemž jeden je více exprimovaný u králů oproti D a jeden u SK a D oproti MK. U MK je oproti D více exprimovaný RPUSD2, který pseudouridyluje mRNA, což je modifikace, která má i roli v alternativním sestřihu mRNA<sup>768,769</sup>. PHAX transportující z jádra U sn-RNA, které se podílí na tvorbě spliceozomálního komplexu<sup>764–766</sup>, je více exprimovaný u MK oproti SK. Zároveň má modul Blue, negativně asociovaný s SK, nesignifikantně obohacenou genovou ontologii Sestřih mRNA skrze spliceozom.

Vliv na míru buněčného stresu by mohly mít diferenciálně exprimované proteiny účastníci se detoxifikačních procesů. Zajímavé jsou především u obou králů zvýšené exprese UDP-glukoronosyltransferáz (UGT 2B18 má vyšší exprese u MK oproti SK, ale oproti D je u obou králů zvednutá alespoň nesignifikantně). Jsou to významné multifunkční detoxifikační enzymy zbavující organismus endogenních i exogenních toxických látek skrze jejich glukoronidaci<sup>829,830</sup>. U D je naopak zvýšená exprese GST1 konjugující oxidovaný glutathion s toxickými látkami, včetně peroxidovaných lipidů a AKR1A1 redukující toxické aldehydy<sup>825–827</sup>. U králů se pak na detoxifikaci můžou podílet i urikáza, dvě BPHL a jedna DHRS11 [2]. BPHL [1] je součástí modulu Pink, pozitivně asociovaného s D. U D pak mohou přispívat i DHRS11 [1] a EPH4. Na detoxifikaci by se také mohli podílet diferenciálně exprimované CYP, ovšem ty mají spíše roli v syntéze ecdysteroidů<sup>882,883</sup>.

Mezi diferenciálně exprimovanými proteiny bylo nalezeno několik regulující aktivitu imunitní odpovědi. Jejím centrem jsou u bezobratlých živočichů Toll a Imd signální dráhy, které patří mezi takzvané NF- $\kappa$ B signalizace. Na začátku těchto drah receptory reagují na částice patogenního původu a na konci dochází k expresi antimikrobiálních peptidů a genů s rolí v imunitních, zánětlivých a stresových odpovědích<sup>302,711,1111–1113</sup>. V souladu s teorií pleiotropního efektu imunity na stárnutí způsobuje u drozofily exprese dvou patern rozeznávajících receptorů PGRP-LE a PGRP-LC, které jsou oba součástí Toll a Imd drah, škodlivý zánětlivý stav s negativním efektem na dlouhověkost<sup>1114–1116</sup>. Genetická manipulace PGRP genů, které jsou naopak imunosupresivní, také ukázala, že přílišná aktivace imunitního systému nese negativní dopad na délku života<sup>1117,1118</sup>. Negativní efekt aktivity Toll a Imd drah je ovšem opět částečně závislý na typu tkáně, pohlaví a střevním mikrobiomu a jejich výsledný efekt závisí na vlastnostech těmito drahami právě exprimovaného mixu antimikrobiálních peptidů, které mohou mít jak pozitivní, tak negativní dopad na dlouhověkost<sup>1119–1123</sup>. U savců jsou NF- $\kappa$ B dráhy také spojené se stimulací zánětu a jejich aktivita je součástí zánětlivých onemocnění spojených se stářím<sup>1124–1127</sup>. Pokud to shrneme, tak i přestože jsou tyto dráhy pro organismus prospěšné v rámci obrany proti patogenům, tak naopak jejich schopnost vyvolat chronické zánětlivé stavy je pro organismus a jeho délku života škodlivá.

U SK jsou navýšené exprese 3 AP proteinů, zatímco u MK a D pouze jednoho. Navíc jsou u SK navýšeny i exprese tří proteinů Spaetzle důležitých pro aktivaci Toll signalizace<sup>709–711</sup>. To by mohlo znamenat zvýšenou aktivitu této dráhy u SK, a tedy její negativní vliv na dlouhověkost. Ovšem u SK je pravděpodobně navýšena aktivita BMP dráha, která má schopnost zamezovat přílišné expresi antimikrobiálních peptidů (vizte níže). Navíc u D a MK jsou vyšší exprese proteinů CGL a NIJ1, které jsou spojené s vyšší aktivitou NF- $\kappa$ B faktorů a Toll signalizace<sup>702,707,708</sup>. To u D doplňuje i oproti SK zvýšená exprese Toll-like receptoru 13 a fakt, že SPZ je u něj exprimován ještě více než u SK a SPZ4 více než u MK, i když méně než u SK. Jejich efekt by ale mohla potlačovat u D zvýšená exprese proteinu Serpinb1c, který blokuje pro aktivaci Toll důležitou proteolýzu proteinů Spaetzle<sup>716</sup>. Stejně tak je u MK zvýšená exprese Seripini2. GBP se zvýšenou expresí u D a LPS-BP se zvýšenou expresí u MK, a mírněji ale nesignifikantně i u D, jsou patogenní částice rozeznávající proteiny, které by se také mohly podílet na vyšší aktivitě imunitních drah<sup>714,715</sup>. Zároveň je u D exprimovaný Pglrp3 protein, který inhibuje receptor PGRLP-LC Imd signalizace a zamezuje tak nadměrné aktivaci imunitní odpovědi této dráhy<sup>704–706</sup>. To samé dělá protein

NT1<sup>703</sup> se zvýšenou expresí u D a MK. Je tedy těžké usuzovat, zda je imunitní odpověď těchto dvou drah více aktivní u SK, MK nebo D. S určitostí ale vidíme, že dochází k jejich odlišné regulaci mezi jednotlivými stádii termálního života.

Imunitu ovlivňují také již zmiňované MAPK/ERK, MAPK/p38, MAPK/JNK a TGF- $\beta$  a IIS/TOR signální dráhy. Ukazuje se, že v některých případech je život prodlužující efekt downregulace IIS/TOR signalizace spojen se zvýšenou rezistencí k některým patogenům<sup>168,1128–1133</sup>. Tento fakt je pravděpodobně navázaný na to, že během snížené aktivity IIS/TOR nedochází k inhibici FOXO, které bylo naopak spojeno s expresí antimikrobiálních peptidů a zvýšenou rezistencí k patogenům<sup>1128,1129,1132–1136</sup>. Podobné efekty na imunitu jako IIS/TOR pravděpodobně vykazuje i MAP/ERK. Její aktivace u drozofily vede ke zkrácení délky života, které je doprovázeno inhibicí IMD/NF- $\kappa$ B dráhy, což vede k menšímu přežívání drozofily při bakteriální infekci<sup>1021,1137</sup>. U *C. elegans* je ale naopak její ztráta spojena se zkrácenou délkou života a pravděpodobně i nižší produkcí AP<sup>1024,1138,1139</sup>. Některé studie také ukazují že její aktivace u *D. melanogaster* vede k omezení virové replikace<sup>1140</sup>. p38 a JNK dráhy se pak podílí na regulaci exprese AP a imunitní odpovědi, jejich aktivita podporuje rezistenci k patogenům a zároveň je pozitivně spojována s délkou života u drozofily a *C. elegans*<sup>1024,1039,1049,1050,1141–1144</sup>. Jejich vliv na délku život ovšem může být závislý na kontextu, jako je teplota prostředí a typ tkáně<sup>1024,1049–1053</sup>. U *Anopheles stephensi* dokonce naopak snížená aktivita JNK signalizace vede k větší rezistenci k *Plasmodium palciparum*<sup>1145</sup>. Exprese drozofilích TGF- $\beta$  ligandů Daw (Aktivinová dráha) a Dpp (BMP dráha) se zvyšuje při infekci a aktivace TGF- $\beta$  je u drozofily spojena se supresí genů imunitní odpovědi, která pravděpodobně zabraňuje vzniku patologií spojených s přílišnou aktivací imunity. Dpp také snižuje produkci nadbytečných AP při sterilním zranění<sup>1146</sup>. V souladu s efektem u drozofily je ztráta funkce proteinu dbl-1 (homolog TGF) u *C. elegans* spojena s nižší mírou přežití během infekce a zkrácenou délkou života<sup>1147</sup>.

V kontextu mých výsledků by zvýšená aktivita p38 a JNK drah u D a MK mohla mít pozitivní dopad na imunitu. To samé platí i o zvýšené expresi proteinu PKCL1 u SK, u kterého bylo přímo zjištěno, že u *C. elegans* podporuje a zvyšuje expresi AP skrze p38 signalizaci<sup>692</sup>. Pravděpodobně zvýšená aktivita insulinové a MAPK/ERK signalizace u D by ovšem naopak mohla negativně ovlivňovat u D rezistenci k patogenům a délku života. Aktivita imunitního systému SK by pak mohla být udržována na neškodné hladině skrze jeho pravděpodobně zvýšenou aktivitu BMP dráhy.

V rámci diferenciálně exprimovaných proteinů mezi D a SK je obohacena genová ontologie Procesy lipidického metabolismu. To samé platí i o modulu BLUE, negativně spojeném s SK a nesignifikantně i o modulu PINK, pozitivně asociovaném s MK.

Vysoký podíl polynenasycených mastných kyselin (PUFA) v membránách je ve stáří považován za nevýhodu, protože PUFA jsou náchylné k peroxidaci a dlouho žijící živočichové mají v membránách často nižší zastoupení PUFA oproti mononenasyceným mastným kyselinám (MUFA) <sup>1148–1150</sup>. U dlouhověkých lidí byl sice pozorován vyšší podíl PUFA, ovšem to bylo doprovázeno jejich nižší náchylností k peroxidaci a zvýšeným poměrem  $\omega$ -3 mastných kyselin oproti  $\omega$ -6 <sup>1151,1152</sup>. Delta-9 desaturázy stojí za tvorbou MUFA a jejich aktivita, společně s množstvím MUFA, je pozitivně spojena s prodloužením života *C. elegans* při mutacích insulinové signalizace. Naopak množství PUFA je s tímto negativně korelováno <sup>1153</sup>. Zároveň inaktivace delta-9 desaturázového genu vedla k potlačení dlouhověkosti vyvolané mutacemi insulinové dráhy u *C. elegans*, a naopak jeho zvýšená exprese prodlužovala život společně s navýšením akumulace MUFA <sup>1154,1155</sup>. U MK je oproti D zvýšená exprese dvou delta-9 desaturáz ACDS a SCDS4 produkujících MUFA <sup>872,873</sup>. SCDS4 je součástí modulu Pink, pozitivně asociovaného s MK. U D a MK je zvýšená exprese delta-11 desaturázy ACD11DS, avšak ta má pravděpodobně roli hlavně při tvorbě prekurzorů ve feromonových žlázách <sup>1156</sup>. ACD11DS je zároveň přítomna v modulu Blue, negativně asociovaném s SK. U D a MK je také zvýšená exprese LCACL4 tedy ligázy dlouhých mastných kyselin a CoA. Ta má preferenci k arachidonové (AA) a eicosapentaénové kyselině (EPA), obě patřící mezi PUFA. Snižuje tedy v organismu množství jejich volných neesterifikovaných forem a zvyšuje jejich zastoupení v membránových fosfolipidech a triacylglycerolech <sup>843–845,1157</sup>. Zároveň tím i zamezuje tvorbě eicosanoidů, jejichž jsou prekurzorem <sup>1158</sup>. Další ligázu dlouhých mastných kyselin ELOVL6 <sup>952,953</sup>, nasyčených i nenasycených, nalezneme také v modulu Pink. Mezi eicosanoidy patří látky jako prostaglandiny, leukotrieny a další podobné látky, které mají jak pro-, tak proti-zánětlivé účinky. Zatímco eicosanoidy odvozené z eicosapentaénové kyseliny jsou spojovány především s proti-zánětlivými účinky, tak eicosanoidy odvozené z AA jsou spojovány především s pro-zánětlivými účinky. Ovšem i mezi AA eicosanoidy nalezneme proti-zánětlivé zástupce. Podrobnější popis těchto látek naleznete ve člancích Sonnweber et al. 2018, Bennet a Gilroy 2016 a Calder 2006 <sup>1159–1161</sup>. Poměr EPA:AA v organismu může být využíván jako ukazatel chronického zánětu ve stáří, kdy nízký poměr značí riziko mnoha

onemocnění<sup>1162,1163</sup>. Zvýšený příjem  $\omega$ -3  $\alpha$ -linolenové kyseliny, prekursoru EPA, zvyšuje délku života u *C. elegans*<sup>1164</sup>. Ovšem i zvýšený příjem AA a  $\omega$ -6 linolové kyseliny, prekursor AA, vedl k prodloužení života *C. elegans*, přičemž tento efekt je spojený s aktivací autofágie<sup>1165</sup>. Zároveň neesterifikovaná intra-celulární AA indukuje apoptózu<sup>1166</sup>. Za zvýšeným množstvím volné AA v organismu by pak mohli stát dvě PLA2<sup>874,875</sup> se zvýšenou expresí u SK. Z AA jsou také syntetizovány epoxyeicosatrienové kyseliny (EET), fungující jako hormony krátkého dosahu a spojovány jsou především s regulací krevního tlaku a také možnou proti-zánětlivou funkcí v krevních cévách. Inaktivovány jsou pomocí epoxid hydrolázy 2<sup>1167,1168</sup>. Mezi našimi DEG je u EPH4 exprimovaná ve formě D > SK > MK, ovšem o jeho funkci není příliš známo a je otázka, zda má podobné funkční vlastnosti jako EPH2. EET jsou z AA tvořeny pomocí skupiny CYP nazývané cytochrom p450 epoxygenázy<sup>1169-1172</sup>. Mezi našimi DEG nalezneme čtyři odlišně exprimované CYP, ovšem ani jeden z nich pravděpodobně nepatří do skupiny epoxygenáz. U D je zvýšená exprese ApoD. ApoD je schopen zabraňovat oxidaci volně cirkulující AA a také hydrolýze membránové AA<sup>852,853</sup>. Pravděpodobně tak zabraňuje působení PLA2. Vysoká exprese ApoD u člověka zvyšuje odolnost k oxidačnímu stresu snižuje akumulaci peroxidovaných lipidů a u myši navíc zvyšuje délku života<sup>846-849</sup>. Drozofilí homology Glaz a Nlaz také prodlužují délku života a potlačují dopady oxidačního stresu<sup>850,851,1173,1174</sup>. Krom ApoD jsou některé vzácnější alely ApoE jsou spojené s dlouhověkostí u lidí<sup>854</sup>. U D je navýšena exprese proteinu osahujícího domény ApoE a ApoA.

Mezi DEG bylo nalezeno několikero lipáz. Elip má sníženou expresi u MK a SK oproti D. Je aktivní proti TAG a HD lipoproteinům a zároveň vykazuje fosfolipázovou aktivitu<sup>841,842</sup>. Její exprese je spojována s rakovinou prsu, kde v reakci na oxidační stres dochází ke zvýšení její exprese a následné akumulaci lipidických kapének v buňkách a zvýšené odolnosti vůči oxidačnímu stresu<sup>1175</sup>. Exprese Lip3 je navýšena také u D oproti králům. Je aktivní vůči TAG a má také fosfolipázovou aktivitu<sup>863,864</sup>. U drozofily se její exprese zvyšuje během hladovění a stárnutí, její mutace se spojena s vyšší odolností k hladovění a delším životem<sup>863</sup>. Lidský ortholog lysozomální kyselá lipáza (LPA) je aktivní vůči TAG a cholesteryl-esterům. Jeho deficiencie je spojená s Wolmanovou chorobou a chorobou v ukládání cholesterol-esterů<sup>1176,1177</sup>. Glip a PLip-RP2 jsou spojené především s hydrolýzou dietárních TAG<sup>878,881</sup>. Například u myši dochází s věkem spojenému poklesu exprese a aktivity pankreatické lipázy, což vede k poklesu absorpce lipidů<sup>1178</sup>.

Pro beta-oxidaci je důležitý karnitin, využívaný pro přenos mastných kyselin přes mitochondriální membrány<sup>1179,1180</sup>. Na jeho tvorbě se podílejí GBBD a TMLD<sup>861,862</sup> se zvýšenou expresí u D oproti SK. Beta-oxidace je přitom spojena s dlouhověkostí a k poklesu její aktivity dochází během stárnutí<sup>1181–1184</sup>. L-karnitin je také znám pro svoje dlouhověkost podporující účinky, hlavně co se týče protekce nervové soustavy a protizánětlivých účinků<sup>1185–1189</sup>. V modulu Pink, pozitivně asociovaném s MK, pak nalezneme SCL22A1 zprostředkovávající transport acyl-karnitinu<sup>951</sup>. Zvýšená exprese acetyl-CoA syntázy 2 u *C. elegans* vede k aktivaci mitochondriální beta-oxidace, což vede k prodloužení života<sup>1190,1191</sup>. U MK a SK je vzhledem k tomu zvýšená exprese již zmiňované LCACL4 a u D také exprese MCACL-ACSF2.

Adiponectin je hormon tukové tkáně, který je spojován s prodloužením života, zvýšenou insulinovou sensitivitou, protizánětlivými účinků, a navýšením beta-oxidace (popsáno v článku Nedvídková et. al 2005<sup>877</sup>). Působí skrze své receptory, přičemž u králů je oproti D mírně zvýšená exprese AdipoR<sup>876,877</sup>. Ovšem adiponektin je spojován i s negativními efekty a jeho vysoké hladiny doprovází nízká hustota svalů a špatná fyzická kondice<sup>1192–1195</sup>. V rozporu se zvýšenou expresí AdipoR u D je v modulu Turquoise, negativně asociovaném s D, přítomna E3 ubiquitin ligáza RNF170, která by degradací inositoltrifosfát receptoru mohla zabránit aktivaci CAM II kinázy, která zase může inhibovat sekreci adiponektinu<sup>912,914</sup>.

Změny v metabolismu ceramidů a sfingolipidů mají také dopad na délku života u modelových organismů<sup>1196</sup>. Mezi našimi DEG je u D a MK více exprimovaná GBA, která hydrolyzuje glukosylceramidy na volné ceramidy a glukózu<sup>590,592</sup>. Během stárnutí dochází k poklesu její aktivity v mozku myši a její nedostatečná aktivita je i spojena s Parkinsonovo nemocí<sup>1197,1198</sup>. Zároveň interference genu pro glukosylceramid syntázu, která naopak stojí za tvorbou glukosylceramidů, prodlužovala život *C. elegans*<sup>1199</sup>. Je tedy možné, že zvýšená exprese GBA u D a MK je výhodou při jejich stárnutí. GBA je zároveň součástí modulu Blue, negativně asociovaného s SK.

DHCR24 se zvýšenou expresí u D se účastí přeměny dietárně přijímaných fytosterolů na cholesterol<sup>856,857</sup>. Přítomné jsou u D také zvýšené exprese APOD, APOA\_E a jen oproti SK i APOphorinů, kteří se podílí na transportu cholesterolu<sup>1200–1202</sup>. Apophoriny jsou i součástí modulu blue, negativně regulovaného s SK. Ovšem SOAT1, vytvářející cholesterol estery<sup>879,880</sup>, je více exprimovaná u SK oproti D a je součástí modulu Turquoise negativně

asociovaného s D. MTTP zajišťující transport triglyceridů a cholesterol esterů mezi buněčnými membránami <sup>868-870</sup> je více exprimovaná u MK oproti SK.

DHRS11 se podílí na tvorbě steroidních hormonů <sup>824,1203</sup>, přičemž je jeden více exprimovaný u D oproti SK a druhý u SK oproti MK i D. Expres CYP304a1 a CYP302a1 zvýšené u D, CYP4g15 zvýšené u MK oproti D a CYP6a14 zvýšené u MK oproti SK se pak pravděpodobně podílí na syntéze ecdysteroidů <sup>882,883</sup>. CYP304a1 je také součástí modulu Purple, pozitivně asociovaného s D. Mezi diferenciallyně exprimovanými proteiny v porovnání D oproti SK je pak obohacená genová ontologie Procesy steroidního metabolismu. V rámci modulu Turquoise, negativně asociovaného s D, ještě nalezneme proteiny TMEM135 a ACLY. Delece genu TMEM135 vedla u *C. elegans* ke snížení tukových zásob spojených s redukcí akčního potenciálu mitochondriální membrány a snížením délky života <sup>906</sup>. ACLY pak katalyzuje štěpení citrátu na oxalacetát a acetyl-CoA, který je dále využívám pro syntézu lipidů <sup>909,910</sup>.

Syntéza JH hormonu je navázána na mevalonátovou dráhu <sup>527,1204</sup>. HMGCS-1 je horním komponentem této dráhy a jeho exprese je zvýšená u SK oproti D. Přibližně ve středu mevalonátové dráhy pak působí GGPS. Dva GPPS geny mají zvýšenou expresi u SK i MK, jeden u SK a jeden u MK. GGPS [3] je pak také součástí modulu Green, pozitivně asociovaného s SK a v rámci proteinů diferenciallyně exprimovaných mezi D a SK je obohacená genová ontologie Proces biosyntézy isoprenoidů. Ovšem exprese MFE, který přímo stojí za syntézou JH III <sup>453,527</sup>, je zvýšená pouze u MK při porovnání s SK. Dá se říci, že tyto výsledky korelují s výsledky Korb et. al 2021, kdy z TOR/ISS-JH sítě byly u reproduktivců více exprimovány její dolní komponenty, tedy komponenty JH signalizace. To doplňuje i exprese receptoru allostatinu, která byla zvýšená u D oproti MK, protože allostatin je schopný inhibovat syntézu JH <sup>840</sup>. Avšak tomu už tolik neodpovídají exprese vitellinogeninů. Vg6 je více exprimovaný u D a Vg2 naopak u MK. Vitellogenin receptor je pak více exprimovaný u D oproti SK. V modulu Blue, negativně asociovaném s SK, je také přítomen protein LASP, který u *Aedes aegypti* po skončení vitellinogeneze degraduje proteiny stojící za syntézou vitellogeninu <sup>947</sup>. Navíc je ve velké míře u D a MK zvýšená exprese dvou hexamerinů, které jsou exprimovány v odpovědi na JH, avšak jeho funkci sekvestrují <sup>470,833</sup>. Tyto dva hexameriny jsou také součástí modulu Blue, negativně asociovaného s SK. To samé platí i o NPA se zvýšenou expresí u D <sup>838</sup>. S přítomností JH u D a MK by mohla souviset i zvýšená exprese HJHB <sup>835</sup>. Takže se zdá, že komponenty dráhy stojící za syntézou JH jsou více aktivní u králů, s přihlédnutím k tomu MFE má zvýšenou



expresi pouze u MK. Ale exprese proteinů, které se zvedají v odpovědi na JH a naznačují tak i jeho zvýšenou hladinu v organismu, jsou zvýšené u MK a D. U D v rámci této odpovědi dochází ale k inhibici syntézy a aktivity JH. Pokud opomeneme vliv JH na kastovní diferenciaci, mohla by snížená hladina JH u SK být jistým opatřením, zabraňujícím škodlivým vlivům JH ve stáří.

V GO enrichmentech jak diferenciólně exprimovaných proteinů, tak WGCNA modulů narazíme i na glykolytický proces. Proteiny související s glykolýzou nebyly v rámci této práce sledovány, avšak i změny v regulaci glykolýzy by mohly souviset se stárnutím<sup>1205-1207</sup>, a proto by bylo dobré se v budoucím výzkumu věnovati i tomuto. Silně obohacenými genovými ontologiemi jsou proces katabolismu polysacharidů a proces metabolismu karbohydrátů. Ty ale spíše budou souviset s další silně obohacenou genovou ontologií proces katabolismu celulózy nežli s glykolýzou. Proteiny související s pochody v nervové soustavě a jejím vývojem také nebyly v rámci této práce sledovány, ovšem zaznamenali jsme jich mezi diferenciólně exprimovanými proteiny a modulovými HUB geny celou řadu. Protože změny v nervové soustavě jsou spojené se stárnutím a celou řadou stařeckých nemocí<sup>1208-1210</sup>, bylo by také vhodné jim v budoucnu věnovat pozornost.

## 6. Závěr

Mezi dělníky, mladými a starými neotenickými králi termita *Prorhinotermes simplex* se podařilo odhalit řadu diferenciólně exprimovaných genů s potenciálním vlivem na odlišnou délku života mezi těmito reprodukčními a nereprodukčními kastami. Velká část těchto diferenciólně exprimovaných genů souvisí s udržováním somatické integrity, přičemž se jedná především o odpověď na oxidační stres, odpověď na poškození DNA, regulaci mitofágie, autofágie a apoptózy a také udržení proteinové homeostáze. Jako středobod těchto pochodů se zdá být odlišná regulace aktivity proteinu p53 a jeho signalizace. Diferenciólně exprimované geny zapojené do zmíněných pochodů jsou povětšinou více exprimované u dělníka a mladého krále v porovnání se starým králem. Odlišnost v expresích mezi dělníkem a mladým králem není tak výrazná jako mezi dělníkem a starým králem, což pravděpodobně souvisí s nízkým věkem mladých neotenických králů a tedy jejich nedávným přechodem z dělníka na reproduktivce. Vyšší exprese genů souvisejících s obranou proti oxidačnímu stresu, odpovědi na poškození DNA a regulací mitofágie/autofágie u dělníka

naznačuje, že si, v souladu s předchozími výzkumy na termitovi *Cryptotermes secundus*, i totipotentní dělníci *P. simplex* uchovávají potenciál pro dlouhověkost, na rozdíl od „pravých“ dělníků vyšších termitů.

Mezi kastami navíc pravděpodobně dochází i k odlišné regulaci imunitního systému, ale není jednoduché usoudit, zda je u jedné či druhé kasty imunitní odpověď posilována či utlumována. Také byla zaznamenána diferenciální exprese genů souvisejících s lipidickým metabolismem. V souvislosti s oxidačním stresem stojí za zmínku u mladého krále zvýšená exprese genů souvisejících s tvorbou mono-nenasycených a poly-nenasycených mastných kyselin (z důvodu náchylnosti PUFA k peroxidaci) a také pravděpodobná vyšší produkce volné arachidonové kyseliny u starého krále v souvislosti s jejím vlivem na apoptózu a zánětlivé reakce.

V budoucích pokusech by bylo vhodné rozlišovat krom stáří reprodukčních jedinců i stáří dělníků. To v tomto případě nebylo provedeno a ve výsledcích je patrná vyšší heterogenita v expresích mezi jednotlivými vzorky dělníků. K tomu zřejmě přispívá i fakt, že u dělníků nebylo rozlišováno pohlaví, zatímco u reproductivců byli použiti jen samečci. Také je potřeba připomenout, že *P. simplex* je nemodelový druh, což se projevilo například na úspěšné anotaci pouze 48,5% transkriptů v referenčním transkriptomu a je tedy velmi pravděpodobné, že mi řada důležitých změn v expresích zůstala zahalena. Proto je dobré tyto výsledky porovnávat s výsledky jiných studií na známějších, více využívanějších termitích druzích s podobným kastovním uspořádáním, jako je například *Cryptotermes secundus* a také tento pokus na těchto druzích v budoucnu replikovat.

## 7. Seznam zkratek

<b>14-3-3-3</b> - 14-3-3 protein 3	<b>BIRC5</b> - baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5	<b>DN-p53</b> - dominantně negativní forma p53	<b>HAUS3_N</b> - HAUS augmin-like complex subunit 3
<b>AA</b> - arachidonová kyselina	<b>BMP</b> - Bone morphogenetic protein	<b>Dpp</b> - Decapentaplegic	<b>HEX</b> - Hexamerin
<b>ACD11DS</b> - Acyl-CoA Delta(11) desaturase	<b>BPHL</b> - Biphenyl hydrolase-like protein	<b>DR</b> - dietární restrikce	<b>HGSNAT</b> - Heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase
<b>ACDS</b> - Acyl-CoA desaturase	<b>BRCA1</b> - tumor supresorový gen rakoviny prsu 1 (breast cancer 1)	<b>DSB</b> - dvouřetězcové zlomy DNA (double strand breaks)	<b>HJHB</b> - Hemolyph JH binding protein
<b>ACLY</b> - ATP citrate lyase	<b>BRCA1</b> - tumor supresorový gen rakoviny prsu 1 (breast cancer 1)	<b>E2-F1</b> - E2F transkripční faktor 1	<b>HMGCS-1</b> - Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase 1
<b>ACrPI</b> - Allergen Cr-PI	<b>BUSCO</b> - Benchmarking Universal Single-Copy Orthologs	<b>EET</b> - epoxyeicosatrienová kyselina	<b>HR</b> - homologní rekombinace
<b>AdipoR</b> - Adiponectin receptor	<b>Calmyrin</b> - Calcium and integrin-binding protein 1	<b>EF1a</b> - Elongation factor-1-alpha	<b>Chk2</b> - Serine/threonine-protein kinase Chk2
<b>AGE</b> - pokročilé produkty glykace (advanced glycation end products)	<b>CAM II</b> - Ca2+/calmodulin dependentní protein kináza II	<b>EFHC2</b> - EF-hand domain-containing family member c2	<b>Chp1</b> - Calcineurin B homologous protein 1
<b>AKR1A1</b> - Aldo-keto reductase family 1 member A1	<b>CYP</b> - Cytochrome P450	<b>ELip</b> - Endothelien lipase	<b>IDH3A</b> - Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit alpha
<b>AKT</b> - AKT kináza	<b>Cat</b> - kataláza	<b>ELOVL6</b> - Elongation of very long chain fatty acids protein 6	<b>IGF</b> - inzulin-like růstový faktor
<b>AMN</b> - Protein amnionless	<b>CCKR</b> - Cholecystokinin receptor	<b>EPA</b> - eicosapentaénová kyselina	<b>IIS</b> - inzulin/insulin-like růstový faktor signalizační dráha
<b>AMP</b> - adenosinmonofosfát	<b>CDK</b> - cyklin-dependentní kináza	<b>EPH</b> - epoxid hydroláza	<b>IMD</b> - Immune deficiency signalizace
<b>AMPK</b> - AMP aktivovaná kináza	<b>CENPE</b> - Centromere-associated protein E	<b>ERK</b> - extracelulární signál regulující kinázy	<b>JAK/STAT</b> - Janus kinázy / Signální přenašeč a aktivátor transkripcce
<b>AMT-1</b> - Putative amonium transporter 1	<b>CGL</b> - Cystathionine gamma-lyase	<b>EXOSC9</b> - Exosome component 9	<b>JH</b> - juvenilní hormon
<b>ANOS1</b> - Anosmin 1	<b>CKAP2_C</b> - Cytoskeleton associated protein 2-c terminus	<b>FAHFAH AIG1</b> - Fatty acid esters of hydroxy fatty acids hydrolase AIG1	<b>JNK</b> - c-Jun N-terminální kinázy
<b>ANT2BP</b> - ANT2-binding protein	<b>COMM2</b> - Protein commissureless 2 homolog	<b>FBN</b> - Fibrillin	<b>K.in</b> - intramodulární konektivita
<b>AP</b> - antimikrobiální peptidy	<b>CP</b> - centrálně sídlící termity (central piece nesting)	<b>FBXL7</b> - F-box/LRR-repeat protein 7	<b>KEGG</b> - Kyoto Encyclopedia of genes and Genomes
<b>APO</b> - Apolipoprotein	<b>CR</b> - kalorická restrikce (caloric restriction)	<b>FDR</b> - false discovery rate	<b>KIF14</b> - Chromosome-associated kinesin KIF14
<b>APOphoriny</b> - Apolipophorins	<b>CR</b> - kalorická restrikce (caloric restriction)	<b>FOXM</b> - forkhead box protein M	<b>KIF20A</b> - Kinesin-like protein KIF20A
<b>APP</b> - Amyloid-beta A4	<b>Cut8</b> - Cut8 nuclear proteasome tether protein	<b>FOXO</b> - forkhead box O transkripční faktor	<b>KIF20A</b> - Kinesin-like protein KIF20A
<b>AR</b> - Allostatin-A receptor	<b>CWF19L2</b> - CWF19-like protein 2	<b>FOXP1</b> - Forkhead box protein P1	<b>Kn1_RWD_C</b> - kn1 rwd c-terminal domain
<b>ARNTL1</b> - Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1	<b>CYB561D2</b> - Transmembrane reductase CYB561D2	<b>FTZF1-β</b> - Nuclear hormon receptor FTZ-F1 beta	<b>LASP</b> - Lysosomal aspartic protease
<b>ARPC3-b</b> - Actin-related protein 2/3 complex subunit 3-B	<b>Cyc</b> - cyklin	<b>GAPDH</b> - Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,	<b>LCACL4</b> - Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 4
<b>ARRDC4</b> - Arrestin domain-containing protein 4	<b>D</b> - dělník	<b>GBA</b> - Acid beta-glucosidase	<b>LCC</b> - laccase
<b>Arsb</b> - Arylsulfatase B	<b>Daf-16</b> - Caenorhabditis elegans FOXO ortholog	<b>GBBD</b> - Gamma-butyrobetaine dioxygenase	<b>Lip</b> - lipáza
<b>ASF1</b> - Histon chaperon asf1	<b>DAP-5</b> - Disk large-associated protein 5	<b>GBP</b> - Beta-1,3-glucan binding protein	<b>LIRP</b> - Locusta insulin-related peptid
<b>ASK</b> - apoptosis signal-regulating kinase	<b>DAVID</b> - Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery	<b>GGPS</b> - Geranylgeranyl pyrophosphate synthase / Farnesyl diphosphate synthase	<b>Log2FC</b> - log <sub>2</sub> fold change
<b>ASP</b> - Protein abnormal spindle	<b>Daw</b> - Dawdle	<b>Glaz</b> - Glial Lazarillo, Drosophila melanogaster APOD ortholog	<b>LPA</b> - lysozomální kyselá lipáza
<b>ATM</b> - Ataxia-telangiectasia mutated serin/threonin kinase	<b>dbi-1</b> - Caenorhabditis elegans TGF ortholog	<b>Glip</b> - Gastric triacylglycerol lipase	<b>LPS-BP</b> - Hemolymph lipopolysaccharid-binding protein
<b>ATR</b> - s ataxii telangiectasii a s Rad3 související protein	<b>DFP-3</b> - Putative defense protein 3	<b>GLMP</b> - Glycosylated lysosomal membrane protein	<b>LRP4</b> - Low-density lipoprotein receptor-related protein 4
<b>AURKA</b> - Aurora kinase A	<b>DHCR24</b> - Delta(24)-sterol reductase	<b>GO</b> - genové ontologie	<b>LSZ</b> - Lysozyme
<b>BAD</b> - BCL2 associated agonist of cell death	<b>DHRS11</b> - Dehydrogenase/reductase SDR family member 11	<b>GS</b> - genová signifikance	<b>LZTS2</b> - Leucin zipper putative tumor suppressor 2 homolog
<b>BAMBI</b> - BMP and Activine membrane-bound inhibitor homolog	<b>DJIA</b> - Protein DJ-1 homolog A	<b>GST1</b> - Gluthathion S-transferase 1-1	<b>MAD</b> - MAD protein homolog
<b>BAX</b> - BCL2-like protein 4	<b>DNA-PKcs</b> - katalitická podjednotka DNA-dependentních protein kináz	<b>GWL</b> - Serine/threonine kinase greatwall	<b>MAGEL2</b> - MAGE-like protein 2
<b>BCL2L-L</b> - BCL2-like protein L			<b>MAPK</b> - mitogeny aktivované proteinkinázy
<b>BCL2L-S</b> - BCL2-like protein S			

<b>MCACL-ACSF2</b> - Medium-chain acyl-CoA ligase	<b>Nuf2</b> - Kinetochor protein Nuf2	<b>RAN - GTP-binding nuclear protein Ran</b>	<b>Sulf_transp</b> - Sulphur transport domain
<b>Mcl-1</b> - Induced myeloid leukemia cell differentiation protein	<b>NuSAP1</b> - Nucleolar and spindle-associated protein	<b>RAPTOR</b> - Regulatory-associated protein of mTOR	<b>TE</b> - transpozibilní elementy
<b>MDM</b> - Mouse Double Minute homolog	<b>OBST-E</b> - Obstructor-E	<b>Ras</b> - Rat sarcoma virus proteins	<b>Tech-5B</b> - Techylectin-5B
<b>ME</b> - modul eigengene	<b>OK</b> - starý neotenický král (old king)	<b>RBM25</b> - RNA-binding protein 25	<b>TGF-β</b> - transformující růstový faktor beta
<b>MECOM-B</b> - MDS1 and EVI1 complex locus protein EVI2-B	<b>OP</b> - termiti sídící v jednom kusu (one piece nesting)	<b>RNAseq</b> - RNA sekvenace	<b>THRIN</b> - Thrombin inhibitor anophelin
<b>MFE</b> - Methyl farnesoate epoxidase	<b>PARD6B</b> - Partitioning defective 6 homolog beta	<b>RNF</b> - E3 ubiquitin-protein ligase RNF	<b>TLR13</b> - Toll-like receptor 13
<b>MK</b> - mladý neotenický král	<b>PCA</b> - principle component analýza	<b>RNH2-A</b> - Ribonuclease H2 subunit A2	<b>TMEM135</b> - Transmembrane protein 135 L homolog
<b>MKRNL_C</b> - E3 ubiquitin-protein ligase makorin	<b>PEBP1</b> - Phosphatidylethanolamine binding protein 1	<b>ROS</b> - reaktivní formy kyslíku (reactive oxygen species)	<b>TMLD</b> - Trimethyllysine dioxygenase
<b>MM</b> - module membership	<b>PGC1alpha</b> - proliferace aktivovaný koaktivátor receptoru gama 1 alpha	<b>RPABC3</b> - DNA-directed RNA polymerases I, II and III subunit RPABC3	<b>TOM</b> - matice topologického překryvu (topological overlap matrix)
<b>MP</b> - termiti sídící v mnoha kusech (multiple piece nesting)	<b>Pglrp3</b> - Peptidoglycan recognition protein 3	<b>RpL9</b> - 60s ribosomal protein L9	<b>TPX2</b> - Targeting protein for Xklp2 homolog
<b>MUFA</b> - mono-nenasycené mastné kyseliny (mono-unsaturated fatty acids)	<b>PHAX</b> - Phosphorylated adapter RNA export protein	<b>RpS26</b> - 40s ribosomal protein S26-A	<b>TRAP-α</b> - Translocon-associated protein subunit alpha
<b>mRNA</b> - messenger RNA	<b>PGRP</b> - Peptidoglycan recognition protein	<b>RPUSD2</b> - RNA pseudouridylylase synthase domain-containing protein 2	<b>TRET1</b> - Facilitated trehalose transporter TRET1
<b>mtDNA</b> - mitochondriální DNA	<b>PI3K</b> - fosfatidylinositol-3-kináza	<b>RSPH1</b> - Radial spoke head 1 homolog	<b>TSC2</b> - Tuberous Sclerosis Complex 2
<b>MtFMT</b> - Methionyl-tRNA formyltransferase	<b>PINK1</b> - PTEN-induced kinase 1	<b>S6KL</b> - Serine/threonine protein kinase S6KL	<b>Ttpal</b> - Alpha-tocopherol transfer protein-like
<b>mTOR</b> - mammalian Target of Rapamycin	<b>PKCL1</b> - Protein kinase c-like 1	<b>SCDS4</b> - Stearoyl-CoA desaturase 4	<b>Tuba</b> - Tubulin alpha chain
<b>MTTP</b> - Microsomal triglycerid transfer protein large subunit	<b>PLA2</b> - Phospholipase A2	<b>SCRT1</b> - Transcriptional repressor scratch 1	<b>TubB</b> - Tubulin beta chain
<b>NABP-Xe1</b> - Nucleic-acid binding protein from transposon X-element	<b>PLip-RP2</b> - Pancreatic lipase-related protein 2	<b>Siah</b> - seven in absentia homolog	<b>Ucp2</b> - Mitochondrial uncoupling protein 2
<b>NAD+</b> - nikotinamid adenin dinukleotid	<b>POC1A</b> - POC1 centriolar protein homolog A	<b>SINA-TRAF</b> - Seven in absentia protein family	<b>UGT</b> - UDP-glucuronosyltransferase
<b>ND1</b> - NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	<b>POL-412</b> - Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon 412	<b>Sirt</b> - sirutiny	<b>UP-KW</b> - UniProt Keywords
<b>NDC80</b> - Kinetochor protein NDC80 homolog	<b>POL-JOCKEY</b> - RNA directed DNA polymerase from mobile element jockey	<b>SK</b> - starý neotenický král	<b>Uro</b> - Uricase
<b>ndor1</b> - NADP-dependent diflavin oxidoreductase 1	<b>POLO</b> - Serine/threonine-protein kinase polo	<b>Skeletor</b> - Protein Skeletor	<b>usp30</b> - Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 30
<b>NEC1</b> - Neuroendocrine convertase 1	<b>PP2A</b> - proteinová fosfatáza 2A	<b>SLC22A1</b> - Solute carrier family 22 membr 1	<b>Vg</b> - vitellogeniny
<b>NEK6</b> - NIMA-related kinase 6	<b>PRAS40</b> - Proline-rich Akt substrate of 40 kDa	<b>SLCO4A1</b> - Solute carrier organic anion transporter family 4a1	<b>VgR</b> - vitellogenin receptor
<b>NF-κB</b> - nukleární faktor kappa B	<b>PRC1</b> - Protein regulator of cytokinesis 1	<b>SMOX</b> - Spermine oxidase	<b>W</b> - dělník (worker)
<b>NHEJ</b> - nehomologní spojování konců (Non-homologous end joining)	<b>Profilin</b> - Profilin	<b>sn-RNA</b> - small nuclear RNA	<b>WGCNA</b> - analýza vážené genové ko-expressní sítě (Weighted gene co-expression network analysis)
<b>NID1</b> - Nidogen-1	<b>PRR</b> - patern rozeznávající receptory	<b>SOAT1</b> - Sterol O-acyltransferase 1	<b>Wnt</b> - Wingless/Int-1 signalizace
<b>NINJI</b> - Ninjurin-1	<b>Prx</b> - peroxiredoxin	<b>SOD</b> - superoxid dismutáza	<b>YK</b> - mladý neotenický král (young king)
<b>Nlaz</b> - Neural Lazarillo, Drosophila melanogaster APOD ortholog	<b>PUBB</b> - Polyubiquitin-B	<b>Spc29</b> - Spindle pole component 29	<b>YWHAB-A</b> - 14-3-3 protein beta/alpha-A
<b>Nlp</b> - Nucleoplasmin-like	<b>PUFA</b> - poly-nenasycené mastné kyseliny (poly-unsaturated fatty acids)	<b>SPZ</b> - Spaetzle	<b>Znf_RING</b> - Ring finger domain
<b>NPA</b> - Neuroparsin-A	<b>RACK1</b> - Receptor of activated protein kinase C	<b>Src</b> - proto-oncogene tyrosine-protein kinase Sarcoma	<b>ZNF543</b> - Zinc finger protein 543
<b>NT1</b> - Neurotrophin 1	<b>RAD51</b> - Radiation sensitive protein	<b>STING</b> - Stimulator of Interferon Genes signalizace	

## 8. Literatura

1. Kirkwood TBL, Austad SN. Why do we age? *Nature*. 2000;408(6809):233-238. doi:10.1038/35041682
2. Goldberger AL, Peng C-K, Lipsitz LA. What is physiologic complexity and how does it change with aging and disease? *Neurobiol Aging*. 2002;23:23-26.
3. Libertini G. An adaptive theory of increasing mortality with increasing chronological age in populations in the wild. *J Theor Biol*. 1988;132(2):145-162. doi:10.1016/s0022-5193(88)80153-x
4. Martínez DE. Mortality patterns suggest lack of senescence in hydra. *Exp Gerontol*. 1998;33(3):217-225. doi:10.1016/s0531-5565(97)00113-7
5. Jones OR, Scheuerlein A, Salguero-Gómez R, et al. Diversity of ageing across the tree of life. *Nature*. 2014;505(7482):169-173. doi:10.1038/nature12789
6. Troen BR. The biology of aging. *Mt Sinai J Med*. 2003;70(1):3-22.
7. Hughes KA, Reynolds RM. Evolutionary and Mechanistic Theories of Aging. *Annu Rev Entomol*. 2005;50(1):421-445. doi:10.1146/annurev.ento.50.071803.130409
8. Weinert BT, Timiras PS. Invited Review: Theories of aging. *J Appl Physiol*. 2003;95(4):1706-1716. doi:10.1152/jappphysiol.00288.2003
9. Hamilton WD. The moulding of senescence by natural selection. *J Theor Biol*. 1966;12(1):12-45.
10. Piedrafita G, Keller MA, Ralser M. The Impact of Non-Enzymatic Reactions and Enzyme Promiscuity on Cellular Metabolism during (Oxidative) Stress Conditions. *Biomolecules*. 2015;5(3):2101-2122. doi:10.3390/biom5032101
11. Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, et al. Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. *Int J Mol Sci*. 2014;16(1):193-217. doi:10.3390/ijms16010193
12. Dizdaroglu M. Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res*. 1992;275(3-6):331-342. doi:10.1016/0921-8734(92)90036-o
13. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11(3):298—300. doi:10.1093/geronj/11.3.298
14. Novo E, Parola M. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2008;1(1):5. doi:10.1186/1755-1536-1-5
15. Zelickson BR, Ballinger SW, Dell'Italia LJ, Zhang J, Darley-USmar VM. Reactive Oxygen and Nitrogen Species: interactions with mitochondria and pathophysiology. Published online 2013.
16. Sergiev P V., Dontsova OA, Berezkin G V. Theories of aging: An ever-evolving field. *Acta Naturae*. 2015;7(1):9-18.
17. Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L. Molecular biology of aging. *Cell*. 1999;96(2):291-302. doi:10.1016/s0092-8674(00)80567-x
18. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem*. 1989;264(14):7761-7764.
19. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science (80- )*. 1996;273(5271):59-63.
20. Fleming JE, Miquel J, Cottrell SF, Yengoyan LS, Economos AC. Is cell aging caused by respiration-dependent injury to the mitochondrial genome? *Gerontology*. 1982;28(1):44-53.
21. Linnane AW, Zhang C, Baumer A, Nagley P. Mitochondrial DNA mutation and the ageing process: bioenergy and pharmacological intervention. *Mutat Res*. 1992;275(3-6):195-208.
22. Ozawa T. Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev*. 1997;77(2):425-464.
23. Alexeyev MF. Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species? *FEBS J*. 2009;276(20):5768-5787. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07269.x
24. Fuentes-Lemus E, Häggglund P, López-Alarcón C, Davies MJ. Oxidative Crosslinking of Peptides and Proteins:

- Mechanisms of Formation, Detection, Characterization and Quantification. *Mol* . 2022;27(1). doi:10.3390/molecules27010015
25. Repetto MG, Ferrarotti NF, Boveris A. The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation. *Arch Toxicol*. 2010;84(4):255-262. doi:10.1007/s00204-009-0487-y
  26. Repetto M. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. In: Semprine J, ed. IntechOpen; 2012:Ch. 1. doi:10.5772/45943
  27. Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J*. 1984;219(1):1-14. doi:10.1042/bj2190001
  28. Schapira AH V, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 1990;54(3):823-827.
  29. Kietzmann T, Petry A, Shvetsova A, Gerhold JM, Görlach A. The epigenetic landscape related to reactive oxygen species formation in the cardiovascular system. *Br J Pharmacol*. 2017;174(12):1533-1554. doi:10.1111/bph.13792
  30. Afanas'ev I. New nucleophilic mechanisms of ros-dependent epigenetic modifications: comparison of aging and cancer. *Aging Dis*. 2014;5(1):52-62. doi:10.14336/AD.2014.050052
  31. Gentilini D, Mari D, Castaldi D, et al. Role of epigenetics in human aging and longevity: genome-wide DNA methylation profile in centenarians and centenarians' offspring. *Age (Dordr)*. 2013;35(5):1961-1973. doi:10.1007/s11357-012-9463-1
  32. Hedman ÅK, Zilmer M, Sundström J, Lind L, Ingelsson E. DNA methylation patterns associated with oxidative stress in an ageing population. *BMC Med Genomics*. 2016;9(1):72. doi:10.1186/s12920-016-0235-0
  33. Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2018;12(3):88-93. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29896077>
  34. Sarıkaya E. Glutathione Peroxidase in Health and Diseases. In: Bagatini SDE-MD, ed. IntechOpen; 2020:Ch. 3. doi:10.5772/intechopen.91009
  35. Shuvaeva T, Novoselov V, Fesenko E, Lipkin V. Peroxiredoxins, a new family of antioxidant proteins. *Bioorg Khim*. 2009;35:581-596. doi:10.1134/S106816200905001X
  36. Nandi A, Yan L-J, Jana CK, Das N. Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. Signorini C, ed. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:9613090. doi:10.1155/2019/9613090
  37. Melov S, Ravenscroft J, Malik S, et al. Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics. *Science*. 2000;289(5484):1567-1569. doi:10.1126/science.289.5484.1567
  38. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, et al. Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science*. 2005;308(5730):1909-1911. doi:10.1126/science.1106653
  39. Gems D, Partridge L. Genetics of longevity in model organisms: debates and paradigm shifts. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:621-644. doi:10.1146/annurev-physiol-030212-183712
  40. Edrey YH, Salmon AB. Revisiting an age-old question regarding oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2014;71:368-378. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.038
  41. Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, et al. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem*. 1997;272(26):16644-16651. doi:10.1074/jbc.272.26.16644
  42. Cabreiro F, Ackerman D, Doonan R, et al. Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans* is not caused by decreased oxidative damage. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(8):1575-1582. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.07.020
  43. Miki H, Funato Y. Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species. *J Biochem*. 2012;151(3):255-261. doi:10.1093/jb/mvs006
  44. Ray PD, Huang B-W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal*. 2012;24(5):981-990. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008

45. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012;48(2):158-167. doi:10.1016/j.molcel.2012.09.025
46. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J*. 2010;429(3):403-417. doi:10.1042/BJ20100323
47. Lee S-J, Hwang AB, Kenyon C. Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Curr Biol*. 2010;20(23):2131-2136. doi:10.1016/j.cub.2010.10.057
48. de Magalhães JP, Church GM. Cells discover fire: employing reactive oxygen species in development and consequences for aging. *Exp Gerontol*. 2006;41(1):1-10. doi:10.1016/j.exger.2005.09.002
49. Barja G. Towards a unified mechanistic theory of aging. *Exp Gerontol*. 2019;124(June). doi:10.1016/j.exger.2019.05.016
50. Labunskyy VM, Gladyshev VN. Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging. *Antioxid Redox Signal*. 2013;19(12):1362-1372. doi:10.1089/ars.2012.4891
51. Pinto M, Moraes CT. Mechanisms linking mtDNA damage and aging. *Free Radic Biol Med*. 2015;85:250-258. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.005
52. Skulachev VP. Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis*. 2006;11(4):473-485. doi:10.1007/s10495-006-5881-9
53. Bartlett K, Eaton S. Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem*. 2004;271(3):462-469. doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03947.x
54. Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ. Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol*. 2004;7(3):254-261. doi:https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.03.007
55. Duarte A, Poderoso C, Cooke M, et al. Mitochondrial fusion is essential for steroid biosynthesis. *PLoS One*. 2012;7(9):e45829-e45829. doi:10.1371/journal.pone.0045829
56. Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. *Br Med Bull*. 2013;106(1):135-159. doi:10.1093/bmb/ldt017
57. Allio R, Donega S, Galtier N, Nabholz B. Large Variation in the Ratio of Mitochondrial to Nuclear Mutation Rate across Animals: Implications for Genetic Diversity and the Use of Mitochondrial DNA as a Molecular Marker. *Mol Biol Evol*. 2017;34(11):2762-2772. doi:10.1093/molbev/msx197
58. Holt IJ. Mitochondrial DNA replication and repair: all a flap. *Trends Biochem Sci*. 2009;34(7):358-365. doi:10.1016/j.tibs.2009.03.007
59. Kukat C, Wurm CA, Spähr H, Falkenberg M, Larsson N-G, Jakobs S. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(33):13534-13539. doi:10.1073/pnas.1109263108
60. Kazak L, Reyes A, Holt IJ. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(10):659-671. doi:10.1038/nrm3439
61. Ekstrand MI, Falkenberg M, Rantanen A, et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet*. 2004;13(9):935-944. doi:10.1093/hmg/ddh109
62. Garrido N, Griparic L, Jokitalo E, Wartiovaara J, van der Blik AM, Spelbrink JN. Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell*. 2003;14(4):1583-1596. doi:10.1091/mbc.e02-07-0399
63. Kaguni LS. DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:293-320. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161455
64. Pikó L, Hougham AJ, Bulpitt KJ. Studies of sequence heterogeneity of mitochondrial DNA from rat and mouse tissues: evidence for an increased frequency of deletions/additions with aging. *Mech Ageing Dev*. 1988;43(3):279-293. doi:10.1016/0047-6374(88)90037-1
65. Chistiakov DA, Sobenin IA, Revin V V, Orekhov AN, Bobryshev Y V. Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. *Biomed Res Int*. 2014;2014:238463. doi:10.1155/2014/238463
66. Caro P, Gómez J, Arduini A, et al. Mitochondrial DNA sequences are present inside nuclear DNA in rat tissues

- and increase with age. *Mitochondrion*. 2010;10(5):479-486. doi:10.1016/j.mito.2010.05.004
67. Cheng X, Ivessa AS. The migration of mitochondrial DNA fragments to the nucleus affects the chronological aging process of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell*. 2010;9(5):919-923. doi:https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00607.x
  68. Cheng X, Ivessa AS. Accumulation of linear mitochondrial DNA fragments in the nucleus shortens the chronological life span of yeast. *Eur J Cell Biol*. 2012;91(10):782-788.
  69. Tsuzuki T, Nomiyama H, Setoyama C, Maeda S, Shimada K. Presence of mitochondrial-DNA-like sequences in the human nuclear DNA. *Gene*. 1983;25(2-3):223-229. doi:10.1016/0378-1119(83)90226-3
  70. Singh KK, Choudhury AR, Tiwari HK. Numtogenesis as a mechanism for development of cancer. In: *Seminars in Cancer Biology*. Vol 47. Elsevier; 2017:101-109.
  71. Martínez-Cisuelo V, Gómez J, García-Junceda I, et al. Rapamycin reverses age-related increases in mitochondrial ROS production at complex I, oxidative stress, accumulation of mtDNA fragments inside nuclear DNA, and lipofuscin level, and increases autophagy, in the liver of middle-aged mice. *Exp Gerontol*. 2016;83:130-138. doi:10.1016/j.exger.2016.08.002
  72. Barja G. Increase in Mitochondrial DNA Fragments inside Nuclear DNA during the Lifetime of an Individual as. *Aging Explor a Complex Phenom*. Published online 2017:383.
  73. Macedo JC, Vaz S, Bakker B, et al. FoxM1 repression during human aging leads to mitotic decline and aneuploidy-driven full senescence. *Nat Commun*. 2018;9(1):2834. doi:10.1038/s41467-018-05258-6
  74. Guenatri M, Bailly D, Maison C, Almouzni G. Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. *J Cell Biol*. 2004;166(4):493-505. doi:10.1083/jcb.200403109
  75. Taylor RC, Dillin A. Aging as an event of proteostasis collapse. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(5). doi:10.1101/cshperspect.a004440
  76. Pras A, Nollen EAA. Regulation of Age-Related Protein Toxicity. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9. doi:10.3389/fcell.2021.637084
  77. Krisko A, Radman M. Protein damage, ageing and age-related diseases. *Open Biol*. 2019;9(3):180249. doi:10.1098/rsob.180249
  78. Drummond DA, Wilke CO. The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis. *Nat Rev Genet*. 2009;10(10):715-724. doi:10.1038/nrg2662
  79. Rattan SIS. *Transcriptional and Translational Dysregulation during Aging*. (von Zglinicki T, ed.). Kluwer Academic Publishers; 2003.
  80. Rattan SIS. Synthesis, Modification and Turnover of Proteins during Aging BT - Protein Metabolism and Homeostasis in Aging. In: Tavernarakis N, ed. Springer US; 2010:1-13. doi:10.1007/978-1-4419-7002-2\_1
  81. Fukuda M, Taguchi T, Ohashi M. Age-dependent changes in DNA polymerase fidelity and proofreading activity during cellular aging. *Mech Ageing Dev*. 1999;109(2):141-151. doi:10.1016/s0047-6374(99)00034-2
  82. Srivastava VK, Busbee DL. Replicative enzymes and ageing: importance of DNA polymerase alpha function to the events of cellular ageing. *Ageing Res Rev*. 2002;1(3):443-463. doi:10.1016/s1568-1637(02)00011-9
  83. Levine RL, Stadtman ER. *Protein Modifications with Aging*. (Schneider EL, Rowe JW, eds.). Academic Press; 1996.
  84. Kristal BS, Yu BP. An emerging hypothesis: synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reactions. *J Gerontol*. 1992;47(4):B107-14. doi:10.1093/geronj/47.4.b107
  85. Friguet B, Szweda LI. Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein. *FEBS Lett*. 1997;405(1):21-25. doi:10.1016/s0014-5793(97)00148-8
  86. Forbes JM, Yee LTL, Thallas V, et al. Advanced glycation end product interventions reduce diabetes-accelerated atherosclerosis. *Diabetes*. 2004;53(7):1813-1823. doi:10.2337/diabetes.53.7.1813
  87. Bucala R, Makita Z, Vega G, et al. Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products



- contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(20):9441-9445. doi:10.1073/pnas.91.20.9441
88. Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K. Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients*. 2010;2(12):1247-1265. doi:10.3390/nu2121247
  89. Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005;67(1):3-21. doi:10.1016/j.diabres.2004.09.004
  90. Friguet B. Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett*. 2006;580(12):2910-2916. doi:https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.028
  91. Fournet M, Bonté F, Desmoulière A. Glycation Damage: A Possible Hub for Major Pathophysiological Disorders and Aging. *Aging Dis*. 2018;9(5):880-900. doi:10.14336/AD.2017.1121
  92. Jung T, Höhn A, Grune T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part II - protein oxidation and proteasomal degradation. *Redox Biol*. 2014;2:99-104. doi:10.1016/j.redox.2013.12.008
  93. Pickering AM, Davies KJA. Degradation of damaged proteins: the main function of the 20S proteasome. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2012;109:227-248. doi:10.1016/B978-0-12-397863-9.00006-7
  94. Nyström T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J*. 2005;24(7):1311-1317. doi:10.1038/sj.emboj.7600599
  95. Voitkun V, Zhitkovich A. Analysis of DNA-protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro. *Mutat Res*. 1999;424(1-2):97-106. doi:10.1016/s0027-5107(99)00011-1
  96. Jung T, Catalgol B, Grune T. The proteasomal system. *Mol Aspects Med*. 2009;30(4):191-296. doi:10.1016/j.mam.2009.04.001
  97. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR. Aggresomes: A Cellular Response to Misfolded Proteins. *J Cell Biol*. 1998;143(7):1883-1898. doi:10.1083/jcb.143.7.1883
  98. Morimoto RI. Stress, aging, and neurodegenerative disease. *N Engl J Med*. 2006;355(21):2254-2255. doi:10.1056/NEJMcibr065573
  99. Amidi F, French BA, Chung D, Halsted CH, Medici V, French SW. M-30 and 4HNE are sequestered in different aggresomes in the same hepatocytes. *Exp Mol Pathol*. 2007;83(3):296-300. doi:10.1016/j.yexmp.2007.09.001
  100. David DC. Aging and the aggregating proteome. *Front Genet*. 2012;3:247. doi:10.3389/fgene.2012.00247
  101. Ferrington DA, Husom AD, Thompson L V. Altered proteasome structure, function, and oxidation in aged muscle. *FASEB J*. 2005;19(6):1-24. doi:https://doi.org/10.1096/fj.04-2578fje
  102. Lee C-K, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA. Gene Expression Profile of Aging and Its Retardation by Caloric Restriction. *Science (80- )*. 1999;285(5432):1390-1393. doi:10.1126/science.285.5432.1390
  103. Chondrogianni N, Georgila K, Kourtis N, Tavernarakis N, Gonos ES. 20S proteasome activation promotes life span extension and resistance to proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2015;29(2):611-622. doi:10.1096/fj.14-252189
  104. Kruegel U, Robison B, Dange T, et al. Elevated Proteasome Capacity Extends Replicative Lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genet*. 2011;7(9):e1002253. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002253
  105. Nguyen NN, Rana A, Goldman C, et al. Proteasome  $\beta 5$  subunit overexpression improves proteostasis during aging and extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Sci Rep*. 2019;9(1):3170. doi:10.1038/s41598-019-39508-4
  106. Broadley SA, Hartl FU. The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *FEBS Lett*. 2009;583(16):2647-2653.
  107. Liberek K, Lewandowska A, Ziętkiewicz S. Chaperones in control of protein disaggregation. *EMBO J*. 2008;27(2):328-335.
  108. Sloan LA, Fillmore MC, Churcher I. Small-molecule modulation of cellular chaperones to treat protein misfolding disorders. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2009;12(5):666-681.
  109. Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW, Dillin A. Opposing activities protect against age-onset

- proteotoxicity. *Science* (80- ). 2006;313(5793):1604-1610.
110. David DC, Ollikainen N, Trinidad JC, Cary MP, Burlingame AL, Kenyon C. Widespread Protein Aggregation as an Inherent Part of Aging in *C. elegans*. *PLoS Biol.* 2010;8(8):e1000450. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000450>
  111. Linton PJ, Gurney M, Sengstock D, Mentzer RM, Gottlieb RA. This old heart: Cardiac aging and autophagy. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;83:44-54. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.12.017
  112. Fargnoli J, Kunisada T, Fornace Jr AJ, Schneider EL, Holbrook NJ. Decreased expression of heat shock protein 70 mRNA and protein after heat treatment in cells of aged rats. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87(2):846-850.
  113. Hall DM, Xu L, Drake VJ, et al. Aging reduces adaptive capacity and stress protein expression in the liver after heat stress. *J Appl Physiol.* 2000;89(2):749-759. doi:10.1152/jappl.2000.89.2.749
  114. Moore SA, Lopez A, Richardson A, Pahlavani MA. Effect of age and dietary restriction on expression of heat shock protein 70 in rat alveolar macrophages. *Mech Ageing Dev.* 1998;104(1):59-73.
  115. Tatar M, Khazaeli AA, Curtsinger JW. Chaperoning extended life. *Nature.* 1997;390(6655):30. doi:10.1038/36237
  116. Hsu A-L, Murphy CT, Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science.* 2003;300(5622):1142-1145. doi:10.1126/science.1083701
  117. Ottens F, Franz A, Hoppe T. Build-UPS and break-downs: metabolism impacts on proteostasis and aging. *Cell Death Differ.* 2021;28(2):505-521. doi:10.1038/s41418-020-00682-y
  118. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018;19(9):579-593. doi:10.1038/s41580-018-0033-y
  119. Douglas PM, Dillin A. Protein homeostasis and aging in neurodegeneration. *J Cell Biol.* 2010;190(5):719-729. doi:10.1083/jcb.201005144
  120. Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Protein homeostasis and aging: The importance of exquisite quality control. *Ageing Res Rev.* 2011;10(2):205-215. doi:10.1016/j.arr.2010.02.001
  121. Moskalev AA, Shaposhnikov M V, Plyusnina EN, et al. The role of DNA damage and repair in aging through the prism of Koch-like criteria. *Ageing Res Rev.* 2013;12(2):661-684. doi:https://doi.org/10.1016/j.arr.2012.02.001
  122. Cagan A, Baez-Ortega A, Brzozowska N, et al. Somatic mutation rates scale with lifespan across mammals. *Nature.* 2022;604(7906):517-524. doi:10.1038/s41586-022-04618-z
  123. Hoeijmakers JHJ. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(15):1475-1485. doi:10.1056/NEJMra0804615
  124. Vijg J. *Aging of the Genome: The Dual Role of DNA in Life and Death*. Oxford University Press on Demand; 2007.
  125. Rossi DJ, Jamieson CHM, Weissman IL. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell.* 2008;132(4):681-696. doi:10.1016/j.cell.2008.01.036
  126. Jones DL, Rando TA. Emerging models and paradigms for stem cell ageing. *Nat Cell Biol.* 2011;13(5):506-512. doi:10.1038/ncb0511-506
  127. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature.* 2012;481(7381):287-294. doi:10.1038/nature10760
  128. Kirkwood TB. DNA, mutations and aging. *Mutat Res.* 1989;219(1):1-7. doi:10.1016/0921-8734(89)90035-0
  129. Murga M, Bunting S, Montaña MF, et al. A mouse model of ATR-Seckel shows embryonic replicative stress and accelerated aging. *Nat Genet.* 2009;41(8):891-898. doi:10.1038/ng.420
  130. Gregg SQ, Gutiérrez V, Robinson AR, et al. A mouse model of accelerated liver aging caused by a defect in DNA repair. *Hepatology.* 2012;55(2):609-621. doi:10.1002/hep.24713
  131. Maegawa S, Hinkal G, Kim HS, et al. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res.* 2010;20(3):332-340. doi:10.1101/gr.096826.109
  132. Jung M, Pfeifer GP. Aging and DNA methylation. *BMC Biol.* 2015;13(1):7. doi:10.1186/s12915-015-0118-4

133. Unnikrishnan A, Hadad N, Masser DR, Jackson J, Freeman WM, Richardson A. Revisiting the genomic hypomethylation hypothesis of aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1418(1):69-79. doi:10.1111/nyas.13533
134. Gorbunova V, Seluanov A, Mita P, et al. The role of retrotransposable elements in ageing and age-associated diseases. *Nature.* 2021;596(7870):43-53. doi:10.1038/s41586-021-03542-y
135. Pappalardo XG, Barra V. Losing DNA methylation at repetitive elements and breaking bad. *Epigenetics Chromatin.* 2021;14(1):25. doi:10.1186/s13072-021-00400-z
136. De Cecco M, Criscione SW, Peterson AL, Neretti N, Sedivy JM, Kreiling JA. Transposable elements become active and mobile in the genomes of aging mammalian somatic tissues. *Aging (Albany NY).* 2013;5(12):867-883. doi:10.18632/aging.100621
137. Yi S-J, Kim K. New Insights into the Role of Histone Changes in Aging. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21). doi:10.3390/ijms21218241
138. Viswanathan M, Guarente L. Regulation of *Caenorhabditis elegans* lifespan by sir-2.1 transgenes. *Nature.* 2011;477(7365):E1-2. doi:10.1038/nature10440
139. Guarente L. Sirtuins, aging, and metabolism. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011;76:81-90. doi:10.1101/sqb.2011.76.010629
140. Rogina B, Helfand SL. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci.* 2004;101(45):15998-16003. doi:10.1073/pnas.0404184101
141. Kanfi Y, Naiman S, Amir G, et al. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. *Nature.* 2012;483(7388):218-221. doi:10.1038/nature10815
142. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell.* 2006;124(2):315-329. doi:10.1016/j.cell.2005.11.044
143. Oberdoerffer P, Sinclair DA. The role of nuclear architecture in genomic instability and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(9):692-702. doi:10.1038/nrm2238
144. Tsurumi A, Li WX. Global heterochromatin loss: a unifying theory of aging? *Epigenetics.* 2012;7(7):680-688. doi:10.4161/epi.20540
145. Pegoraro G, Kubben N, Wickert U, Göhler H, Hoffmann K, Misteli T. Ageing-related chromatin defects through loss of the NURD complex. *Nat Cell Biol.* 2009;11(10):1261-1267. doi:10.1038/ncb1971
146. Larson K, Yan S-J, Tsurumi A, et al. Heterochromatin formation promotes longevity and represses ribosomal RNA synthesis. *PLoS Genet.* 2012;8(1):e1002473. doi:10.1371/journal.pgen.1002473
147. Mattison JA, Roth GS, Beasley TM, et al. Impact of caloric restriction on health and survival in rhesus monkeys from the NIA study. *Nature.* 2012;489(7415):318-321. doi:10.1038/nature11432
148. Fontana L, Weiss EP, Villareal DT, Klein S, Holloszy JO. Long-term effects of calorie or protein restriction on serum IGF-1 and IGFBP-3 concentration in humans. *Aging Cell.* 2008;7(5):681-687. doi:https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00417.x
149. Weindruch R. The Retardation of Aging by Caloric Restriction: Studies in Rodents and Primates. *Toxicol Pathol.* 1996;24(6):742-745. doi:10.1177/019262339602400618
150. Mair W, Dillin A. Aging and Survival: The Genetics of Life Span Extension by Dietary Restriction. *Annu Rev Biochem.* 2008;77(1):727-754. doi:10.1146/annurev.biochem.77.061206.171059
151. Piper MDW, Partridge L, Raubenheimer D, Simpson SJ. Dietary restriction and aging: a unifying perspective. *Cell Metab.* 2011;14(2):154-160. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.013
152. Lee C, Longo V. Dietary restriction with and without caloric restriction for healthy aging [version 1; peer review: 3 approved]. *F1000Research.* 2016;5(117). doi:10.12688/f1000research.7136.1
153. Most J, Tosti V, Redman LM, Fontana L. Calorie restriction in humans: An update. *Ageing Res Rev.* 2017;39:36-45. doi:https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.08.005
154. Barzilay N, Huffman DM, Muzumdar RH, Bartke A. The critical role of metabolic pathways in aging. *Diabetes.*

- 2012;61(6):1315-1322. doi:10.2337/db11-1300
155. Fontana L, Partridge L, Longo VD. Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science*. 2010;328(5976):321-326. doi:10.1126/science.1172539
  156. Kenyon CJ. The genetics of ageing. *Nature*. 2010;464(7288):504.
  157. Hardie DG, Schaffer BE, Brunet A. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends Cell Biol*. 2016;26(3):190-201. doi:10.1016/j.tcb.2015.10.013
  158. Longo VD. Programmed longevity, youthspan, and juvenology. *Aging Cell*. 2019;18(1):e12843. doi:https://doi.org/10.1111/ace1.12843
  159. Pignatti C, D'Adamo S, Stefanelli C, Flamigni F, Cetrullo S. Nutrients and Pathways that Regulate Health Span and Life Span. *Geriatr (Basel, Switzerland)*. 2020;5(4). doi:10.3390/geriatrics5040095
  160. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 2013;153(6):1194-1217. doi:10.1016/j.cell.2013.05.039
  161. Kolb H, Kempf K, Röhling M, Martin S. Insulin: Too much of a good thing is bad. *BMC Med*. 2020;18(1):1-12. doi:10.1186/s12916-020-01688-6
  162. Nakae J, Kido Y, Accili D. Distinct and Overlapping Functions of Insulin and IGF-I Receptors. *Endocr Rev*. 2001;22(6):818-835. doi:10.1210/edrv.22.6.0452
  163. Haywood NJ, Slater TA, Matthews CJ, Wheatcroft SB. The insulin like growth factor and binding protein family: Novel therapeutic targets in obesity & diabetes. *Mol Metab*. 2019;19:86-96. doi:https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.10.008
  164. Arsham AM, Neufeld TP. Thinking globally and acting locally with TOR. *Curr Opin Cell Biol*. 2006;18(6):589-597. doi:10.1016/j.ceb.2006.09.005
  165. Dann SG, Thomas G. The amino acid sensitive TOR pathway from yeast to mammals. *FEBS Lett*. 2006;580(12):2821-2829. doi:10.1016/j.febslet.2006.04.068
  166. Wolkow CA, Muñoz MJ, Riddle DL, Ruvkun G. Insulin receptor substrate and p53 orthologous adaptor proteins function in the *Caenorhabditis elegans* daf-2/insulin-like signaling pathway. *J Biol Chem*. 2002;277(51):49591-49597.
  167. Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu M-P, Yin C-M, Garofalo RS. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science (80- )*. 2001;292(5514):107-110.
  168. Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, et al. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science (80- )*. 2001;292(5514):104-106.
  169. Johnson TE. Increased life-span of age-1 mutants in *Caenorhabditis elegans* and lower Gompertz rate of aging. *Science*. 1990;249(4971):908-912. doi:10.1126/science.2392681
  170. Gems D, Sutton AJ, Sundermeyer ML, et al. Two pleiotropic classes of daf-2 mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1998;150(1):129-155. doi:10.1093/genetics/150.1.129
  171. Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R. A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature*. 1993;366(6454):461-464. doi:10.1038/366461a0
  172. Yuan R, Tsaih S-W, Petkova SB, et al. Aging in inbred strains of mice: study design and interim report on median lifespans and circulating IGF1 levels. *Aging Cell*. 2009;8(3):277-287. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00478.x
  173. Vitale G, Pellegrino G, Vollery M, Hofland LJ. ROLE of IGF-1 System in the Modulation of Longevity: Controversies and New Insights From a Centenarians' Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10. doi:10.3389/fendo.2019.00027
  174. Junnila RK, List EO, Berryman DE, Murrey JW, Kopchick JJ. The GH/IGF-1 axis in ageing and longevity. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(6):366-376. doi:10.1038/nrendo.2013.67
  175. Fontana L, Partridge L. Promoting health and longevity through diet: from model organisms to humans. *Cell*.

- 2015;161(1):106-118. doi:10.1016/j.cell.2015.02.020
176. Madeo F, Carmona-Gutierrez D, Hofer SJ, Kroemer G. Caloric Restriction Mimetics against Age-Associated Disease: Targets, Mechanisms, and Therapeutic Potential. *Cell Metab.* 2019;29(3):592-610. doi:10.1016/j.cmet.2019.01.018
177. Hou L, Wang D, Chen D, et al. A Systems Approach to Reverse Engineer Lifespan Extension by Dietary Restriction. *Cell Metab.* 2016;23(3):529-540. doi:10.1016/j.cmet.2016.02.002
178. Kapahi P, Kaeberlein M, Hansen M. Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. *Ageing Res Rev.* 2017;39:3-14. doi:https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.12.005
179. Schumacher B, van der Pluijm I, Moorhouse MJ, et al. Delayed and accelerated aging share common longevity assurance mechanisms. *PLoS Genet.* 2008;4(8):e1000161. doi:10.1371/journal.pgen.1000161
180. Garinis GA, van der Horst GTJ, Vijg J, Hoeijmakers JHJ. DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem. *Nat Cell Biol.* 2008;10(11):1241-1247. doi:10.1038/ncb1108-1241
181. Khazaeli AA, Tatar M, Pletcher SD, Curtsinger JW. Heat-induced longevity extension in *Drosophila*. I. Heat treatment, mortality, and thermotolerance. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1997;52(1):B48-52. doi:10.1093/gerona/52a.1.b48
182. Tatar M, Yin C. Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Exp Gerontol.* 2001;36(4-6):723-738. doi:10.1016/s0531-5565(00)00238-2
183. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012;149(2):274-293. doi:10.1016/j.cell.2012.03.017
184. Hara K, Maruki Y, Long X, et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell.* 2002;110(2):177-189. doi:10.1016/s0092-8674(02)00833-4
185. Ribeiro CB, Christofolletti DC, Pezolato VA, et al. Leucine minimizes denervation-induced skeletal muscle atrophy of rats through akt/mtor signaling pathways. *Front Physiol.* 2015;6. https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2015.00073
186. Sangüesa G, Roglans N, Baena M, Velázquez AM, Laguna JC, Alegret M. mTOR is a Key Protein Involved in the Metabolic Effects of Simple Sugars. *Int J Mol Sci.* 2019;20(5). doi:10.3390/ijms20051117
187. Laplante M, Sabatini DM. An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol.* 2009;19(22):R1046-52. doi:10.1016/j.cub.2009.09.058
188. Ma XM, Blenis J. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10(5):307-318. doi:10.1038/nrm2672
189. Mayer C, Zhao J, Yuan X, Grummt I. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev.* 2004;18(4):423-434. doi:10.1101/gad.285504
190. Kantidakis T, Ramsbottom BA, Birch JL, Dowding SN, White RJ. mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(26):11823-11828. doi:10.1073/pnas.1005188107
191. Düvel K, Yecies JL, Menon S, et al. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell.* 2010;39(2):171-183. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.022
192. Li S, Brown MS, Goldstein JL. Bifurcation of insulin signaling pathway in rat liver: mTORC1 required for stimulation of lipogenesis, but not inhibition of gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(8):3441-3446. doi:10.1073/pnas.0914798107
193. Settembre C, De Cegli R, Mansueto G, et al. TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nat Cell Biol.* 2013;15(6):647-658. doi:10.1038/ncb2718
194. Zhang C-S, Jiang B, Li M, et al. The lysosomal v-ATPase-Ragulator complex is a common activator for AMPK and mTORC1, acting as a switch between catabolism and anabolism. *Cell Metab.* 2014;20(3):526-540. doi:10.1016/j.cmet.2014.06.014

195. Ratto E, Chowdhury SR, Siefert NS, et al. Direct control of lysosomal catabolic activity by mTORC1 through regulation of V-ATPase assembly. *Nat Commun.* 2022;13(1):4848. doi:10.1038/s41467-022-32515-6
196. Buglio D, Konopleva M, McQueen T, et al. Relationship between m-TOR-Mediated Upregulation of Glycolysis, Chemoresistance, and Prognosis in Patients with ALL. *Blood.* 2005;106(11):12. doi:https://doi.org/10.1182/blood.V106.11.12.12
197. Wei S, Fan Q, Yang L, et al. Promotion of glycolysis by HOTAIR through GLUT1 upregulation via mTOR signaling. *Oncol Rep.* 2017;38(3):1902-1908. doi:10.3892/or.2017.5840
198. Ganley IG, Lam DH, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J Biol Chem.* 2009;284(18):12297-12305. doi:10.1074/jbc.M900573200
199. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell.* 2009;20(7):1981-1991. doi:10.1091/mbc.e08-12-1248
200. Koren I, Reem E, Kimchi A. DAP1, a novel substrate of mTOR, negatively regulates autophagy. *Curr Biol.* 2010;20(12):1093-1098. doi:10.1016/j.cub.2010.04.041
201. Settembre C, Zoncu R, Medina DL, et al. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J.* 2012;31(5):1095-1108. doi:10.1038/emboj.2012.32
202. Peña-Llopis S, Vega-Rubin-de-Celis S, Schwartz JC, et al. Regulation of TFEB and V-ATPases by mTORC1. *EMBO J.* 2011;30(16):3242-3258. doi:10.1038/emboj.2011.257
203. Kaeberlein M, Powers III RW, Steffen KK, et al. Regulation of yeast replicative life span by TOR and Sch9 in response to nutrients. *Science (80- ).* 2005;310(5751):1193-1196.
204. Hansen M, Chandra A, Mitic LL, Onken B, Driscoll M, Kenyon C. A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 2008;4(2):e24. doi:10.1371/journal.pgen.0040024
205. Lees EK, Król E, Grant L, et al. Methionine restriction restores a younger metabolic phenotype in adult mice with alterations in fibroblast growth factor 21. *Aging Cell.* 2014;13(5):817-827. doi:https://doi.org/10.1111/accel.12238
206. Chaumontet C, Azzout-Marniche D, Blais A, et al. Low-protein and methionine, high-starch diets increase energy intake and expenditure, increase FGF21, decrease IGF-1, and have little effect on adiposity in mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2019;316(5):R486-R501. doi:10.1152/ajpregu.00316.2018
207. Kitada M, Ogura Y, Monno I, Koya D. The impact of dietary protein intake on longevity and metabolic health. *EBioMedicine.* 2019;43:632-640. doi:10.1016/j.ebiom.2019.04.005
208. Harrison DE, Strong R, Sharp ZD, et al. Rapamycin fed late in life extends lifespan in genetically heterogeneous mice. *Nature.* 2009;460(7253):392-395. doi:10.1038/nature08221
209. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science.* 2012;335(6076):1638-1643. doi:10.1126/science.1215135
210. Selman C, Tullet JMA, Wieser D, et al. Ribosomal protein S6 kinase 1 signaling regulates mammalian life span. *Science.* 2009;326(5949):140-144. doi:10.1126/science.1177221
211. Blagosklonny M V. Revisiting the antagonistic pleiotropy theory of aging: TOR-driven program and quasi-program. *Cell Cycle.* 2010;9(16):3171-3176.
212. Johnson SC, Rabinovitch PS, Kaeberlein M. mTOR is a key modulator of ageing and age-related disease. *Nature.* 2013;493(7432):338-345. doi:10.1038/nature11861
213. Weichhart T. MTOR as Regulator of Lifespan, Aging, and Cellular Senescence: A Mini-Review. *Gerontology.* 2018;64(2):127-134. doi:10.1159/000484629
214. Proshkina EN, Shaposhnikov M V, Sadritdinova AF, Kudryavtseva A V, Moskalev AA. Basic mechanisms of longevity: A case study of *Drosophila* pro-longevity genes. *Ageing Res Rev.* 2015;24:218-231. doi:https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.08.005
215. Greer EL, Brunet A. Signaling networks in aging. *J Cell Sci.* 2008;121(4):407-412. doi:10.1242/jcs.021519
216. Van Heemst D, Beekman M, Mooijaart SP, et al. Reduced insulin/IGF-1 signalling and human longevity. *Aging*

- Cell*. 2005;4(2):79-85. doi:https://doi.org/10.1111/j.1474-9728.2005.00148.x
217. Shimokawa I, Komatsu T, Hayashi N, et al. The life-extending effect of dietary restriction requires Foxo3 in mice. *Aging Cell*. 2015;14(4):707-709. doi:https://doi.org/10.1111/accel.12340
218. van der Horst A, Burgering BMT. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(6):440-450. doi:10.1038/nrm2190
219. Brown AK, Webb AE. Chapter Seven - Regulation of FOXO Factors in Mammalian Cells. In: Ghaffari SBT-CT in DB, ed. *Forkhead FOXO Transcription Factors in Development and Disease*. Vol 127. Academic Press; 2018:165-192. doi:https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.10.006
220. Mercken EM, Crosby SD, Lamming DW, et al. Calorie restriction in humans inhibits the PI3K/AKT pathway and induces a younger transcription profile. *Aging Cell*. 2013;12(4):645-651. doi:https://doi.org/10.1111/accel.12088
221. Murtaza G, Khan AK, Rashid R, Muneer S, Hasan SMF, Chen J. FOXO Transcriptional Factors and Long-Term Living. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017. doi:10.1155/2017/3494289
222. Link W. Introduction to FOXO Biology BT - FOXO Transcription Factors: Methods and Protocols. In: Link W, ed. Springer New York; 2019:1-9. doi:10.1007/978-1-4939-8900-3\_1
223. Morris BJ, Willcox DC, Donlon TA, Willcox BJ. FOXO3: A Major Gene for Human Longevity - A Mini-Review. *Gerontology*. 2015;61(6):515-525. doi:10.1159/000375235
224. Eijkelenboom A, Burgering BMT. FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(2):83-97. doi:10.1038/nrm3507
225. Kim DH, Park MH, Lee EK, et al. The roles of FoxOs in modulation of aging by calorie restriction. *Biogerontology*. 2015;16(1):1-14. doi:10.1007/s10522-014-9519-y
226. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;96(6):857-868. doi:10.1016/s0092-8674(00)80595-4
227. Dong XC, Copps KD, Guo S, et al. Inactivation of Hepatic Foxo1 by Insulin Signaling Is Required for Adaptive Nutrient Homeostasis and Endocrine Growth Regulation. *Cell Metab*. 2008;8(1):65-76. doi:10.1016/j.cmet.2008.06.006
228. Li X, Kazgan N. Mammalian sirtuins and energy metabolism. *Int J Biol Sci*. 2011;7(5):575-587. doi:10.7150/ijbs.7.575
229. Sauve AA, Youn DY. Sirtuins: NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase mechanism and regulation. *Curr Opin Chem Biol*. 2012;16(5):535-543. doi:https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.10.003
230. Sauve AA, Celic I, Avalos J, Deng H, Boeke JD, Schramm VL. Chemistry of Gene Silencing: The Mechanism of NAD<sup>+</sup>-Dependent Deacetylation Reactions. *Biochemistry*. 2001;40(51):15456-15463. doi:10.1021/bi011858j
231. Fernandez-Marcos PJ, Auwerx J. Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(4):884S - 90. doi:10.3945/ajcn.110.001917
232. Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature*. 2005;434(7029):113-118. doi:10.1038/nature03354
233. Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, et al. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell*. 2008;135(5):907-918. doi:10.1016/j.cell.2008.10.025
234. Wang R-H, Sengupta K, Li C, et al. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell*. 2008;14(4):312-323. doi:10.1016/j.ccr.2008.09.001
235. Kawahara TLA, Michishita E, Adler AS, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. *Cell*. 2009;136(1):62-74. doi:10.1016/j.cell.2008.10.052
236. Ponugoti B, Kim DH, Xiao Z, et al. SIRT1 deacetylates and inhibits SREBP-1C activity in regulation of hepatic lipid metabolism. *J Biol Chem*. 2010;285(44):33959-33970. doi:10.1074/jbc.M110.122978
237. Nogueiras R, Habegger KM, Chaudhary N, et al. Sirtuin 1 and sirtuin 3: physiological modulators of metabolism. *Physiol Rev*. 2012;92(3):1479-1514. doi:10.1152/physrev.00022.2011

238. Zhao S, Xu W, Jiang W, et al. Regulation of Cellular Metabolism by Protein Lysine Acetylation. *Science* (80- ). 2010;327(5968):1000-1004. doi:10.1126/science.1179689
239. Picard F, Kurtev M, Chung N, et al. Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- $\gamma$ . *Nature*. 2004;429(6993):771-776. doi:10.1038/nature02583
240. Ng F, Tang BL. Sirtuins' modulation of autophagy. *J Cell Physiol*. 2013;228(12):2262-2270. doi:https://doi.org/10.1002/jcp.24399
241. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab*. 2010;12(6):662-667. doi:10.1016/j.cmet.2010.11.015
242. Ruetenik A, Barrientos A. Dietary restriction, mitochondrial function and aging: from yeast to humans. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2015;1847(11):1434-1447. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.05.005
243. Sundaresan NR, Gupta M, Kim G, Rajamohan SB, Isbatan A, Gupta MP. Sirt3 blocks the cardiac hypertrophic response by augmenting Foxo3a-dependent antioxidant defense mechanisms in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(9):2758-2771. doi:10.1172/JCI39162
244. Bai P, Cantó C, Oudart H, et al. PARP-1 inhibition increases mitochondrial metabolism through SIRT1 activation. *Cell Metab*. 2011;13(4):461-468. doi:10.1016/j.cmet.2011.03.004
245. Brown K, Xie S, Qiu X, et al. SIRT3 reverses aging-associated degeneration. *Cell Rep*. 2013;3(2):319-327. doi:10.1016/j.celrep.2013.01.005
246. Guarente L. Calorie restriction and sirtuins revisited. *Genes Dev*. 2013;27(19):2072-2085. doi:10.1101/gad.227439.113
247. Baur JA, Ungvari Z, Minor RK, Le Couteur DG, de Cabo R. Are sirtuins viable targets for improving healthspan and lifespan? *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(6):443-461. doi:10.1038/nrd3738
248. Xu C, Wang L, Fozouni P, et al. SIRT1 is downregulated by autophagy in senescence and ageing. *Nat Cell Biol*. 2020;22(10):1170-1179. doi:10.1038/s41556-020-00579-5
249. Someya S, Yu W, Hallows WC, et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. *Cell*. 2010;143(5):802-812. doi:10.1016/j.cell.2010.10.002
250. Hariharan N, Maejima Y, Nakae J, Paik J, Depinho RA, Sadoshima J. Deacetylation of FoxO by Sirt1 Plays an Essential Role in Mediating Starvation-Induced Autophagy in Cardiac Myocytes. *Circ Res*. 2010;107(12):1470-1482. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227371
251. Wang F, Nguyen M, Qin FX-F, Tong Q. SIRT2 deacetylates FOXO3a in response to oxidative stress and caloric restriction. *Aging Cell*. 2007;6(4):505-514. doi:https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2007.00304.x
252. Garcia D, Shaw RJ. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol Cell*. 2017;66(6):789-800. doi:10.1016/j.molcel.2017.05.032
253. Viollet B, Guigas B, Leclerc J, et al. AMP-activated protein kinase in the regulation of hepatic energy metabolism: from physiology to therapeutic perspectives. *Acta Physiol*. 2009;196(1):81-98. doi:https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2009.01970.x
254. Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol*. 2012;32(1):2-11. doi:10.1128/MCB.06159-11
255. Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, et al. The Energy Sensor AMP-activated Protein Kinase Directly Regulates the Mammalian FOXO3 Transcription Factor \*. *J Biol Chem*. 2007;282(41):30107-30119. doi:10.1074/jbc.M705325200
256. Price NL, Gomes AP, Ling AJY, et al. SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function. *Cell Metab*. 2012;15(5):675-690. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.003
257. Mair W, Morantte I, Rodrigues APC, et al. Lifespan extension induced by AMPK and calcineurin is mediated by CRTC-1 and CREB. *Nature*. 2011;470(7334):404-408. doi:10.1038/nature09706
258. Burkewitz K, Zhang Y, Mair WB. AMPK at the Nexus of Energetics and Aging. *Cell Metab*. 2014;20(1):10-25.



- doi:10.1016/j.cmet.2014.03.002
259. Ponnappan S, Ponnappan U. Aging and immune function: molecular mechanisms to interventions. *Antioxid Redox Signal*. 2011;14(8):1551-1585. doi:10.1089/ars.2010.3228
260. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol*. 2010;22(4):507-513. doi:10.1016/j.coi.2010.05.003
261. Sadighi Akha AA. Aging and the immune system: An overview. *J Immunol Methods*. 2018;463:21-26. doi:10.1016/j.jim.2018.08.005
262. Watad A, Bragazzi NL, Adawi M, et al. Autoimmunity in the Elderly: Insights from Basic Science and Clinics - A Mini-Review. *Gerontology*. 2017;63(6):515-523. doi:10.1159/000478012
263. Weinberger B, Herndler-Brandstetter D, Schwanninger A, Weiskopf D, Grubeck-Loebenstien B. Biology of Immune Responses to Vaccines in Elderly Persons. *Clin Infect Dis*. 2008;46(7):1078-1084. doi:10.1086/529197
264. Saurwein-Teissl M, Lung TL, Marx F, et al. Lack of Antibody Production Following Immunization in Old Age: Association with CD8+CD28- T Cell Clonal Expansions and an Imbalance in the Production of Th1 and Th2 Cytokines1. *J Immunol*. 2002;168(11):5893-5899. doi:10.4049/jimmunol.168.11.5893
265. Cancro MP, Hao Y, Scholz JL, et al. B cells and aging: molecules and mechanisms. *Trends Immunol*. 2009;30(7):313-318. doi:https://doi.org/10.1016/j.it.2009.04.005
266. Frasca D, Blomberg BB. Effects of aging on B cell function. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(4):425-430. doi:https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.06.001
267. Han S, Yang K, Ozen Z, et al. Enhanced Differentiation of Splenic Plasma Cells but Diminished Long-Lived High-Affinity Bone Marrow Plasma Cells in Aged Mice 1. *J Immunol*. 2003;170(3):1267-1273. doi:10.4049/jimmunol.170.3.1267
268. Vescovini R, Fagnoni FF, Telera AR, et al. Naïve and memory CD8 T cell pool homeostasis in advanced aging: impact of age and of antigen-specific responses to cytomegalovirus. *Age (Dordr)*. 2014;36(2):625-640. doi:10.1007/s11357-013-9594-z
269. Ventura MT, Casciaro M, Gangemi S, Buquicchio R. Immunosenescence in aging: between immune cells depletion and cytokines up-regulation. *Clin Mol Allergy*. 2017;15:21. doi:10.1186/s12948-017-0077-0
270. Horn L, Leips J, Starz-Gaiano M. Phagocytic ability declines with age in adult Drosophila hemocytes. *Aging Cell*. 2014;13(4):719-728. doi:10.1111/accel.12227
271. Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A. Inflammaging: disturbed interplay between autophagy and inflammasomes. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(3):166-175. doi:10.18632/aging.100444
272. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(1):36-46. doi:10.1038/nri2675
273. Park MH, Kim DH, Lee EK, et al. Age-related inflammation and insulin resistance: a review of their intricate interdependency. *Arch Pharm Res*. 2014;37(12):1507-1514. doi:10.1007/s12272-014-0474-6
274. Stahl EC, Haschak MJ, Popovic B, Brown BN. Macrophages in the aging liver and age-related liver disease. *Front Immunol*. 2018;9(NOV):1-13. doi:10.3389/fimmu.2018.02795
275. Chalan P, van den Berg A, Kroesen B-J, Brouwer L, Boots A. Rheumatoid Arthritis, Immunosenescence and the Hallmarks of Aging. *Curr Aging Sci*. 2015;8(2):131-146. doi:10.2174/1874609808666150727110744
276. Franceschi C, Garagnani P, Vitale G, Capri M, Salvioli S. Inflammaging and “Garb-aging”. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;28(3):199-212. doi:10.1016/j.tem.2016.09.005
277. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014;69 Suppl 1:S4-9. doi:10.1093/gerona/glu057
278. Ebersole JL, Graves CL, Gonzalez OA, et al. Aging, inflammation, immunity and periodontal disease. *Periodontol 2000*. 2016;72(1):54-75. doi:10.1111/prd.12135
279. Coppé J-P, Patil CK, Rodier F, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous

- functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6(12):2853-2868.  
doi:10.1371/journal.pbio.0060301
280. Green DR, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science.* 2011;333(6046):1109-1112. doi:10.1126/science.1201940
281. Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. Activation of innate immunity system during aging: NF- $\kappa$ B signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res Rev.* 2008;7(2):83-105. doi:10.1016/j.arr.2007.09.002
282. Helenius M, Hänninen M, Lehtinen SK, Salminen A. Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Biochem J.* 1996;318 ( Pt 2(Pt 2):603-608. doi:10.1042/bj3180603
283. Di Giosia P, Stamerra CA, Giorgini P, Jamialahamdi T, Butler AE, Sahebkar A. The role of nutrition in inflammaging. *Ageing Res Rev.* 2022;77:101596. doi:10.1016/j.arr.2022.101596
284. Ye J, Keller JN. Regulation of energy metabolism by inflammation: a feedback response in obesity and calorie restriction. *Ageing (Albany NY).* 2010;2(6):361-368. doi:10.18632/aging.100155
285. Ottaviani E, Franceschi C. The invertebrate phagocytic immunocyte: clues to a common evolution of immune and neuroendocrine systems. *Immunol Today.* 1997;18(4):169-174. doi:https://doi.org/10.1016/S0167-5699(97)84663-4
286. Gregor MF, Hotamisligil GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:415-445. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101322
287. Revelo XS, Ghazarian M, Chng MHY, et al. Nucleic Acid-Targeting Pathways Promote Inflammation in Obesity-Related Insulin Resistance. *Cell Rep.* 2016;16(3):717-730. doi:10.1016/j.celrep.2016.06.024
288. Lewis SS, Hutchinson MR, Zhang Y, et al. Glucuronic acid and the ethanol metabolite ethyl-glucuronide cause toll-like receptor 4 activation and enhanced pain. *Brain Behav Immun.* 2013;30:24-32. doi:10.1016/j.bbi.2013.01.005
289. Zhao L, Lee JY, Hwang DH. Inhibition of pattern recognition receptor-mediated inflammation by bioactive phytochemicals. *Nutr Rev.* 2011;69(6):310-320. doi:10.1111/j.1753-4887.2011.00394.x
290. Huang S, Rutkowsky JM, Snodgrass RG, et al. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res.* 2012;53(9):2002-2013. doi:10.1194/jlr.D029546
291. Lee JY, Zhao L, Youn HS, et al. Saturated fatty acid activates but polyunsaturated fatty acid inhibits Toll-like receptor 2 dimerized with Toll-like receptor 6 or 1. *J Biol Chem.* 2004;279(17):16971-16979. doi:10.1074/jbc.M312990200
292. Mathur V, Burai R, Vest RT, et al. Activation of the STING-Dependent Type I Interferon Response Reduces Microglial Reactivity and Neuroinflammation. *Neuron.* 2017;96(6):1290-1302.e6. doi:10.1016/j.neuron.2017.11.032
293. Tieri P, Grignolio A, Zaikin A, et al. Network, degeneracy and bow tie. Integrating paradigms and architectures to grasp the complexity of the immune system. *Theor Biol Med Model.* 2010;7(1):32. doi:10.1186/1742-4682-7-32
294. Edelman GM, Gally JA. Degeneracy and complexity in biological systems. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(24):13763-13768. doi:10.1073/pnas.231499798
295. Lee RJ, Xiong G, Kofonow JM, et al. T2R38 taste receptor polymorphisms underlie susceptibility to upper respiratory infection. *J Clin Invest.* 2012;122(11):4145-4159. doi:10.1172/JCI64240
296. Lee RJ, Hariri BM, McMahon DB, et al. Bacterial d-amino acids suppress sinonasal innate immunity through sweet taste receptors in solitary chemosensory cells. *Sci Signal.* 2017;10(495). doi:10.1126/scisignal.aam7703
297. Howitt MR, Lavoie S, Michaud M, et al. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. *Science.* 2016;351(6279):1329-1333. doi:10.1126/science.aaf1648
298. Collino S, Montoliu I, Martin F-PJ, et al. Metabolic Signatures of Extreme Longevity in Northern Italian

- Centenarians Reveal a Complex Remodeling of Lipids, Amino Acids, and Gut Microbiota Metabolism. *PLoS One*. 2013;8(3):e56564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056564>
299. Biagi E, Franceschi C, Rampelli S, et al. Gut Microbiota and Extreme Longevity. *Curr Biol*. 2016;26(11):1480-1485. doi:10.1016/j.cub.2016.04.016
300. Biagi E, Nylund L, Candela M, et al. Through Ageing, and Beyond: Gut Microbiota and Inflammatory Status in Seniors and Centenarians. *PLoS One*. 2010;5(5):e10667. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010667>
301. Müller L, Fülöp T, Pawelec G. Immunosenescence in vertebrates and invertebrates. *Immun Ageing*. 2013;10(1):12. doi:10.1186/1742-4933-10-12
302. Fabian DK, Fuentealba M, Dönertaş HM, Partridge L, Thornton JM. Functional conservation in genes and pathways linking ageing and immunity. *Immun Ageing*. 2021;18(1):23. doi:10.1186/s12979-021-00232-1
303. Williams GC. Natural selection, the costs of reproduction, and a refinement of Lack's principle. *Am Nat*. 1966;100(916):687-690.
304. Medawar PB. An unsolved problem of biology. Published online 1952.
305. Kirkwood TBL. Evolution of ageing. *Nature*. 1977;270(5635):301.
306. Williams GC. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution (N Y)*. 1957;11(4):398-411.
307. Lobo I. Pleiotropy: one gene can affect multiple traits. Published online 2008.
308. Kirkwood TBL, Holliday R. The evolution of ageing and longevity. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci*. 1979;205(1161):531-546.
309. Le Bourg E. A mini-review of the evolutionary theories of aging. *Demogr Res*. 2001;4:1-28. doi:10.4054/DemRes.2001.4.1
310. Kriete A. Evolving Theories of Aging – a Comparison. 2013;(Williams 1957).
311. Kirkwood TB, Rose MR. Evolution of senescence: late survival sacrificed for reproduction. *Philos Trans R Soc London Ser B, Biol Sci*. 1991;332(1262):15-24. doi:10.1098/rstb.1991.0028
312. Reznick D. Costs of reproduction: an evaluation of the empirical evidence. *Oikos*. Published online 1985:257-267.
313. Harshman LG, Zera AJ. The cost of reproduction: the devil in the details. *Trends Ecol Evol*. 2007;22(2):80-86.
314. Kirkwood TBL, Melov S. On the programmed/non-programmed nature of ageing within the life history. *Curr Biol*. 2011;21(18):R701-7. doi:10.1016/j.cub.2011.07.020
315. Goldsmith TC. On the programmed/non-programmed aging controversy. *Biochemistry (Mosc)*. 2012;77(7):729-732. doi:10.1134/S000629791207005X
316. Mitteldorf J, Martins ACR. Programmed life span in the context of evolvability. *Am Nat*. 2014;184(3):289-302. doi:10.1086/677387
317. Travis JMJ. The evolution of programmed death in a spatially structured population. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2004;59(4):301-305. doi:10.1093/gerona/59.4.b301
318. Martins ACR. Change and Aging Senescence as an Adaptation. *PLoS One*. 2011;6(9):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0024328
319. Goldsmith TC. Aging as an evolved characteristic - Weismann's theory reconsidered. *Med Hypotheses*. 2004;62(2):304-308. doi:10.1016/S0306-9877(03)00337-2
320. Longo VD, Mitteldorf J, Skulachev VP. Programmed and altruistic ageing. *Nat Rev Genet*. 2005;6(11):866-872. doi:10.1038/nrg1706
321. de Magalhães JP. Programmatic features of aging originating in development: aging mechanisms beyond molecular damage? *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2012;26(12):4821-4826. doi:10.1096/fj.12-210872
322. Libertini G. Non-programmed versus programmed aging paradigm. *Curr Aging Sci*. 2015;8(1):56-68.
323. Kowald A, Kirkwood TBL. Can aging be programmed? A critical literature review. *Aging Cell*. 2016;15(6):986-998. doi:10.1111/ace1.12510
324. Goldsmith TC. Arguments against non-programmed aging theories. *Biochemistry (Mosc)*. 2013;78(9):971-978.

- doi:10.1134/S0006297913090022
325. Wensink MJ, Cohen AA. The Danaid Theory of Aging. *Front Cell Dev Biol.* 2022;9(January):1-16. doi:10.3389/fcell.2021.671208
  326. Rattan SIS. Theories of biological aging: Genes, proteins, and free radicals. *Free Radic Res.* 2006;40(12):1230-1238. doi:10.1080/10715760600911303
  327. Jin K. Modern Biological Theories of Aging. *Aging Dis.* 2010;1(2):72-74.
  328. Miquel J. An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr.* 1991;12(2-3):99-117. doi:10.1016/0167-4943(91)90022-i
  329. Kriete A, Sokhansanj BA, Coppock DL, West GB. Systems approaches to the networks of aging. *Ageing Res Rev.* 2006;5(4):434-448. doi:10.1016/j.arr.2006.06.002
  330. Wilson EO. *The Insect Societies.*; 1971.
  331. Wilson EO. *Sociobiology: The New Synthesis.* Cambridge, Mass. : Belknap Press of Harvard University Press, 1975.; 1975. <https://search.library.wisc.edu/catalog/999469896202121>
  332. Bignell DE, Roisin Y, Lo N. Biology of termites: A Modern synthesis. *Biol Termit A Mod Synth.* 2011;(March):1-576. doi:10.1007/978-90-481-3977-4
  333. Oster GF, Wilson EO. *Caste and Ecology in the Social Insects.* Princeton University Press; 1978.
  334. Beshers SN, Fewell JH. MODELS OF DIVISION OF LABOR IN SOCIAL INSECTS. *Annu Rev Entomol.* 2001;46(1):413-440. doi:10.1146/annurev.ento.46.1.413
  335. Wilson EO. Behavioral discretization and the number of castes in an ant species. *Behav Ecol Sociobiol.* 1976;1(2):141-154. doi:10.1007/BF00299195
  336. Seeley TD. The honey bee colony as a superorganism. *Am Sci.* Published online 1989.
  337. Johnson BR. Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labour and behavioural flexibility. *Proc R Soc London B Biol Sci.* 2003;270(1511):147-152.
  338. Hölldobler B, Wilson EO. *The Ants.* Harvard University Press; 1990.
  339. Crespi BJ, Yanega D. The definition of eusociality. *Behav Ecol.* 1995;6(1):109-115. doi:10.1093/beheco/6.1.109
  340. Korb J, Hartfelder K. Life history and development - A framework for understanding developmental plasticity in lower termites. *Biol Rev.* 2008;83(3):295-313. doi:10.1111/j.1469-185X.2008.00044.x
  341. Simpson SJ, Sword GA, Lo N. Polyphenism in Insects. *Curr Biol.* 2011;21(18):R738-R749. doi:10.1016/j.cub.2011.06.006
  342. Mayr E. *Animal Species and Evolution.* The Belknap Press of Harvard University Press; 1963. doi:10.4159/harvard.9780674865327
  343. Leonhardt SD, Menzel F, Nehring V, Schmitt T. Ecology and Evolution of Communication in Social Insects. *Cell.* 2016;164(6):1277-1287. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.035
  344. Von Frisch K. *The Dance Language and Orientation of Bees.* Harvard University Press; 2013.
  345. Pailler L, Desvignes S, Ruhland F, Pineirua M, Lucas C. Vibratory behaviour produces different vibration patterns in presence of reproductives in a subterranean termite species. *Sci Rep.* 2021;11(1):9902. doi:10.1038/s41598-021-88292-7
  346. Korb J, Heinze J. Multilevel selection and social evolution of insect societies. *Naturwissenschaften.* 2004;91(6):291-304. doi:10.1007/s00114-004-0529-5
  347. Crozier 1943- RH (Rossiter H. *Evolution of Social Insect Colonies : Sex Allocation and Kin Selection / Ross H. Crozier and Pekka Pamilo.* (Pamilo P, ed.). Oxford University; 1996.
  348. Bourke AFG, Franks NR. *Social Evolution in Ants.* Princeton University Press; 2019.
  349. Korb J, Linsenmair KE. Evaluation of predation risk in the collectively foraging termite *Macrotermes bellicosus*. *Insectes Soc.* 2002;49(3):264-269.
  350. Šobotník JAN, Bourguignon T, Hanus R, Weyda F, Roisin Y. Structure and function of defensive glands in

- soldiers of *Glossotermes oculatus* (Isoptera: Serritermitidae). *Biol J Linn Soc.* 2010;99(4):839-848.  
doi:10.1111/j.1095-8312.2010.01392.x
351. Jones TH, Clark DA, Edwards AA, Davidson DW, Spande TF, Snelling RR. The Chemistry of Exploding Ants, *Camponotus* SPP. (Cylindricus COMPLEX). *J Chem Ecol.* 2004;30(8):1479-1492.  
doi:10.1023/B:JOEC.0000042063.01424.28
352. Hughes WOH, Oldroyd BP, Beekman M, Ratnieks FLW. Ancestral monogamy shows kin selection is key to the evolution of eusociality. *Science.* 2008;320(5880):1213-1216. doi:10.1126/science.1156108
353. Hamilton WD. The genetical evolution of social behaviour. I. *J Theor Biol.* 1964;7(1):1-16.  
doi:https://doi.org/10.1016/0022-5193(64)90038-4
354. Boomsma JJ. Kin Selection versus Sexual Selection: Why the Ends Do Not Meet. *Curr Biol.* 2007;17(16):R673-R683. doi:https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.033
355. Foster KR, Wenseleers T, Ratnieks FLW. Kin selection is the key to altruism. *Trends Ecol Evol.* 2006;21(2):57-60.  
doi:10.1016/j.tree.2005.11.020
356. Hamilton WD. Altruism and Related Phenomena, Mainly in Social Insects. *Annu Rev Ecol Syst.* 1972;3(1):193-232. doi:10.1146/annurev.es.03.110172.001205
357. Wilson EO. Kin Selection as the Key to Altruism: Its Rise and Fall. *Soc Res (New York).* 2005;72(1):159-166.  
<http://www.jstor.org/stable/40972006>
358. Wilson DS, Wilson EO. Rethinking the Theoretical Foundation of Sociobiology. *Q Rev Biol.* 2007;82(4):327-348.  
doi:10.1086/522809
359. Korb J. Ecology of Social Evolution. *Ecol Soc Evol.* 2008;(February 2015). doi:10.1007/978-3-540-75957-7
360. Thorne BL, Breisch NL, Muscedere ML. Evolution of eusociality and the soldier caste in termites: influence of intraspecific competition and accelerated inheritance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(22):12808-12813.  
doi:10.1073/pnas.2133530100
361. O. WE, Bert H. Eusociality: Origin and consequences. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(38):13367-13371.  
doi:10.1073/pnas.0505858102
362. Laurent L, Laurent K, Stuart W, Denis R. Group selection and kin selection: Two concepts but one process. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(16):6736-6739. doi:10.1073/pnas.0700662104
363. Stern DL. A phylogenetic analysis of soldier evolution in the aphid family Hormaphididae. *Proc R Soc London Ser B Biol Sci.* 1994;256(1346):203-209. doi:10.1098/rspb.1994.0071
364. Aoki S, Imai M. Factors affecting the proportion of sterile soldiers in growing aphid colonies. *Popul Ecol.* 2005;47:127-136. doi:10.1007/s10144-005-0218-z
365. Crespi BJ, Carmean David A. and, Chapman TW. ECOLOGY AND EVOLUTION OF GALLING THRIPS AND THEIR ALLIES. *Annu Rev Entomol.* 1997;42(1):51-71. doi:10.1146/annurev.ento.42.1.51
366. Kent DS, Simpson JA. Eusociality in the beetle *Austroplatypus incompertus* (Coleoptera: Curculionidae). *Naturwissenschaften.* 1992;79(2):86-87. doi:10.1007/BF01131810
367. Ross KG, Matthews RW. *The Social Biology of Wasps.* Cornell University Press; 1991.
368. Cardinal S, Danforth BN. The Antiquity and Evolutionary History of Social Behavior in Bees. *PLoS One.* 2011;6(6):e21086. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021086>
369. Brady SG, Sipes S, Pearson A, Danforth BN. Recent and simultaneous origins of eusociality in halictid bees. *Proceedings Biol Sci.* 2006;273(1594):1643-1649. doi:10.1098/rspb.2006.3496
370. Thorne BL. Evolution of Eusociality in Termites. *Annu Rev Ecol Syst.* 1997;28(1):27-54.  
doi:10.1146/annurev.ecolsys.28.1.27
371. Wilson EO. *Success and Dominance in Ecosystems: The Case of the Social Insects.* Vol 2. Ecology Institute Oldendorf/Luhe; 1990.
372. Krishna K, Grimaldi DA, Krishna V, Engel MS. Treatise on the Isoptera of the world.(Bulletin of the American

- Museum of Natural History, no. 377). Published online 2013.
373. Inward D, Beccaloni G, Eggleton P. Death of an order: a comprehensive molecular phylogenetic study confirms that termites are eusocial cockroaches. *Biol Lett*. 2007;3(3):331-335. doi:10.1098/rsbl.2007.0102
374. Nalepa CA, Bandi C. Characterizing the Ancestors: Paedomorphosis and Termite Evolution. In: ; 2000.
375. Thorne BL, Grimaldi DA, Krishna K. Early fossil history of the termites. In: *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Springer; 2000:77-93.
376. Jones DT, Eggleton P. Global biogeography of termites: a compilation of sources. In: *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. Springer; 2010:477-498.
377. Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2013;37(5):699-735. doi:10.1111/1574-6976.12025
378. Bignell DE. Introduction to symbiosis. In: *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Springer; 2000:189-208.
379. Cragg SM, Beckham GT, Bruce NC, et al. Lignocellulose degradation mechanisms across the Tree of Life. *Curr Opin Chem Biol*. 2015;29:108-119. doi:https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.018
380. Bignell DE. The role of symbionts in the evolution of termites and their rise to ecological dominance in the tropics. *Mech benefits Microb symbionts*. Published online 2016:121-172.
381. Nalepa CA. Colony composition, protozoan transfer and some life history characteristics of the woodroach *Cryptocercus punctulatus* Scudder (Dictyoptera: Cryptocercidae). *Behav Ecol Sociobiol*. 1984;14(4):273-279. doi:10.1007/BF00299498
382. Nalepa CA. Origin of termite eusociality: trophallaxis integrates the social, nutritional, and microbial environments. *Ecol Entomol*. 2015;40(4):323-335. doi:https://doi.org/10.1111/een.12197
383. Nalepa CA. Origin of Mutualism Between Termites and Flagellated Gut Protists: Transition From Horizontal to Vertical Transmission. *Front Ecol Evol*. 2020;8. doi:10.3389/fevo.2020.00014
384. Korb J, Heinze J. Major Hurdles for the Evolution of Sociality. *Annu Rev Entomol*. 2016;61(December 2015):297-316. doi:10.1146/annurev-ento-010715-023711
385. Noirot C, Pasteels JM. Ontogenetic development and evolution of the worker caste in termites. *Experientia*. 1987;43(8):851-860. doi:10.1007/BF01951642
386. Alexander RD, Noonan KM, BJ C. The evolution of eusociality. pp: 3-43. *Sherman, P W, Jarvis GUR D Alexander(Eds), Biol naked mole-rat Princet Univ Press Princeton USA*. Published online 1991.
387. Kennedy CH. Child labor of the termite society versus adult labor of the ant society. *Sci Mon*. 1947;65(4):309-324.
388. Korb J. Termites, hemimetabolous diploid white ants? *Front Zool*. 2008;5:15. doi:10.1186/1742-9994-5-15
389. Wu L-W, Bourguignon T, Šobotník J, Wen P, Liang W-R, Li H-F. Phylogenetic position of the enigmatic termite family Stylotermitidae (Insecta : Blattodea). *Invertebr Syst*. 2018;32(5):1111-1117. <https://doi.org/10.1071/IS17093>
390. Hellemans S, Wang M, Hasegawa N, Šobotník J, Scheffrahn RH, Bourguignon T. Using ultraconserved elements to reconstruct the termite tree of life. *bioRxiv*. Published online January 1, 2021:2021.12.09.472027. doi:10.1101/2021.12.09.472027
391. Roisin Y. Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology. In: *In Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. ; 2000:95-119. doi:10.1007/978-94-017-3223-9\_5
392. Roisin Y. *Life History, Life Types and Caste Evolution in Termites*. ; 2006.
393. Noirot C. Sexual Castes and Reproductive Strategies in Termites BT - Social Insects: An Evolutionary Approach to Castes and Reproduction. In: Engels W, ed. Springer Berlin Heidelberg; 1990:5-35. doi:10.1007/978-3-642-74490-7\_3
394. Gross MR. Alternative reproductive strategies and tactics: diversity within sexes. *Trends Ecol Evol*. 1996;11(2):92-98. doi:https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)81050-0

395. Roisin Y, Korb J. Social Organisation and the Status of Workers in Termites. In: *Biology of Termites: A Modern Synthesis*. ; 2010:133-164. doi:10.1007/978-90-481-3977-4\_6
396. Liang W-R, Wu C, Li H-F. Discovery of a cryptic termite genus, *Stylotermes* (Isoptera: Stylotermitidae), in Taiwan, with the description of a new species. *Ann Entomol Soc Am*. 2017;110:360-373. doi:10.1093/aesa/sax034
397. Bourguignon T, Šobotník J, Hanus R, Roisin Y. Developmental pathways of *Glossotermes oculatus* (Isoptera, Serritermitidae): at the cross-roads of worker caste evolution in termites. *Evol Dev*. 2009;11(6):659-668. doi:https://doi.org/10.1111/j.1525-142X.2009.00373.x
398. Barbosa JRC, Constantino R. Polymorphism in the neotropical termite *Serritermes serrifer*. *Entomol Exp Appl*. 2017;163(1):43-50. doi:https://doi.org/10.1111/eea.12532
399. Grasse P-P, Noirot C. Le polymorphisme social du termite a cou jaune (*Kaloterme flavicollis* F.). Les faux-ouvriers ou pseudergate les mues regressives. *Comptes Rendus l'Académie des Sci*. 1947;214:219-221.
400. Abe T. Evolution of life types in termites. *Evol coadaptation Biot communities*. Published online 1987.
401. Korb J, Lenz M. Reproductive decision-making in the termite, *Cryptotermes secundus* (Kalotermitidae), under variable food conditions. *Behav Ecol*. 2004;15(3):390-395.
402. Korb J, Schmidinger S. Help or disperse? Cooperation in termites influenced by food conditions. *Behav Ecol Sociobiol*. 2004;56:89-95. doi:10.1007/s00265-004-0757-x
403. Rupf T, Roisin Y. Coming out of the woods: Do termites need a specialized worker caste to search for new food sources? *Naturwissenschaften*. 2008;95(9):811-819. doi:10.1007/s00114-008-0387-7
404. Higashi M, Yamamura N, Abe T, Burns TP. Why don't all termite species have a sterile worker caste? *Proc R Soc London Ser B Biol Sci*. 1991;246(1315):25-29. doi:10.1098/rspb.1991.0120
405. Abe T. Ecological factors associated with the evolution of worker and soldier in termites. *Ann Entomol*. Published online 1991.
406. Korb J. The Ecology of Social Evolution in Termites. In: *Ecology of Social Evolution*. Springer. ; 2008:151-174. doi:10.1007/978-3-540-75957-7\_7
407. Wild G, Korb J. Evolution of delayed dispersal and subsequent emergence of helping, with implications for cooperative breeding. *J Theor Biol*. 2017;427:53-64. doi:10.1016/j.jtbi.2017.05.038
408. Higashi M, Yamamura N, Abe T. Theories on the sociality of termites. *Termit Evol Soc symbioses, Ecol*. Published online 2000:169-187.
409. Bernadou A, Kramer BH, Korb J. Major Evolutionary Transitions in Social Insects, the Importance of Worker Sterility and Life History Trade-Offs. *Front Ecol Evol*. 2021;9(October):1-7. doi:10.3389/fevo.2021.732907
410. Hölldobler B, Wilson EO. *The Superorganism: The Beauty, Elegance, and Strangeness of Insect Societies*. WW Norton & Company; 2009.
411. Korb J, Katrantzis S. Influence of environmental conditions on the expression of the sexual dispersal phenotype in a lower termite: implications for the evolution of workers in termites. *Evol Dev*. 2004;6(5):342-352. doi:10.1111/j.1525-142X.2004.04042.x
412. Miller EM. Caste differentiation in the lower termites. *Biol Termit*. 1969;1:283-310.
413. Liu Y, Henderson G, Mao L, Laine RA. Seasonal variation of juvenile hormone titers of the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus* (Rhinotermitidae). *Environ Entomol*. 2005;34(3):557-562. doi:10.1603/0046-225X-34.3.557
414. Liu Y, Henderson G, Mao L, Laine RA. Effects of Temperature and Nutrition on Juvenile Hormone Titers of *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Ann Entomol Soc Am*. 2005;98(5):732-737. doi:10.1603/0013-8746(2005)098[0732:EOTANO]2.0.CO;2
415. Korb J, Fuchs A. Termites and Mites - Adaptive Behavioural Responses to Infestation? *Behaviour*. 2006;143(7):891-907. http://www.jstor.org/stable/4536383
416. Bordereau C, Han SH. Stimulatory influence of the queen and king on soldier differentiation in the higher

- termites *Nasutitermes lujae* and *Cubitermes fungifaber*. *Insectes Soc.* 1986;33(3):296-305. doi:10.1007/BF02224247
417. Lüscher M. Kasten und Kastendifferenzierung bei niederen Termiten. In: Schmitdt GH, ed. *Sozialpolymorphismus Bei Insektern*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1974:694-739.
418. Lenz M. Dependence of hormone effects in termite caste determination on external factors. *Phase caste Determ insects*. Published online 1976.
419. Springhetti A. Il controllo dei reali sulla differenziazione degli alati in *Kaloterme flavicollis* Fabr. (Isoptera). *Boll di Zool.* 1971;38(2):101-110. doi:10.1080/11250007109436960
420. Haverty M. The proportion of soldiers in termite colonies: A list and a bibliography (Isoptera). *Sociobiology.* 1977;2:199-216.
421. Haverty MI. Soldier production and maintenance of soldier proportions in laboratory experimental groups of *Coptotermes formosanus* Shiraki. *Insectes Soc.* 1979;26(1):69-84.
422. Haverty MI, Howard RW. Production of soldiers and maintenance of soldier proportions by laboratory experimental groups of *Reticulitermes flavipes* (Kollar) and *Reticulitermes virginicus* (Banks) (Isoptera: Rhinotermitidae). *Insectes Soc.* 1981;28(1):32-39.
423. Noirot C, Darlington JPEC. Termite nests: architecture, regulation and defence. In: *Termites: Evolution, Sociality, Symbioses, Ecology*. Springer; 2000:121-139.
424. Elliott KL, Stay B. Changes in juvenile hormone synthesis in the termite *Reticulitermes flavipes* during development of soldiers and neotenic reproductives from groups of isolated workers. *J Insect Physiol.* 2008;54(2):492-500. doi:10.1016/j.jinsphys.2007.11.008
425. Korb J, Roux EA, Lenz M. Proximate factors influencing soldier development in the basal termite *Cryptotermes secundus* (Hill). *Insectes Soc.* 2003;50(4):299-303. doi:10.1007/s00040-003-0674-4
426. Hoffmann K, Gowin J, Hartfelder K, Korb J. The Scent of Royalty: A P450 Gene Signals Reproductive Status in a Social Insect. *Mol Biol Evol.* 2014;31(10):2689-2696. doi:10.1093/molbev/msu214
427. Weil T, Hoffmann K, Kroiss J, Strohm E, Korb J. Scent of a queen-cuticular hydrocarbons specific for female reproductives in lower termites. *Naturwissenschaften.* 2009;96(2):315-319. doi:10.1007/s00114-008-0475-8
428. Matsuura K, Chihiro H, Tomoyuki Y, Yuuka Y, L. VE, Laurent K. Identification of a pheromone regulating caste differentiation in termites. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(29):12963-12968. doi:10.1073/pnas.1004675107
429. Matsuura K. Multifunctional Queen Pheromone and Maintenance of Reproductive Harmony in Termite Colonies. *J Chem Ecol.* 2012;38:746-754. doi:10.1007/s10886-012-0137-3
430. Hoffmann K, Korb J. Is there conflict over direct reproduction in lower termite colonies? *Anim Behav.* 2011;81(1):265-274. doi:https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.10.017
431. Maekawa K, Nakamura S, Watanabe D. Termite Soldier Differentiation in Incipient Colonies is Related to Parental Proctodeal Trophallactic Behavior. *Zoolog Sci.* 2012;29(4):213-217. doi:10.2108/zsj.29.213
432. Matsuura K. Genomic imprinting and evolution of insect societies. *Popul Ecol.* 2020;62(1):38-52. doi:10.1002/1438-390X.12026
433. Matsuura K. A test of the haplodiploid analogy hypothesis in the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Ann Entomol Soc Am.* 2002;95(5):646-649. doi:10.1603/0013-8746(2002)095[0646:ATOTHA]2.0.CO;2
434. Lo N, Hayashi Y, Kitade O. Should environmental caste determination be assumed for termites? *Am Nat.* 2009;173(6):848-853. doi:10.1086/598498
435. Gardner A, Ross L. Haplodiploidy, sex-ratio adjustment, and eusociality. *Am Nat.* 2013;181(3). doi:10.1086/669147
436. Kitade O, Hoshi M, Odaira S, et al. Evidence for genetically influenced caste determination in phylogenetically diverse species of the termite genus *Reticulitermes*. *Biol Lett.* 2011;7(2):257-260. doi:10.1098/rsbl.2010.0856
437. Goodisman M, Crozier R. Association between caste and genotype in the termite *Mastotermes darwiniensis*



- Froggatt (Isoptera: Mastotermitidae). *Aust J Entomol*. 2003;42:1-5. doi:10.1046/j.1440-6055.2003.00320.x
438. Riddiford LM. Juvenile hormone: the status of its “status quo” action. *Arch Insect Biochem Physiol*. 1996;32(3-4):271-286. doi:10.1002/(SICI)1520-6327(1996)32:3/4<271::AID-ARCH2>3.0.CO;2-W
439. Hartfelder K. Arthropoda–Insecta: caste differentiation. *Prog Dev Endocrinol*. 2000;10(part B):185-204.
440. Henrich VC. The ecdysteroid receptor. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S, eds. *Comprehensive Insect Molecular Science, Vol.3*. Elsevier; 2005:243-285.
441. Lafont R, Dauphin - Villemant C, Warren JT, Rees H. Ecdysteroid chemistry and biochemistry. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill S, eds. *Comprehensive Insect Molecular Science, Vol.3*. Elsevier; 2005:125-195.
442. Korb J. Chapter Four - Juvenile Hormone: A Central Regulator of Termite Caste Polyphenism. In: Zayed A, Kent CFBT-A in IP, eds. *Genomics, Physiology and Behaviour of Social Insects*. Vol 48. Academic Press; 2015:131-161. doi:https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2014.12.004
443. Korb J. Genes underlying reproductive division of labor in termites, with comparisons to social Hymenoptera. *Front Ecol Evol*. 2016;4(APR):1-10. doi:10.3389/fevo.2016.00045
444. Watanabe D, Gotoh H, Miura T, Maekawa K. Social interactions affecting caste development through physiological actions in termites . *Front Physiol* . 2014;5. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2014.00127>
445. Brent CS, Schal C, Vargo EL. Endocrine changes in maturing primary queens of *Zootermopsis angusticollis*. *J Insect Physiol*. 2005;51(11):1200-1209. doi:10.1016/j.jinsphys.2005.06.009
446. Okot-Kotber BM. Mechanisms of caste determination in a higher termite, *Macrotermes michaelsoni* (Isoptera, Macrotermitinae). In: *Caste Differentiation in Social Insects*. Elsevier; 1985:267-306.
447. Park YI, Raina AK. Regulation of juvenile hormone titers by soldiers in the Formosan subterranean termite, *Coptotermes formosanus*. *J Insect Physiol*. 2005;51(4):385-391. doi:10.1016/j.jinsphys.2005.02.001
448. Mao L, Henderson G, Liu Y, Laine RA. Formosan Subterranean Termite (Isoptera: Rhinotermitidae) Soldiers Regulate Juvenile Hormone Levels and Caste Differentiation in Workers. *Ann Entomol Soc Am*. 2005;98(3):340-345. doi:10.1603/0013-8746(2005)098[0340:FSTIRS]2.0.CO;2
449. Elsner D, Hartfelder K, Korb J. Molecular underpinnings of division of labour among workers in a socially complex termite. *Sci Rep*. 2021;11(1):1-8. doi:10.1038/s41598-021-97515-w
450. Weil T, Rehli M, Korb J. Molecular basis for the reproductive division of labour in a lower termite. *BMC Genomics*. 2007;8(1):198. doi:10.1186/1471-2164-8-198
451. Lin S, Werle J, Korb J. Transcriptomic analyses of the termite, *Cryptotermes secundus*, reveal a gene network underlying a long lifespan and high fecundity. *Commun Biol*. 2021;4(1):1-12. doi:10.1038/s42003-021-01892-x
452. Cornette R, Koshikawa S, Hojo M, Matsumoto T, Miura T. Caste-specific cytochrome P450 in the damp-wood termite *Hodotermopsis sjostedti* (Isoptera, Termopsidae). *Insect Mol Biol*. 2006;15(2):235-244. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00632.x
453. Helvig C, Koener JF, Unnithan GC, Feyereisen R. CYP15A1, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach corpora allata. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(12):4024-4029. doi:10.1073/pnas.0306980101
454. Zhou X, Song C, Grzymala TL, Oi FM, Scharf ME. Juvenile hormone and colony conditions differentially influence cytochrome P450 gene expression in the termite *Reticulitermes flavipes*. *Insect Mol Biol*. 2006;15(6):749-761.
455. Tarver MR, Coy MR, Scharf ME. Cyp15F1: A novel cytochrome p450 gene linked to juvenile hormone-dependent caste differentiation in the termite *reticulitermes flavipes*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2012;80(2):92-108. doi:10.1002/arch.21030
456. Yagi KJ, Kwok R, Chan KK, et al. Phe-Gly-Leu-amide allatostatin in the termite *Reticulitermes flavipes*: content in brain and corpus allatum and effect on juvenile hormone synthesis. *J Insect Physiol*. 2005;51(4):357-365.

- doi:10.1016/j.jinsphys.2004.12.006
457. Okot-Kotber BM, Prestwich GD. Juvenile hormone binding proteins of termites detected by photoaffinity labeling: comparison of *Zootermopsis nevadensis* with two Rhinotermitids. *Arch Insect Biochem Physiol.* 1991;17(2-3):119-128.
458. Okot-Kotber BM, Prestwich GD. Identification of a juvenile hormone binding protein in the castes of the termite, *Reticulitermes flavipes*, by photoaffinity labeling. *Insect Biochem.* 1991;21(7):775-784.
459. Scharf ME, Wu-Scharf D, Zhou X, Pittendrigh BR, Bennett GW. Gene expression profiles among immature and adult reproductive castes of the termite *Reticulitermes flavipes*. *Insect Mol Biol.* 2005;14(1):31-44.  
doi:10.1111/j.1365-2583.2004.00527.x
460. Scharf ME, Ratliff CR, Wu-Scharf D, Zhou X, Pittendrigh BR, Bennett GW. Effects of juvenile hormone III on *Reticulitermes flavipes*: changes in hemolymph protein composition and gene expression. *Insect Biochem Mol Biol.* 2005;35(3):207-215.
461. Zhou X, Tarver MR, Bennett GW, Oi FM, Scharf ME. Two hexamerin genes from the termite *Reticulitermes flavipes*: Sequence, expression, and proposed functions in caste regulation. *Gene.* 2006;376(1):47-58.  
doi:10.1016/j.gene.2006.02.002
462. Zhou X, Oi FM, Scharf ME. Social exploitation of hexamerin: RNAi reveals a major caste-regulatory factor in termites. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(12):4499-4504.
463. Zhou X, Tarver MR, Scharf ME. Hexamerin-based regulation of juvenile hormone-dependent gene expression underlies phenotypic plasticity in a social insect. *Development.* 2007;134(3):601-610. doi:10.1242/dev.02755
464. Aguilar R, Maestro JL, Vilaplana L, Pascual N, Piulachs M-D, Bellés X. Allatostatin gene expression in brain and midgut, and activity of synthetic allatostatins on feeding-related processes in the cockroach *Blattella germanica*. *Regul Pept.* 2003;115(3):171-177. doi:10.1016/s0167-0115(03)00165-4
465. Aguilar R, Maestro JL, Bellés X. Effects of myoinhibitory peptides on food intake in the German cockroach. *Physiol Entomol.* 2006;31(3):257-261. doi:10.1111/j.1365-3032.2006.00513.x
466. Johnson BR. Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behav Ecol Sociobiol.* 2010;64(3):305-316.
467. Sullivan JP, Jassim O, Fahrbach SE, Robinson GE. Juvenile Hormone Paces Behavioral Development in the Adult Worker Honey Bee. *Horm Behav.* 2000;37(1):1-14. doi:https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1552
468. Huang Z-Y, Robinson GE, Tobe SS, et al. Hormonal regulation of behavioural development in the honey bee is based on changes in the rate of juvenile hormone biosynthesis. *J Insect Physiol.* 1991;37(10):733-741.  
doi:https://doi.org/10.1016/0022-1910(91)90107-B
469. Wheeler DE, Nijhout HF. Soldier Determination in Ants: New Role for Juvenile Hormone. *Science (80- ).* 1981;213(4505):361-363. <http://www.jstor.org/stable/1686847>
470. Hawkings C, Calkins TL, Pietrantonio P V, Tamborindeguy C. Caste-based differential transcriptional expression of hexamerins in response to a juvenile hormone analog in the red imported fire ant (*Solenopsis invicta*). *PLoS One.* 2019;14(5):e0216800. doi:10.1371/journal.pone.0216800
471. Dolezal AG, Brent CS, Hölldobler B, Amdam G V. Worker division of labor and endocrine physiology are associated in the harvester ant, *Pogonomyrmex californicus*. *J Exp Biol.* 2012;215(Pt 3):454-460.  
doi:10.1242/jeb.060822
472. Norman VC, Hughes WOH. Behavioural effects of juvenile hormone and their influence on division of labour in leaf-cutting ant societies. *J Exp Biol.* 2016;219(Pt 1):8-11. doi:10.1242/jeb.132803
473. Heinze J, Schrempf A. Aging and reproduction in social insects--a mini-review. *Gerontology.* 2008;54(3):160-167.  
doi:10.1159/000122472
474. Keller L. Queen lifespan and colony characteristics in ants and termites. *Insectes Soc.* 1998;45(3):235-246.
475. Keller L, Genoud M. Extraordinary lifespans in ants: a test of evolutionary theories of ageing. *Nature.*

- 1997;389(6654):958.
476. Korb J. Why do social insect queens live so long? Approaches to unravel the sociality-aging puzzle. *Curr Opin Insect Sci.* 2016;16:104-107. doi:10.1016/j.cois.2016.06.004
477. Haddad LS, Kelbert L, Hulbert AJ. Extended longevity of queen honey bees compared to workers is associated with peroxidation-resistant membranes. *Exp Gerontol.* 2007;42(7):601-609. doi:https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.02.008
478. Parker JD. What are social insects telling us about aging? *Myrmecological News.* 2010;13:103-110.
479. Rueppell O, Aumer D, Moritz RF. Ties between ageing plasticity and reproductive physiology in honey bees (*Apis mellifera*) reveal a positive relation between fecundity and longevity as consequence of advanced social evolution. *Curr Opin insect Sci.* 2016;16:64-68. doi:10.1016/j.cois.2016.05.009
480. Blacher P, Huggins TJ, Bourke AFG. Evolution of ageing, costs of reproduction and the fecundity–longevity trade-off in eusocial insects. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2017;284(1858). doi:10.1098/rspb.2017.0380
481. Piper MDW, Partridge L. *Drosophila* as a model for ageing. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2018;1864(9, Part A):2707-2717. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.09.016
482. Tsurumi A, Li WX. Aging mechanisms—A perspective mostly from *Drosophila*. *Adv Genet.* 2020;1(1):e10026. doi:https://doi.org/10.1002/ggn2.10026
483. Kōks S, Dogan S, Tuna BG, González-Navarro H, Potter P, Vandenbroucke RE. Mouse models of ageing and their relevance to disease. *Mech Ageing Dev.* 2016;160:41-53. doi:https://doi.org/10.1016/j.mad.2016.10.001
484. Holtze S, Gorshkova E, Braude S, et al. Alternative Animal Models of Aging Research. *Front Mol Biosci.* 2021;8(May). doi:10.3389/fmolb.2021.660959
485. Carey JR. Demographic mechanisms for the evolution of long life in social insects. *Exp Gerontol.* 2001;36(4-6):713-722.
486. Stearns SC. *The Evolution of Life Histories.*; 1992.
487. Keller L, Genoud M. Evolutionary theories of aging. 1. The need to understand the process of natural selection. *Gerontology.* 1999;45(6):336-338. doi:10.1159/000022115
488. Kappeler PM, Cremer S, Nunn CL. Sociality and health: impacts of sociality on disease susceptibility and transmission in animal and human societies. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2015;370(1669):20140116. doi:10.1098/rstb.2014.0116
489. Korb J, Heinze J. Ageing and sociality: Why, when and how does sociality change ageing patterns? *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2021;376(1823). doi:10.1098/rstb.2019.0727
490. Chapuisat M, Keller L. Division of labour influences the rate of ageing in weaver ant workers. *Proceedings Biol Sci.* 2002;269(1494):909-913. doi:10.1098/rspb.2002.1962
491. Hartmann A, Heinze J. Lay eggs, live longer: division of labor and life span in a clonal ant species. *Evolution.* 2003;57(10):2424-2429. doi:10.1111/j.0014-3820.2003.tb00254.x
492. Tsuji K, Nakata K, Heinze J. Lifespan and reproduction in a queenless ant. *Naturwissenschaften.* 1996;83(12):577-578. doi:10.1007/BF01141985
493. Bourke AFG. Kin Selection and the Evolutionary Theory of Aging. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2007;38(1):103-128. doi:10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095528
494. Lee RD. Rethinking the evolutionary theory of aging: transfers, not births, shape senescence in social species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(16):9637-9642. doi:10.1073/pnas.1530303100
495. Kramer BH, Schaible R. Colony size explains the lifespan differences between queens and workers in eusocial Hymenoptera. *Biol J Linn Soc.* 2013;109(3):710-724. doi:10.1111/bij.12072
496. Wilson EO. *Organization of Insect Societies: From Genome to Sociocomplexity.* Harvard University Press; 2009.
497. Korb J, Thorne B. Sociality in Termites. In: Rubenstein DR, Abbot P, eds. *Comparative Social Evolution.* Cambridge University Press; 2017:124–153. doi:10.1017/9781107338319.006

498. Elsner D, Meusemann K, Korb J. Longevity and transposon defense, the case of termite reproductives. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(21):5504-5509. doi:10.1073/pnas.1804046115
499. Seehuus S-C, Norberg K, Gimsa U, Krekling T, Amdam G V. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(4):962-967.
500. Schneider SA, Schrader C, Wagner AE, et al. Stress Resistance and Longevity Are Not Directly Linked to Levels of Enzymatic Antioxidants in the Ponerine Ant *Harpegnathos saltator*. *PLoS One*. 2011;6(1):1-8. doi:10.1371/journal.pone.0014601
501. Majoe M, Libbrecht R, Foitzik S, Nehring V. Queen loss increases worker survival in leaf-cutting ants under paraquat-induced oxidative stress. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2021;376(1823):20190735. doi:10.1098/rstb.2019.0735
502. Kramer BH, Nehring V, Buttstedt A, et al. Oxidative stress and senescence in social insects: A significant but inconsistent link? *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2021;376(1823). doi:10.6084/m9.figshare.c.5280338
503. Parker JD, Parker KM, Sohal BH, Sohal RS, Keller L. Decreased expression of Cu-Zn superoxide dismutase 1 in ants with extreme lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(10):3486-3489. doi:10.1073/pnas.0400222101
504. Corona M, Hughes KA, Weaver DB, Robinson GE. Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mech Ageing Dev*. 2005;126(11):1230-1238. doi:10.1016/j.mad.2005.07.004
505. Corona M, Robinson GE. Genes of the antioxidant system of the honey bee: annotation and phylogeny. *Insect Mol Biol*. 2006;15(5):687-701. doi:10.1111/j.1365-2583.2006.00695.x
506. Kuhn JMM, Meusemann K, Korb J. Long live the queen, the king and the commoner? Transcript expression differences between old and young in the termite *Cryptotermes secundus*. *PLoS One*. 2019;14(2):1-26. doi:10.1371/journal.pone.0210371
507. Negroni MA, Foitzik S, Feldmeyer B. Long-lived Temnothorax ant queens switch from investment in immunity to antioxidant production with age. *Sci Rep*. 2019;9(1):7270. doi:10.1038/s41598-019-43796-1
508. Tasaki E, Takata M, Matsuura K. Why and how do termite kings and queens live so long? *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2021;376(1823). doi:10.1098/rstb.2019.0740
509. Hsieh Y-S, Hsu C-Y. Oxidative stress and anti-oxidant enzyme activities in the trophocytes and fat cells of queen honeybees (*Apis mellifera*). *Rejuvenation Res*. 2013;16(4):295-303. doi:10.1089/rej.2013.1420
510. Gonzalez AN, Ing N, Rangel J. Upregulation of antioxidant genes in the spermathecae of honey bee (*Apis mellifera*) queens after mating. *Apidologie*. 2018;49(2):224-234. doi:10.1007/s13592-017-0546-y
511. Collins AM, Williams V, Evans JD. Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Mol Biol*. 2004;13(2):141-146. doi:https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00469.x
512. Rau V, Korb J. The effect of environmental stress on ageing in a termite species with low social complexity. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2021;376(1823). doi:10.1098/rstb.2019.0739
513. Tasaki E, Kobayashi K, Matsuura K, Iuchi Y. Long-Lived Termite Queens Exhibit High Cu/Zn-Superoxide Dismutase Activity. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:5127251. doi:10.1155/2018/5127251
514. Tasaki E, Kobayashi K, Matsuura K, Iuchi Y. An Efficient Antioxidant System in a Long-Lived Termite Queen. *PLoS One*. 2017;12(1):e0167412. doi:10.1371/journal.pone.0167412
515. Lucas ER, Privman E, Keller L. Higher expression of somatic repair genes in long-lived ant queens than workers. *Ageing (Albany NY)*. 2016;8(9):1940-1951. doi:10.18632/aging.101027
516. Tasaki E, Mitaka Y, Nozaki T, Kobayashi K, Matsuura K, Iuchi Y. High expression of the breast cancer susceptibility gene BRCA1 in long-lived termite kings. *Ageing (Albany NY)*. 2018;10(10):2668-2683. doi:10.18632/aging.101578
517. Zhao W, Steinfeld JB, Liang F, et al. BRCA1-BARD1 promotes RAD51-mediated homologous DNA pairing. *Nature*. 2017;550(7676):360-365. doi:10.1038/nature24060
518. Gorrini C, Baniasadi PS, Harris IS, et al. BRCA1 interacts with Nrf2 to regulate antioxidant signaling and cell

- survival. *J Exp Med.* 2013;210(8):1529-1544. doi:10.1084/jem.20121337
519. Kawai S, Amano A. BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. *J Cell Biol.* 2012;197(2):201-208. doi:10.1083/jcb.201110008
520. Xiaolin B, Deepa S, Laura F, et al. Drosophila ATM and ATR checkpoint kinases control partially redundant pathways for telomere maintenance. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(42):15167-15172. doi:10.1073/pnas.0504981102
521. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, et al. ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science (80- )*. 2007;316(5828):1160-1166. doi:10.1126/science.1140321
522. Kidiyoor GR, Kumar A, Foiani M. ATR-mediated regulation of nuclear and cellular plasticity. *DNA Repair (Amst)*. 2016;44:143-150. doi:10.1016/j.dnarep.2016.05.020
523. Korb J, Meusemann K, Aumer D, et al. Comparative transcriptomic analysis of the mechanisms underpinning ageing and fecundity in social insects. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2021;376(1823). doi:10.1098/rstb.2019.0728
524. Flatt T, Tu M-P, Tatar M. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of Drosophila development and life history. *Bioessays.* 2005;27(10):999-1010. doi:10.1002/bies.20290
525. Toivonen JM, Partridge L. Endocrine regulation of aging and reproduction in Drosophila. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;299(1):39-50.
526. Rodrigues MA, Flatt T. Endocrine uncoupling of the trade-off between reproduction and somatic maintenance in eusocial insects. *Curr Opin Insect Sci.* 2016;16:1-8. doi:10.1016/j.cois.2016.04.013
527. Bellés X, Martín D, Piulachs M-D. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu Rev Entomol.* 2005;50:181-199. doi:10.1146/annurev.ento.50.071803.130356
528. Maekawa K, Ishitani K, Gotoh H, Cornette R, Miura T. Juvenile Hormone titre and vitellogenin gene expression related to ovarian development in primary reproductives compared with nymphs and nymphoid reproductives of the termite *Reticulitermes speratus*. *Physiol Entomol.* 2010;35(1):52-58. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.2009.00711.x
529. Tatar M, Bartke A, Antebi A. The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science.* 2003;299(5611):1346-1351. doi:10.1126/science.1081447
530. Tu MP, Flatt T, Tatar M. Juvenile and Steroid Hormones in Drosophila melanogaster Longevity. *Handb Biol Aging.* 2005;16:415-448. doi:10.1016/B978-012088387-5/50018-2
531. Evans DS, Kapahi P, Hsueh W-C, Kockel L. TOR signaling never gets old: aging, longevity and TORC1 activity. *Ageing Res Rev.* 2011;10(2):225-237.
532. Partridge L, Alic N, Bjedov I, Piper MDW. Ageing in Drosophila: the role of the insulin/Igf and TOR signalling network. *Exp Gerontol.* 2011;46(5):376-381. doi:10.1016/j.exger.2010.09.003
533. Corona M, Velarde RA, Remolina S, et al. Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(17):7128-7133. doi:10.1073/pnas.0701909104
534. Rascon B, Mutti NS, Tolfsen C, Amdam G V. Honey bee life history plasticity: Development, behavior, and aging. *Mech Life Hist Evol Genet Physiol Life Hist Trait Trade-Offs*. Published online 2011:253-266.
535. Pinto LZ, Bitondi MMG, Simões ZLP. Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *J Insect Physiol.* 2000;46(2):153-160.
536. Amdam G V, Simões ZLP, Hagen A, et al. Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Exp Gerontol.* 2004;39(5):767-773. doi:10.1016/j.exger.2004.02.010
537. Pamminger T, Treanor D, Hughes WOH. Pleiotropic effects of juvenile hormone in ant queens and the escape from the reproduction-immunocompetence trade-off. *Proceedings Biol Sci.* 2016;283(1822). doi:10.1098/rspb.2015.2409
538. Weitekamp CA, Libbrecht R, Keller L. Genetics and Evolution of Social Behavior in Insects. *Annu Rev Genet.* 2017;51(1):219-239. doi:10.1146/annurev-genet-120116-024515

539. Jehlík T. Aktivita telomerázy u termíta *Prorhinotermes simplex*. Published online 2017.
540. Scheffrahn RH, Su N-Y, Cabrera B, Kern, Jr. W. Cuban Subterranean Termite (proposed), Florida Dampwood Termite (old unofficial name), *Prorhinotermes simplex* (Hagen) (Insecta: Isoptera: Rhinotermitidae). *Edis*. 1969;2004(18):1-3. doi:10.32473/edis-in558-2003
541. Roisin Y. Morphology, development and evolutionary significance of the working stages in the caste system of *Prorhinotermes* (Insecta, Isoptera). *Zoomorphology*. 1988;107(6):339-347. doi:10.1007/BF00312217
542. Inward DJG, Vogler AP, Eggleton P. A comprehensive phylogenetic analysis of termites (Isoptera) illuminates key aspects of their evolutionary biology. *Mol Phylogenet Evol*. 2007;44(3):953-967. doi:10.1016/j.ympev.2007.05.014
543. Eggleton P, Tayasu I. Feeding groups, litypes and the global ecology of termites. *Ecol Res*. 2001;16(5):941-960. doi:10.1046/j.1440-1703.2001.00444.x
544. Koubová J, Pangrácová M, Jankásek M, et al. Long-lived termite kings and queens activate telomerase in somatic organs. *Proc R Soc B Biol Sci*. 2021;288(1949):20210511. doi:10.1098/rspb.2021.0511
545. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Published 2010. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
546. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114-2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170
547. Song L, Florea L. Rcorrector: efficient and accurate error correction for Illumina RNA-seq reads. *Gigascience*. 2015;4(1):48. doi:10.1186/s13742-015-0089-y
548. Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*. 2011;29(7):644-652. doi:10.1038/nbt.1883
549. Gilbert D. EvidentialGene: Evidence Directed gene predictions for eukaryots. Published 2010. <http://arthropods.eugenes.org/EvidentialGene/>
550. Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009;10(3):R25. doi:10.1186/gb-2009-10-3-r25
551. Seppey M, Manni M, Zdobnov EM. BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. *Methods Mol Biol*. 2019;1962:227-245. doi:10.1007/978-1-4939-9173-0\_14
552. Hass B. TransDecoder. Published 2015. <https://github.com/TransDecoder/TransDecoder>
553. Bryant DM, Johnson K, DiTommaso T, et al. A Tissue-Mapped Axolotl De Novo Transcriptome Enables Identification of Limb Regeneration Factors. *Cell Rep*. 2017;18(3):762-776. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.063
554. Consortium TU. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(D1):D204-D212. doi:10.1093/nar/gku989
555. Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, et al. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009;10(1):421. doi:10.1186/1471-2105-10-421
556. Finn RD, Bateman A, Clements J, et al. Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(D1):D222-D230. doi:10.1093/nar/gkt1223
557. Eddy SR. Accelerated Profile HMM Searches. *PLoS Comput Biol*. 2011;7(10):e1002195. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002195>
558. Patro R, Duggal G, Love MI, Irizarry RA, Kingsford C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods*. 2017;14(4):417-419. doi:10.1038/nmeth.4197
559. Ewels P, Magnusson M, Lundin S, Källér M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*. 2016;32(19):3047-3048. doi:10.1093/bioinformatics/btw354
560. Li H. Seqtk: a fast and lightweight tool for processing FASTA or FASTQ sequences. Published 2013. <https://github.com/lh3/seqtk>
561. Chu J, Sadeghi S, Raymond A, et al. BioBloom tools: fast, accurate and memory-efficient host species sequence

- screening using bloom filters. *Bioinformatics*. 2014;30(23):3402-3404. doi:10.1093/bioinformatics/btu558
562. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635
563. Smith T, Heger A, Sudbery I. UMI-tools: modeling sequencing errors in Unique Molecular Identifiers to improve quantification accuracy. *Genome Res*. 2017;27(3):491-499. doi:10.1101/gr.209601.116
564. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2009;25(16):2078-2079. doi:10.1093/bioinformatics/btp352
565. Institute B. Picard Toolkit. Published 2019. <https://broadinstitute.github.io/picard/>
566. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The R package Rsubread is easier, faster, cheaper and better for alignment and quantification of RNA sequencing reads. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(8):e47. doi:10.1093/nar/gkz114
567. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30(7):923-930. doi:10.1093/bioinformatics/btt656
568. Li B, Dewey CN. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 2011;12(1):323. doi:10.1186/1471-2105-12-323
569. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
570. Marini F, Binder H. pcaExplorer: an R/Bioconductor package for interacting with RNA-seq principal components. *BMC Bioinformatics*. 2019;20(1):331. doi:10.1186/s12859-019-2879-1
571. Wu T, Hu E, Xu S, et al. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. *Innov*. 2021;2(3):100141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141>
572. R Foundation for Statistical Computing. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Published online 2022. <https://www.r-project.org>
573. Langfelder P, Horvath S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*. 2008;9(1):559. doi:10.1186/1471-2105-9-559
574. Müllner D. fastcluster: Fast Hierarchical, Agglomerative Clustering Routines for R and Python. *J Stat Softw*. 2013;53(9 SE-Articles):1-18. doi:10.18637/jss.v053.i09
575. Zhang B, Horvath S. A general framework for weighted gene co-expression network analysis. *Stat Appl Genet Mol Biol*. 2005;4:Article17. doi:10.2202/1544-6115.1128
576. Langfelder P, Zhang B, Horvath S. Defining clusters from a hierarchical cluster tree: the Dynamic Tree Cut package for R. *Bioinformatics*. 2008;24(5):719-720.
577. Demchak B, Hull T, Reich M, et al. Cytoscape: the network visualization tool for GenomeSpace workflows. *F1000Research*. 2014;3.
578. Blighe K. CorLevelPlot: Visualise correlation results and test significancies of these. Published online 2018. <https://github.com/kevinblighe>
579. Chen H, Boutros PC. VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics*. 2011;12(1):35. doi:10.1186/1471-2105-12-35
580. Gu Z. Complex heatmap visualization. *iMeta*. 2022;1(3):e43. doi:<https://doi.org/10.1002/imt2.43>
581. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4(1):44-57.
582. Hoshino A, Wang W-J, Wada S, et al. The ADP/ATP translocase drives mitophagy independent of nucleotide exchange. *Nature*. 2019;575(7782):375-379. doi:10.1038/s41586-019-1667-4
583. Salazar C, Ruiz-Hincapie P, Ruiz LM. The Interplay among PINK1/PARKIN/DJ-1 Network during Mitochondrial Quality Control in Cancer Biology: Protein Interaction Analysis. *Cells*. 2018;7(10). doi:10.3390/cells7100154
584. Hao L-Y, Giasson BI, Bonini NM. DJ-1 is critical for mitochondrial function and rescues PINK1 loss of function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(21):9747-9752. doi:10.1073/pnas.0911175107

585. Blatnik M, Frizzell N, Thorpe SR, Baynes JW. Inactivation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by fumarate in diabetes: formation of S-(2-succinyl)cysteine, a novel chemical modification of protein and possible biomarker of mitochondrial stress. *Diabetes*. 2008;57(1):41-49. doi:10.2337/db07-0838
586. Kornberg MD, Sen N, Hara MR, et al. GAPDH mediates nitrosylation of nuclear proteins. *Nat Cell Biol*. 2010;12(11):1094-1100. doi:10.1038/ncb2114
587. Chang C, Su H, Zhang D, et al. AMPK-Dependent Phosphorylation of GAPDH Triggers Sirt1 Activation and Is Necessary for Autophagy upon Glucose Starvation. *Mol Cell*. 2015;60(6):930-940. doi:10.1016/j.molcel.2015.10.037
588. Iqbal IK, Bajeli S, Sahu S, Bhat SA, Kumar A. Hydrogen sulfide-induced GAPDH sulfhydration disrupts the CCAR2-SIRT1 interaction to initiate autophagy. *Autophagy*. 2021;17(11):3511-3529. doi:10.1080/15548627.2021.1876342
589. Hara MR, Agrawal N, Kim SF, et al. S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nat Cell Biol*. 2005;7(7):665-674. doi:10.1038/ncb1268
590. Kitatani K, Sheldon K, Rajagopalan V, et al. Involvement of acid beta-glucosidase 1 in the salvage pathway of ceramide formation. *J Biol Chem*. 2009;284(19):12972-12978. doi:10.1074/jbc.M802790200
591. Magalhaes J, Gegg ME, Migdalska-Richards A, Doherty MK, Whitfield PD, Schapira AH V. Autophagic lysosome reformation dysfunction in glucocerebrosidase deficient cells: relevance to Parkinson disease. *Hum Mol Genet*. 2016;25(16):3432-3445. doi:10.1093/hmg/ddw185
592. Akiyama H, Ide M, Nagatsuka Y, et al. Glucocerebrosidases catalyze a transgalactosylation reaction that yields a newly-identified brain sterol metabolite, galactosylated cholesterol. *J Biol Chem*. 2020;295(16):5257-5277. doi:10.1074/jbc.RA119.012502
593. Akiyama H, Kobayashi S, Hirabayashi Y, Murakami-Murofushi K. Cholesterol glucosylation is catalyzed by transglucosylation reaction of  $\beta$ -glucosidase 1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;441(4):838-843. doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.145
594. Gegg ME, Schapira AH V. Mitochondrial dysfunction associated with glucocerebrosidase deficiency. *Neurobiol Dis*. 2016;90:43-50. doi:10.1016/j.nbd.2015.09.006
595. Mustafa AK, Gadalla MM, Sen N, et al. H<sub>2</sub>S signals through protein S-sulfhydration. *Sci Signal*. 2009;2(96):ra72. doi:10.1126/scisignal.2000464
596. Jiang X, MacArthur MR, Treviño-Villarreal JH, et al. Intracellular H(2)S production is an autophagy-dependent adaptive response to DNA damage. *Cell Chem Biol*. 2021;28(12):1669-1678.e5. doi:10.1016/j.chembiol.2021.05.016
597. Magni M, Ruscica V, Buscemi G, et al. Chk2 and REG $\gamma$ -dependent DBC1 regulation in DNA damage induced apoptosis. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(21):13150-13160. doi:10.1093/nar/gku1065
598. Bingol B, Tea JS, Phu L, et al. The mitochondrial deubiquitinase USP30 opposes parkin-mediated mitophagy. *Nature*. 2014;510(7505):370-375. doi:10.1038/nature13418
599. Nakamura N, Hirose S. Regulation of mitochondrial morphology by USP30, a deubiquitinating enzyme present in the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell*. 2008;19(5):1903-1911. doi:10.1091/mbc.e07-11-1103
600. Sanghavi P, Koenig H. Autophagy-related changes of arylsulphatases A and B in rat liver lysosomes. *Biochem J*. 1976;155(3):725-728. doi:10.1042/bj1550725
601. Vernis L, Facca C, Delagoutte E, et al. A newly identified essential complex, Dre2-Tah18, controls mitochondria integrity and cell death after oxidative stress in yeast. *PLoS One*. 2009;4(2). doi:10.1371/journal.pone.0004376
602. Yoshikawa Y, Nasuno R, Kawahara N, Nishimura A, Watanabe D, Takagi H. Regulatory mechanism of the flavoprotein Tah18-dependent nitric oxide synthesis and cell death in yeast. *Nitric oxide Biol Chem*. 2016;57:85-91. doi:10.1016/j.niox.2016.04.003
603. Lu X, Li Y, Liu J, et al. The membrane topological analysis of  $3\beta$ -hydroxysteroid-Delta24 reductase (DHCR24) on



- endoplasmic reticulum. *J Mol Endocrinol*. 2012;48(1):1-9. doi:10.1530/JME-11-0132
604. Greeve I, Hermans-Borgmeyer I, Brellinger C, et al. The human DIMINUTO/DWARF1 homolog seladin-1 confers resistance to Alzheimer's disease-associated neurodegeneration and oxidative stress. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2000;20(19):7345-7352. doi:10.1523/JNEUROSCI.20-19-07345.2000
605. Wu C, Miloslavskaya I, Demontis S, Maestro R, Galaktionov K. Regulation of cellular response to oncogenic and oxidative stress by Seladin-1. *Nature*. 2004;432(7017):640-645. doi:10.1038/nature03173
606. Nishimura T, Kohara M, Izumi K, et al. Hepatitis C virus impairs p53 via persistent overexpression of 3beta-hydroxysterol Delta24-reductase. *J Biol Chem*. 2009;284(52):36442-36452. doi:10.1074/jbc.M109.043232
607. Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, et al. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science*. 2000;287(5459):1824-1827. doi:10.1126/science.287.5459.1824
608. Yang S, Kuo C, Bisi JE, Kim MK. PML-dependent apoptosis after DNA damage is regulated by the checkpoint kinase hCds1/Chk2. *Nat Cell Biol*. 2002;4(11):865-870. doi:10.1038/ncb869
609. Stracker TH, Couto SS, Cordon-Cardo C, Matos T, Petrini JHJ. Chk2 suppresses the oncogenic potential of DNA replication-associated DNA damage. *Mol Cell*. 2008;31(1):21-32. doi:10.1016/j.molcel.2008.04.028
610. Falck J, Mailand N, Syljuåsen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. 2001;410(6830):842-847. doi:10.1038/35071124
611. Chen L, Gilkes DM, Pan Y, Lane WS, Chen J. ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage. *EMBO J*. 2005;24(19):3411-3422. doi:10.1038/sj.emboj.7600812
612. Tan Y, Raychaudhuri P, Costa RH. Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes. *Mol Cell Biol*. 2007;27(3):1007-1016. doi:10.1128/MCB.01068-06
613. Stevens C, Smith L, La Thangue NB. Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol*. 2003;5(5):401-409. doi:10.1038/ncb974
614. Inoue Y, Kitagawa M, Taya Y. Phosphorylation of pRB at Ser612 by Chk1/2 leads to a complex between pRB and E2F-1 after DNA damage. *EMBO J*. 2007;26(8):2083-2093. doi:10.1038/sj.emboj.7601652
615. Lee JT, Gu W. SIRT1: Regulator of p53 Deacetylation. *Genes and Cancer*. 2013;4(3-4):112-117. doi:10.1177/1947601913484496
616. Matsuzawa SI, Reed JC. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell*. 2001;7(5):915-926. doi:10.1016/s1097-2765(01)00242-8
617. Tang AH, Neufeld TP, Kwan E, Rubin GM. PHYL acts to down-regulate TTK88, a transcriptional repressor of neuronal cell fates, by a SINA-dependent mechanism. *Cell*. 1997;90(3):459-467. doi:10.1016/s0092-8674(00)80506-1
618. Hu G, Chung YL, Glover T, Valentine V, Look AT, Fearon ER. Characterization of human homologs of the Drosophila seven in absentia (sina) gene. *Genomics*. 1997;46(1):103-111. doi:10.1006/geno.1997.4997
619. Peserico A, Chiacchiera F, Grossi V, et al. A novel AMPK-dependent FoxO3A-SIRT3 intramitochondrial complex sensing glucose levels. *Cell Mol Life Sci*. 2013;70(11):2015-2029. doi:10.1007/s00018-012-1244-6
620. Hagenbuchner J, Ausserlechner MJ. Mitochondria and FOXO3: Breath or die. *Front Physiol*. 2013;4 JUN(June):1-10. doi:10.3389/fphys.2013.00147
621. Alhazzazi TY, Kamarajan P, Verdin E, Kapila YL. SIRT3 and cancer: Tumor promoter or suppressor? *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2011;1816(1):80-88. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2011.04.004
622. Yaprıntseva MA, Maximchik P V, Zhivotovsky B, Gogvadze V. Mitochondrial sirtuin 3 and various cell death modalities. *Front cell Dev Biol*. 2022;10:947357. doi:10.3389/fcell.2022.947357
623. Pellegrini L, Pucci B, Villanova L, et al. SIRT3 protects from hypoxia and staurosporine-mediated cell death by maintaining mitochondrial membrane potential and intracellular pH. *Cell Death Differ*. 2012;19(11):1815-1825. doi:10.1038/cdd.2012.62
624. Bartley MG, Marquardt K, Kirchoff D, Wilkins HM, Patterson D, Linseman DA. Overexpression of amyloid-β

- protein precursor induces mitochondrial oxidative stress and activates the intrinsic apoptotic cascade. *J Alzheimers Dis.* 2012;28(4):855-868. doi:10.3233/JAD-2011-111172
625. L Marquardt K, M Wilkins H, Manning E, et al. Induction of Bax-dependent neuronal apoptosis by Amyloid- $\beta$  Protein Precursor (A $\beta$ PP) requires its localization to functional mitochondria. *J Syst Integr Neurosci.* 2017;3(2):1-10. doi:10.15761/jsin.1000157
626. Lee E-W, Lee M-S, Camus S, et al. Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis. *EMBO J.* 2009;28(14):2100-2113. doi:https://doi.org/10.1038/emboj.2009.164
627. Jin Y, Murakumo Y, Ueno K, et al. Identification of a mouse cytoskeleton-associated protein, CKAP2, with microtubule-stabilizing properties. *Cancer Sci.* 2004;95(10):815-821. doi:10.1111/j.1349-7006.2004.tb02187.x
628. Tsuchihara K, Lapin V, Bakal C, et al. Ckap2 regulates aneuploidy, cell cycling, and cell death in a p53-dependent manner. *Cancer Res.* 2005;65(15):6685-6691. doi:10.1158/0008-5472.can-04-4223
629. Wu Y, Wang Y, Sun Y, et al. RACK1 promotes Bax oligomerization and dissociates the interaction of Bax and Bcl-XL. *Cell Signal.* 2010;22(10):1495-1501. doi:10.1016/j.cellsig.2010.05.018
630. Mamidipudi V, Cartwright CA. A novel pro-apoptotic function of RACK1: suppression of Src activity in the intrinsic and Akt pathways. *Oncogene.* 2009;28(50):4421-4433. doi:10.1038/onc.2009.293
631. Polonio-Vallon T, Kirkpatrick J, Krijgsveld J, Hofmann TG. Src kinase modulates the apoptotic p53 pathway by altering HIPK2 localization. *Cell Cycle.* 2014;13(1):115-125. doi:10.4161/cc.26857
632. Ho S-R, Mahanic CS, Lee Y-J, Lin W-C. RNF144A, an E3 ubiquitin ligase for DNA-PKcs, promotes apoptosis during DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(26):E2646-55. doi:10.1073/pnas.1323107111
633. Zhou A, Ou AC, Cho A, Benz EJJ, Huang S-C. Novel splicing factor RBM25 modulates Bcl-x pre-mRNA 5' splice site selection. *Mol Cell Biol.* 2008;28(19):5924-5936. doi:10.1128/MCB.00560-08
634. Kashiwaya K, Hosokawa M, Eguchi H, et al. Identification of C2orf18, termed ANT2BP (ANT2-binding protein), as one of the key molecules involved in pancreatic carcinogenesis. *Cancer Sci.* 2009;100(3):457-464. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.01058.x
635. Karch J, Bround MJ, Khalil H, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition by deletion of the ANT family and CypD. *Sci Adv.* 2019;5(8):eaaw4597. doi:10.1126/sciadv.aaw4597
636. Bertholet AM, Chouchani ET, Kazak L, et al. H(+) transport is an integral function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Nature.* 2019;571(7766):515-520. doi:10.1038/s41586-019-1400-3
637. Goldman EH, Chen L, Fu H. Activation of Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 by Reactive Oxygen Species through Dephosphorylation at Serine 967 and 14-3-3 Dissociation\*. *J Biol Chem.* 2004;279(11):10442-10449. doi:https://doi.org/10.1074/jbc.M311129200
638. Morrison DK. The 14-3-3 proteins: integrators of diverse signaling cues that impact cell fate and cancer development. *Trends Cell Biol.* 2009;19(1):16-23. doi:10.1016/j.tcb.2008.10.003
639. Pennington KL, Chan TY, Torres MP, Andersen JL. The dynamic and stress-adaptive signaling hub of 14-3-3: emerging mechanisms of regulation and context-dependent protein-protein interactions. *Oncogene.* 2018;37(42):5587-5604. doi:10.1038/s41388-018-0348-3
640. Pozuelo-Rubio M. 14-3-3 Proteins are Regulators of Autophagy. *Cells.* 2012;1(4):754-773. doi:10.3390/cells1040754
641. Menzies FM, Yenissetti SC, Min K-T. Roles of Drosophila DJ-1 in survival of dopaminergic neurons and oxidative stress. *Curr Biol.* 2005;15(17):1578-1582. doi:10.1016/j.cub.2005.07.036
642. Meulener M, Whitworth AJ, Armstrong-Gold CE, et al. Drosophila DJ-1 mutants are selectively sensitive to environmental toxins associated with Parkinson's disease. *Curr Biol.* 2005;15(17):1572-1577. doi:10.1016/j.cub.2005.07.064
643. Fan J, Ren H, Jia N, et al. DJ-1 Decreases Bax Expression through Repressing p53 Transcriptional Activity\*. *J Biol Chem.* 2008;283(7):4022-4030. doi:https://doi.org/10.1074/jbc.M707176200

644. Kato I, Maita H, Takahashi-Niki K, et al. Oxidized DJ-1 inhibits p53 by sequestering p53 from promoters in a DNA-binding affinity-dependent manner. *Mol Cell Biol*. 2013;33(2):340-359. doi:10.1128/MCB.01350-12
645. Kayagaki N, Kornfeld OS, Lee BL, et al. NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. *Nature*. 2021;591(7848):131-136. doi:10.1038/s41586-021-03218-7
646. Yang HJ, Zhang J, Yan W, et al. Ninjurin 1 has two opposing functions in tumorigenesis in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114(43):11500-11505. doi:10.1073/pnas.1711814114
647. Cho S-J, Rossi A, Jung Y-S, et al. Ninjurin1, a target of p53, regulates p53 expression and p53-dependent cell survival, senescence, and radiation-induced mortality. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(23):9362-9367. doi:10.1073/pnas.1221242110
648. Vozza A, Parisi G, De Leonardis F, et al. UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(3):960-965. doi:10.1073/pnas.1317400111
649. Echtay KS, Winkler E, Frischmuth K, Klingenberg M. Uncoupling proteins 2 and 3 are highly active H(+) transporters and highly nucleotide sensitive when activated by coenzyme Q (ubiquinone). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(4):1416-1421. doi:10.1073/pnas.98.4.1416
650. Stuart JA, Harper JA, Brindle KM, Jekabsons MB, Brand MD. Physiological levels of mammalian uncoupling protein 2 do not uncouple yeast mitochondria. *J Biol Chem*. 2001;276(21):18633-18639. doi:10.1074/jbc.M011566200
651. Krauss S, Zhang C-Y, Lowell BB. A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(1):118-122. doi:10.1073/pnas.012410699
652. Wang F, Fu X, Chen X, Chen X, Zhao Y. Mitochondrial Uncoupling Inhibits p53 Mitochondrial Translocation in TPA-Challenged Skin Epidermal JB6 Cells. *PLoS One*. 2010;5(10):e13459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013459>
653. Hirose M, Schilf P, Lange F, et al. Uncoupling protein 2 protects mice from aging. *Mitochondrion*. 2016;30:42-50. doi:10.1016/j.mito.2016.06.004
654. Andrews ZB, Horvath TL. Uncoupling protein-2 regulates lifespan in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009;296(4):E621-7. doi:10.1152/ajpendo.90903.2008
655. Sayeed A, Meng Z, Luciani G, Chen L-C, Bennington JL, Dairkee SH. Negative regulation of UCP2 by TGFβ signaling characterizes low and intermediate-grade primary breast cancer. *Cell Death Dis*. 2010;1(7):e53-e53. doi:10.1038/cddis.2010.30
656. Katayama H, Sasai K, Kawai H, et al. Phosphorylation by aurora kinase A induces Mdm2-mediated destabilization and inhibition of p53. *Nat Genet*. 2004;36(1):55-62. doi:10.1038/ng1279
657. Kamran M, Long Z-J, Xu D, et al. Aurora kinase A regulates Survivin stability through targeting FBXL7 in gastric cancer drug resistance and prognosis. *Oncogenesis*. 2017;6(2):e298. doi:10.1038/oncsis.2016.80
658. Kuwahara H, Kamei J, Nakamura N, Matsumoto M, Inoue H, Kanazawa H. The apoptosis-inducing protein kinase DRAK2 is inhibited in a calcium-dependent manner by the calcium-binding protein CHP. *J Biochem*. 2003;134(2):245-250. doi:10.1093/jb/mvg137
659. Recuenco MC, Rahman MM, Sakamoto Y, Takeuchi F, Hori H, Tsubaki M. Functional characterization of the recombinant human tumour suppressor 101F6 protein, a cytochrome b(561) homologue. *J Biochem*. 2013;153(2):233-242. doi:10.1093/jb/mvs139
660. Recuenco MC, Rahman MM, Takeuchi F, Kobayashi K, Tsubaki M. Electron transfer reactions of candidate tumor suppressor 101F6 protein, a cytochrome b561 homologue, with ascorbate and monodehydroascorbate radical. *Biochemistry*. 2013;52(21):3660-3668. doi:10.1021/bi301607s
661. Pozzer D. *Unravelling the Role of Ascorbic Acid and ER Stress in SEPNI-Related Myopathy*. Open University (United Kingdom); 2020.
662. Pozzer D, Favellato M, Bolis M, et al. Endoplasmic Reticulum Oxidative Stress Triggers Tgf-Beta-Dependent

- Muscle Dysfunction by Accelerating Ascorbic Acid Turnover. *Sci Rep.* 2017;7(1):40993. doi:10.1038/srep40993
663. Njus D, Kelley PM, Tu Y-J, Schlegel HB. Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. *Free Radic Biol Med.* 2020;159:37-43. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2020.07.013
664. Gęgotek A, Skrzydlewska E. Antioxidative and Anti-Inflammatory Activity of Ascorbic Acid. *Antioxidants.* 2022;11(10). doi:10.3390/antiox11101993
665. Kuehnle K, Cramer A, Kälin RE, et al. Prosurvival effect of DHCR24/Seladin-1 in acute and chronic responses to oxidative stress. *Mol Cell Biol.* 2008;28(2):539-550. doi:10.1128/MCB.00584-07
666. Bause AS, Haigis MC. SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress. *Exp Gerontol.* 2013;48(7):634-639. doi:https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.08.007
667. Lee S, Jeon Y-M, Jo M, Kim H-J. Overexpression of SIRT3 Suppresses Oxidative Stress-induced Neurotoxicity and Mitochondrial Dysfunction in Dopaminergic Neuronal Cells. *Exp Neurobiol.* 2021;30(5):341-355. doi:10.5607/en21021
668. Chen M-E, Lewis DK, Keeley LL, Pietrantonio P V. cDNA cloning and transcriptional regulation of the vitellogenin receptor from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Mol Biol.* 2004;13(2):195-204. doi:10.1111/j.0962-1075.2004.00477.x
669. Salovska B, Kondelova A, Pimkova K, et al. Peroxiredoxin 6 protects irradiated cells from oxidative stress and shapes their senescence-associated cytokine landscape. *Redox Biol.* 2022;49:102212. doi:https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102212
670. Lim Y, Traber MG. Alpha-Tocopherol Transfer Protein (alpha-TTP): Insights from Alpha-Tocopherol Transfer Protein Knockout Mice. *Nutr Res Pract.* 2007;1(4):247-253. doi:10.4162/nrp.2007.1.4.247
671. Ulatowski L, Dreussi C, Noy N, Barnholtz-Sloan J, Klein E, Manor D. Expression of the  $\alpha$ -tocopherol transfer protein gene is regulated by oxidative stress and common single-nucleotide polymorphisms. *Free Radic Biol Med.* 2012;53(12):2318-2326. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.528
672. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med.* 2007;43(1):4-15. doi:https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024
673. Walbrecht G, Wang B, Becker S, Hannotiau A, Fransens M, Knoop B. Antioxidant cytoprotection by peroxisomal peroxiredoxin-5. *Free Radic Biol Med.* 2015;84:215-226. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.032
674. Wang Y, Branicky R, Noë A, Hekimi S. Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *J Cell Biol.* 2018;217(6):1915-1928.
675. Nielsen MD, Luo X, Biteau B, Syverson K, Jasper H. 14-3-3 Epsilon antagonizes FoxO to control growth, apoptosis and longevity in *Drosophila*. *Aging Cell.* 2008;7(5):688-699. doi:10.1111/j.1474-9726.2008.00420.x
676. Hetru C, Li KW, Bulet P, Lagueux M, Hoffmann JA. Isolation and structural characterization of an insulin-related molecule, a predominant neuropeptide from *Locusta migratoria*. *Eur J Biochem.* 1991;201(2):495-499. doi:10.1111/j.1432-1033.1991.tb16308.x
677. Kim W, Jang Y-G, Yang J, Chung J. Spatial Activation of TORC1 Is Regulated by Hedgehog and E2F1 Signaling in the *Drosophila* Eye. *Dev Cell.* 2017;42(4):363-375.e4. doi:10.1016/j.devcel.2017.07.020
678. Naik MU, Naik UP. Contra-regulation of calcium- and integrin-binding protein 1-induced cell migration on fibronectin by PAK1 and MAP kinase signaling. *J Cell Biochem.* 2011;112(11):3289-3299. doi:10.1002/jcb.23255
679. Yoon KW, Cho J-H, Lee JK, et al. CIB1 functions as a Ca<sup>2+</sup>-sensitive modulator of stress-induced signaling by targeting ASK1. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(41):17389-17394. doi:10.1073/pnas.0812259106
680. Creemers JWM, Pritchard LE, Gyte A, et al. Agouti-related protein is posttranslationally cleaved by proprotein convertase 1 to generate agouti-related protein (AGRP)83-132: interaction between AGRP83-132 and melanocortin receptors cannot be influenced by syndecan-3. *Endocrinology.* 2006;147(4):1621-1631. doi:10.1210/en.2005-1373
681. Steiner DF, Rouillé Y, Gong Q, Martin S, Carroll R, Chan SJ. The role of prohormone convertases in insulin

- biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes Metab.* 1996;22(2):94-104.
682. Winsky-Sommerer R, Grouselle D, Rougeot C, et al. The proprotein convertase PC2 is involved in the maturation of prosomatostatin to somatostatin-14 but not in the somatostatin deficit in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2003;122(2):437-447. doi:10.1016/s0306-4522(03)00560-8
683. Arancio O, Zhang HP, Chen X, et al. RAGE potentiates A $\beta$ -induced perturbation of neuronal function in transgenic mice. *EMBO J.* 2004;23(20):4096-4105. doi:10.1038/sj.emboj.7600415
684. Kam T-I, Song S, Gwon Y, et al. Fc $\gamma$ RIIb mediates amyloid- $\beta$  neurotoxicity and memory impairment in Alzheimer's disease. *J Clin Invest.* 2013;123(7):2791-2802. doi:10.1172/JCI66827
685. Bodles AM, Barger SW. Secreted beta-amyloid precursor protein activates microglia via JNK and p38-MAPK. *Neurobiol Aging.* 2005;26(1):9-16. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.02.022
686. Kirouac L, Rajic AJ, Cribbs DH, Padmanabhan J. Activation of Ras-ERK Signaling and GSK-3 by Amyloid Precursor Protein and Amyloid Beta Facilitates Neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *eNeuro.* 2017;4(2). doi:10.1523/ENEURO.0149-16.2017
687. Wang Q, Zhou S, Wang J-Y, et al. RACK1 antagonizes TNF- $\alpha$ -induced cell death by promoting p38 activation. *Sci Rep.* 2015;5:14298. doi:10.1038/srep14298
688. López-Bergami P, Habelhah H, Bhoumik A, Zhang W, Wang L-H, Ronai Z. RACK1 mediates activation of JNK by protein kinase C [corrected]. *Mol Cell.* 2005;19(3):309-320. doi:10.1016/j.molcel.2005.06.025
689. Lin J, Lee D, Choi Y, Lee SY. The scaffold protein RACK1 mediates the RANKL-dependent activation of p38 MAPK in osteoclast precursors. *Sci Signal.* 2015;8(379):ra54. doi:10.1126/scisignal.2005867
690. Khapre R V, Kondratova AA, Patel S, et al. BMAL1-dependent regulation of the mTOR signaling pathway delays aging. *Aging (Albany NY).* 2014;6(1):48-57. doi:10.18632/aging.100633
691. Noshita N, Sugawara T, Hayashi T, Lewén A, Omar G, Chan PH. Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing extracellular signal-regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 2002;22(18):7923-7930. doi:10.1523/JNEUROSCI.22-18-07923.2002
692. Ziegler K, Kurz CL, Cypowyj S, et al. Antifungal innate immunity in *C. elegans*: PKCdelta links G protein signaling and a conserved p38 MAPK cascade. *Cell Host Microbe.* 2009;5(4):341-352. doi:10.1016/j.chom.2009.03.006
693. Pastuhov SI, Fujiki K, Nix P, et al. Endocannabinoid-Go $\alpha$  signalling inhibits axon regeneration in *Caenorhabditis elegans* by antagonizing Gq $\alpha$ -PKC-JNK signalling. *Nat Commun.* 2012;3:1136. doi:10.1038/ncomms2136
694. Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, et al. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature.* 1999;401(6752):480-485. doi:10.1038/46794
695. Jena N, Martín-Seisdedos C, McCue P, Croce CM. BMP7 null mutation in mice: developmental defects in skeleton, kidney, and eye. *Exp Cell Res.* 1997;230(1):28-37. doi:10.1006/excr.1996.3411
696. Segklia A, Seuntjens E, Elkouris M, et al. Bmp7 regulates the survival, proliferation, and neurogenic properties of neural progenitor cells during corticogenesis in the mouse. *PLoS One.* 2012;7(3):e34088. doi:10.1371/journal.pone.0034088
697. Nistala H, Lee-Arteaga S, Smaldone S, et al. Fibrillin-1 and -2 differentially modulate endogenous TGF- $\beta$  and BMP bioavailability during bone formation. *J Cell Biol.* 2010;190(6):1107-1121. doi:10.1083/jcb.201003089
698. Savage C, Das P, Finelli AL, et al. *Caenorhabditis elegans* genes sma-2, sma-3, and sma-4 define a conserved family of transforming growth factor  $\beta$  pathway components. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(2):790-794. doi:10.1073/pnas.93.2.790
699. Das P, Maduzia LL, Wang H, et al. The *Drosophila* gene Medea demonstrates the requirement for different classes of Smads in dpp signaling. *Development.* 1998;125(8):1519-1528. doi:10.1242/dev.125.8.1519

700. Wiersdorff V, Lecuit T, Cohen SM, Mlodzik M. Mad acts downstream of Dpp receptors, revealing a differential requirement for dpp signaling in initiation and propagation of morphogenesis in the *Drosophila* eye. *Development*. 1996;122(7):2153-2162. doi:10.1242/dev.122.7.2153
701. Zhao G, Wu Y, Du L, et al. *Drosophila* S6 Kinase like inhibits neuromuscular junction growth by downregulating the BMP receptor thickveins. *PLoS Genet*. 2015;11(3):e1004984. doi:10.1371/journal.pgen.1004984
702. Sen N, Paul BD, Gadalla MM, et al. Hydrogen sulfide-linked sulphydration of NF- $\kappa$ B mediates its antiapoptotic actions. *Mol Cell*. 2012;45(1):13-24. doi:10.1016/j.molcel.2011.10.021
703. Akhouayri I, Turc C, Royet J, Charroux B. Toll-8/Tollo negatively regulates antimicrobial response in the *Drosophila* respiratory epithelium. *PLoS Pathog*. 2011;7(10):e1002319. doi:10.1371/journal.ppat.1002319
704. Lu X, Wang M, Qi J, et al. Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. *J Biol Chem*. 2006;281(9):5895-5907. doi:10.1074/jbc.M511631200
705. Werner T, Borge-Renberg K, Mellroth P, Steiner H, Hultmark D. Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *J Biol Chem*. 2003;278(29):26319-26322. doi:10.1074/jbc.C300184200
706. Maillet F, Bischoff V, Vignal C, Hoffmann J, Royet J. The *Drosophila* peptidoglycan recognition protein PGRP-LF blocks PGRP-LC and IMD/JNK pathway activation. *Cell Host Microbe*. 2008;3(5):293-303. doi:10.1016/j.chom.2008.04.002
707. Shin MW, Bae S-J, Wee H-J, et al. Ninjurin1 regulates lipopolysaccharide-induced inflammation through direct binding. *Int J Oncol*. 2016;48(2):821-828. doi:10.3892/ijo.2015.3296
708. Broderick S, Wang X, Simms N, Page-McCaw A. *Drosophila* Ninjurin A induces nonapoptotic cell death. *PLoS One*. 2012;7(9):e44567. doi:10.1371/journal.pone.0044567
709. Wang Y, Cheng T, Rayaprolu S, et al. Proteolytic activation of pro-spätzle is required for the induced transcription of antimicrobial peptide genes in lepidopteran insects. *Dev Comp Immunol*. 2007;31(10):1002-1012. doi:10.1016/j.dci.2007.01.001
710. Shia AKH, Glittenberg M, Thompson G, Weber AN, Reichhart J-M, Ligoxygakis P. Toll-dependent antimicrobial responses in *Drosophila* larval fat body require Spätzle secreted by haemocytes. *J Cell Sci*. 2009;122(Pt 24):4505-4515. doi:10.1242/jcs.049155
711. Valanne S, Wang J-H, Rämetsä M. The *Drosophila* Toll signaling pathway. *J Immunol*. 2011;186(2):649-656. doi:10.4049/jimmunol.1002302
712. Yu KH, Kim KN, Lee JH, et al. Comparative study on characteristics of lysozymes from the hemolymph of three lepidopteran larvae, *Galleria mellonella*, *Bombyx mori*, *Agrius convolvuli*. *Dev Comp Immunol*. 2002;26(8):707-713. doi:10.1016/s0145-305x(02)00027-7
713. Li B, Calvo E, Marinotti O, James AA, Paskewitz SM. Characterization of the c-type lysozyme gene family in *Anopheles gambiae*. *Gene*. 2005;360(2):131-139. doi:10.1016/j.gene.2005.07.001
714. Kanagawa M, Satoh T, Ikeda A, Adachi Y, Ohno N, Yamaguchi Y. Structural insights into recognition of triple-helical beta-glucans by an insect fungal receptor. *J Biol Chem*. 2011;286(33):29158-29165. doi:10.1074/jbc.M111.256701
715. Sritunyalucksana K, Lee SY, Söderhäll K. A beta-1,3-glucan binding protein from the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Dev Comp Immunol*. 2002;26(3):237-245. doi:10.1016/s0145-305x(01)00074-x
716. Ahmad ST, Sweeney ST, Lee J-A, Sweeney NT, Gao F-B. Genetic screen identifies serpin5 as a regulator of the toll pathway and CHMP2B toxicity associated with frontotemporal dementia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(29):12168-12173. doi:10.1073/pnas.0903134106
717. Jomori T, Natori S. Molecular cloning of cDNA for lipopolysaccharide-binding protein from the hemolymph of the American cockroach, *Periplaneta americana*: Similarity of the protein with animal lectins and its acute phase expression. *J Biol Chem*. 1991;266(20):13318-13323. doi:10.1016/s0021-9258(18)98841-1

718. Gandhe AS, Arunkumar KP, John SH, Nagaraju J. Analysis of bacteria-challenged wild silkmoth, *Antheraea mylitta* (lepidoptera) transcriptome reveals potential immune genes. *BMC Genomics*. 2006;7:184. doi:10.1186/1471-2164-7-184
719. Gokudan S, Muta T, Tsuda R, et al. Horseshoe crab acetyl group-recognizing lectins involved in innate immunity are structurally related to fibrinogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(18):10086-10091. doi:10.1073/pnas.96.18.10086
720. Welch MD, DePace AH, Verma S, Iwamatsu A, Mitchison TJ. The human Arp2/3 complex is composed of evolutionarily conserved subunits and is localized to cellular regions of dynamic actin filament assembly. *J Cell Biol*. 1997;138(2):375-384. doi:10.1083/jcb.138.2.375
721. Schrank BR, Aparicio T, Li Y, et al. Nuclear ARP2/3 drives DNA break clustering for homology-directed repair. *Nature*. 2018;559(7712):61-66. doi:10.1038/s41586-018-0237-5
722. Lee M-Y, Kim H-J, Kim M-A, et al. Nek6 is involved in G2/M phase cell cycle arrest through DNA damage-induced phosphorylation. *Cell Cycle*. 2008;7(17):2705-2709. doi:10.4161/cc.7.17.6551
723. Bahassi EM, Ovesen JL, Riesenberger AL, Bernstein WZ, Hasty PE, Stambrook PJ. The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. *Oncogene*. 2008;27(28):3977-3985. doi:10.1038/onc.2008.17
724. Zhang J, Willers H, Feng Z, et al. Chk2 phosphorylation of BRCA1 regulates DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*. 2004;24(2):708-718. doi:10.1128/MCB.24.2.708-718.2004
725. Emelyanov A V, Rabbani J, Mehta M, Vershilova E, Keogh MC, Fyodorov D V. Drosophila TAP/p32 is a core histone chaperone that cooperates with NAP-1, NLP, and nucleophosmin in sperm chromatin remodeling during fertilization. *Genes Dev*. 2014;28(18):2027-2040. doi:10.1101/gad.248583.114
726. Okuwaki M, Sumi A, Hisaoka M, et al. Function of homo- and hetero-oligomers of human nucleoplasmin/nucleophosmin family proteins NPM1, NPM2 and NPM3 during sperm chromatin remodeling. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(11):4861-4878. doi:10.1093/nar/gks162
727. Huang N, Negi S, Szébeni A, Olson MOJ. Protein NPM3 interacts with the multifunctional nucleolar protein B23/nucleophosmin and inhibits ribosome biogenesis. *J Biol Chem*. 2005;280(7):5496-5502. doi:10.1074/jbc.M407856200
728. Moshkin YM, Armstrong JA, Maeda RK, et al. Histone chaperone ASF1 cooperates with the Brahma chromatin-remodelling machinery. *Genes Dev*. 2002;16(20):2621-2626. doi:10.1101/gad.231202
729. Fromental-Ramain C, Ramain P, Hamiche A. The Drosophila DAXX-Like Protein (DLP) Cooperates with ASF1 for H3.3 Deposition and Heterochromatin Formation. *Mol Cell Biol*. 2017;37(12). doi:10.1128/MCB.00597-16
730. Tyler JK, Adams CR, Chen SR, Kobayashi R, Kamakaka RT, Kadonaga JT. The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair. *Nature*. 1999;402(6761):555-560. doi:10.1038/990147
731. Rydberg B, Game J. Excision of misincorporated ribonucleotides in DNA by RNase H (type 2) and FEN-1 in cell-free extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(26):16654-16659. doi:10.1073/pnas.262591699
732. Figiel M, Chon H, Cerritelli SM, Cybulska M, Crouch RJ, Nowotny M. The structural and biochemical characterization of human RNase H2 complex reveals the molecular basis for substrate recognition and Aicardi-Goutières syndrome defects. *J Biol Chem*. 2011;286(12):10540-10550. doi:10.1074/jbc.M110.181974
733. Ghodgaonkar MM, Lazzaro F, Olivera-Pimentel M, et al. Ribonucleotides misincorporated into DNA act as strand-discrimination signals in eukaryotic mismatch repair. *Mol Cell*. 2013;50(3):323-332. doi:10.1016/j.molcel.2013.03.019
734. Ma Y, Pannicke U, Schwarz K, Lieber MR. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*. 2002;108(6):781-794. doi:10.1016/s0092-8674(02)00671-2
735. Ma Y, Lu H, Tippin B, et al. A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining.

- Mol Cell*. 2004;16(5):701-713. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.017
736. Negrutskii BS, El'skaya A V. Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 $\alpha$ : Structure, Expression, Functions, and Possible Role in Aminoacyl-tRNA Channeling. In: Moldave KBT-P in NAR and MB, ed. Vol 60. Academic Press; 1998:47-78. doi:https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)60889-2
737. Shepherd JC, Walldorf U, Hug P, Gehring WJ. Fruit flies with additional expression of the elongation factor EF-1 alpha live longer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(19):7520-7521. doi:10.1073/pnas.86.19.7520
738. Borradaile NM, Buhman KK, Listenberger LL, et al. A Critical Role for Eukaryotic Elongation Factor 1A-1 in Lipotoxic Cell Death. *Mol Biol Cell*. 2005;17(2):770-778. doi:10.1091/mbc.e05-08-0742
739. Komander D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*. 2009;37(Pt 5):937-953. doi:10.1042/BST0370937
740. Yu Y, Zheng Q, Erramilli SK, et al. K29-linked ubiquitin signaling regulates proteotoxic stress response and cell cycle. *Nat Chem Biol*. 2021;17(8):896-905. doi:10.1038/s41589-021-00823-5
741. Huang F, Kirkpatrick D, Jiang X, Gygi S, Sorkin A. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell*. 2006;21(6):737-748. doi:10.1016/j.molcel.2006.02.018
742. Takeda K, Yanagida M. Regulation of Nuclear Proteasome by Rhp6/Ubc2 through Ubiquitination and Destruction of the Sensor and Anchor Cut8. *Cell*. 2005;122(3):393-405. doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.023
743. Nagasawa K, Higashi T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K. Simultaneous induction of the four subunits of the TRAP complex by ER stress accelerates ER degradation. *EMBO Rep*. 2007;8(5):483-489. doi:10.1038/sj.embor.7400933
744. Ménétret J-F, Hegde RS, Heinrich SU, et al. Architecture of the ribosome-channel complex derived from native membranes. *J Mol Biol*. 2005;348(2):445-457. doi:10.1016/j.jmb.2005.02.053
745. Lakkaraju AK, Abrami L, Lemmin T, et al. Palmitoylated calnexin is a key component of the ribosome-translocon complex. *EMBO J*. 2012;31(7):1823-1835. doi:10.1038/emboj.2012.15
746. Hartmann E, Prehn S. The N-terminal region of the alpha-subunit of the TRAP complex has a conserved cluster of negative charges. *FEBS Lett*. 1994;349(3):324-326. doi:10.1016/0014-5793(94)00693-8
747. Sundaramoorthy E, Leonard M, Mak R, Liao J, Fulzele A, Bennett EJ. ZNF598 and RACK1 Regulate Mammalian Ribosome-Associated Quality Control Function by Mediating Regulatory 40S Ribosomal Ubiquitylation. *Mol Cell*. 2017;65(4):751-760.e4. doi:10.1016/j.molcel.2016.12.026
748. Anger AM, Armache J-P, Berninghausen O, et al. Structures of the human and Drosophila 80S ribosome. *Nature*. 2013;497(7447):80-85. doi:10.1038/nature12104
749. Mackenzie K, Foot NJ, Anand S, et al. Regulation of the divalent metal ion transporter via membrane budding. *Cell Discov*. 2016;2:16011. doi:10.1038/celldisc.2016.11
750. Shea FF, Rowell JL, Li Y, Chang T-H, Alvarez CE. Mammalian  $\alpha$  arrestins link activated seven transmembrane receptors to Nedd4 family e3 ubiquitin ligases and interact with  $\beta$  arrestins. *PLoS One*. 2012;7(12):e50557. doi:10.1371/journal.pone.0050557
751. Anand S, Foot N, Ang C-S, et al. Arrestin-Domain Containing Protein 1 (Arrdc1) Regulates the Protein Cargo and Release of Extracellular Vesicles. *Proteomics*. 2018;18(17):e1800266. doi:10.1002/pmic.201800266
752. Laity JH, Lee BM, Wright PE. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*. 2001;11(1):39-46. doi:10.1016/s0959-440x(00)00167-6
753. Hatakeyama S, Nakayama KI. Ubiquitylation as a quality control system for intracellular proteins. *J Biochem*. 2003;134(1):1-8. doi:10.1093/jb/mvg106
754. Medvar B, Raghuram V, Pisitkun T, Sarkar A, Knepper MA. Comprehensive database of human E3 ubiquitin ligases: application to aquaporin-2 regulation. *Physiol Genomics*. 2016;48(7):502-512. doi:10.1152/physiolgenomics.00031.2016



755. Chomez P, De Backer O, Bertrand M, De Plaen E, Boon T, Lucas S. An overview of the MAGE gene family with the identification of all human members of the family. *Cancer Res.* 2001;61(14):5544-5551.
756. Hao Y-H, Doyle JM, Ramanathan S, et al. Regulation of WASH-dependent actin polymerization and protein trafficking by ubiquitination. *Cell.* 2013;152(5):1051-1064. doi:10.1016/j.cell.2013.01.051
757. Sinha A, Köhrer C, Weber MHW, et al. Biochemical characterization of pathogenic mutations in human mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase. *J Biol Chem.* 2014;289(47):32729-32741. doi:10.1074/jbc.M114.610626
758. Tucker EJ, Hershman SG, Köhrer C, et al. Mutations in MTFMT underlie a human disorder of formylation causing impaired mitochondrial translation. *Cell Metab.* 2011;14(3):428-434. doi:10.1016/j.cmet.2011.07.010
759. Priimägi AF, Mizrokhi LJ, Ilyin Y V. The Drosophila mobile element jockey belongs to LINEs and contains coding sequences homologous to some retroviral proteins. *Gene.* 1988;70(2):253-262. doi:10.1016/0378-1119(88)90197-7
760. Mizrokhi LJ, Mazo AM. Evidence for horizontal transmission of the mobile element jockey between distant Drosophila species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(23):9216-9220. doi:10.1073/pnas.87.23.9216
761. Tudor M, Davis AJ, Feldman M, Grammatikaki M, O'Hare K. The X element, a novel LINE transposable element from Drosophila melanogaster. *Mol Genet Genomics.* 2001;265(3):489-496. doi:10.1007/s004380000437
762. Yuki S, Inouye S, Ishimaru S, Saigo K. Nucleotide sequence characterization of a Drosophila retrotransposon, 412. *Eur J Biochem.* 1986;158(2):403-410. doi:10.1111/j.1432-1033.1986.tb09767.x
763. Shepherd BM, Finnegan DJ. Structure of circular copies of the 412 transposable element present in Drosophila melanogaster tissue culture cells, and isolation of a free 412 long terminal repeat. *J Mol Biol.* 1984;180(1):21-40. doi:10.1016/0022-2836(84)90428-5
764. Ohno M, Segref A, Bachi A, Wilm M, Mattaj JW. PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell.* 2000;101(2):187-198. doi:10.1016/S0092-8674(00)80829-6
765. Watkins NJ, Lemm I, Ingelfinger D, et al. Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Mol Cell.* 2004;16(5):789-798. doi:10.1016/j.molcel.2004.11.012
766. Will CL, Lüthmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(7):a003707.
767. Zhang X, Zhan X, Yan C, et al. Structures of the human spliceosomes before and after release of the ligated exon. *Cell Res.* 2019;29(4):274-285. doi:10.1038/s41422-019-0143-x
768. Carlile TM, Martinez NM, Schaening C, et al. mRNA structure determines modification by pseudouridine synthase 1. *Nat Chem Biol.* 2019;15(10):966-974. doi:10.1038/s41589-019-0353-z
769. Martinez NM, Su A, Burns MC, et al. Pseudouridine synthases modify human pre-mRNA co-transcriptionally and affect pre-mRNA processing. *Mol Cell.* 2022;82(3):645-659.e9. doi:10.1016/j.molcel.2021.12.023
770. Findeisen P, Mühlhausen S, Dempewolf S, et al. Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biol Evol.* 2014;6(9):2274-2288. doi:10.1093/gbe/evu187
771. Dean SO, Rogers SL, Stuurman N, Vale RD, Spudich JA. Distinct pathways control recruitment and maintenance of myosin II at the cleavage furrow during cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(38):13473-13478. doi:10.1073/pnas.0506810102
772. Tsuchida J, Nishina Y, Wakabayashi N, Nozaki M, Sakai Y, Nishimune Y. Molecular cloning and characterization of meichroacidin (male meiotic metaphase chromosome-associated acidic protein). *Dev Biol.* 1998;197(1):67-76. doi:10.1006/dbio.1998.8885
773. Gui M, Farley H, Anujan P, et al. De novo identification of mammalian ciliary motility proteins using cryo-EM. *Cell.* 2021;184(23):5791-5806.e19. doi:10.1016/j.cell.2021.10.007
774. Meyerson M, Harlow E. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol.* 1994;14(3):2077-2086. doi:10.1128/mcb.14.3.2077-2086.1994

775. Wang Z, Xie Y, Zhang L, et al. Migratory localization of cyclin D2-Cdk4 complex suggests a spatial regulation of the G1-S transition. *Cell Struct Funct.* 2008;33(2):171-183. doi:10.1247/csf.08019
776. Kostyak JC, Naik MU, Naik UP. Calcium- and integrin-binding protein 1 regulates megakaryocyte ploidy, adhesion, and migration. *Blood.* 2012;119(3):838-846. doi:10.1182/blood-2011-04-346098
777. Kostyak JC, Naik UP. Calcium- and integrin-binding protein 1 regulates endomitosis and its interaction with Polo-like kinase 3 is enhanced in endomitotic Dami cells. *PLoS One.* 2011;6(1):e14513. doi:10.1371/journal.pone.0014513
778. Yuan W, Leisner TM, McFadden AW, et al. CIB1 is essential for mouse spermatogenesis. *Mol Cell Biol.* 2006;26(22):8507-8514. doi:10.1128/MCB.01488-06
779. Sudo H, Maru Y. LAPSER1 is a putative cytokinetic tumor suppressor that shows the same centrosome and midbody subcellular localization pattern as p80 katanin. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2007;21(9):2086-2100. doi:10.1096/fj.06-7254com
780. Sudo H, Maru Y. LAPSER1/LZTS2: a pluripotent tumor suppressor linked to the inhibition of katanin-mediated microtubule severing. *Hum Mol Genet.* 2008;17(16):2524-2540. doi:10.1093/hmg/ddn153
781. DeLuca JG, Dong Y, Hergert P, et al. Hec1 and nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites. *Mol Biol Cell.* 2005;16(2):519-531. doi:10.1091/mbc.e04-09-0852
782. Zhao G, Cheng Y, Gui P, et al. Dynamic acetylation of the kinetochore-associated protein HEC1 ensures accurate microtubule-kinetochore attachment. *J Biol Chem.* 2019;294(2):576-592. doi:10.1074/jbc.RA118.003844
783. Bharadwaj R, Qi W, Yu H. Identification of two novel components of the human NDC80 kinetochore complex. *J Biol Chem.* 2004;279(13):13076-13085. doi:10.1074/jbc.M310224200
784. Jacobs HW, Knoblich JA, Lehner CF. Drosophila Cyclin B3 is required for female fertility and is dispensable for mitosis like Cyclin B. *Genes Dev.* 1998;12(23):3741-3751. doi:10.1101/gad.12.23.3741
785. Echard A, O'Farrell PH. The degradation of two mitotic cyclins contributes to the timing of cytokinesis. *Curr Biol.* 2003;13(5):373-383. doi:10.1016/s0960-9822(03)00127-1
786. do Carmo Avides M, Glover DM. Abnormal spindle protein, Asp, and the integrity of mitotic centrosomal microtubule organizing centers. *Science.* 1999;283(5408):1733-1735. doi:10.1126/science.283.5408.1733
787. Neef R, Preisinger C, Sutcliffe J, et al. Phosphorylation of mitotic kinesin-like protein 2 by polo-like kinase 1 is required for cytokinesis. *J Cell Biol.* 2003;162(5):863-875. doi:10.1083/jcb.200306009
788. DeLuca JG, Moree B, Hickey JM, Kilmartin J V, Salmon ED. hNuf2 inhibition blocks stable kinetochore-microtubule attachment and induces mitotic cell death in HeLa cells. *J Cell Biol.* 2002;159(4):549-555. doi:10.1083/jcb.200208159
789. DeLuca JG, Howell BJ, Canman JC, Hickey JM, Fang G, Salmon ED. Nuf2 and Hec1 are required for retention of the checkpoint proteins Mad1 and Mad2 to kinetochores. *Curr Biol.* 2003;13(23):2103-2109. doi:10.1016/j.cub.2003.10.056
790. Raemaekers T, Ribbeck K, Beaudouin J, et al. NuSAP, a novel microtubule-associated protein involved in mitotic spindle organization. *J Cell Biol.* 2003;162(6):1017-1029. doi:10.1083/jcb.200302129
791. Weaver BAA, Bonday ZQ, Putkey FR, Kops GJPL, Silk AD, Cleveland DW. Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J Cell Biol.* 2003;162(4):551-563. doi:10.1083/jcb.200303167
792. Bancroft J, Auckland P, Samora CP, McAinsh AD. Chromosome congression is promoted by CENP-Q- and CENP-E-dependent pathways. *J Cell Sci.* 2015;128(1):171-184. doi:10.1242/jcs.163659
793. Putkey FR, Cramer T, Morphew MK, et al. Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev Cell.* 2002;3(3):351-365. doi:10.1016/s1534-5807(02)00255-1
794. Carvalhal S, Ribeiro SA, Arocena M, et al. The nucleoporin ALADIN regulates Aurora A localization to ensure robust mitotic spindle formation. *Mol Biol Cell.* 2015;26(19):3424-3438. doi:10.1091/mbc.E15-02-0113

795. Marumoto T, Honda S, Hara T, et al. Aurora-A kinase maintains the fidelity of early and late mitotic events in HeLa cells. *J Biol Chem*. 2003;278(51):51786-51795. doi:10.1074/jbc.M306275200
796. Sankaran S, Crone DE, Palazzo RE, Parvin JD. Aurora-A kinase regulates breast cancer associated gene 1 inhibition of centrosome-dependent microtubule nucleation. *Cancer Res*. 2007;67(23):11186-11194. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2578
797. Dutertre S, Cazales M, Quaranta M, et al. Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2-M transition. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 12):2523-2531. doi:10.1242/jcs.01108
798. Fichelson P, Ghosh M. Mother-daughter precursor cell fate transformation after Cdc2 down-regulation in the Drosophila bristle lineage. *Dev Biol*. 2004;276(2):367-377. doi:10.1016/j.ydbio.2004.08.043
799. Seller CA, O'Farrell PH. Rif1 prolongs the embryonic S phase at the Drosophila mid-blastula transition. *PLoS Biol*. 2018;16(5):e2005687. doi:10.1371/journal.pbio.2005687
800. Jimenez J, Alphey L, Nurse P, Glover DM. Complementation of fission yeast cdc2ts and cdc25ts mutants identifies two cell cycle genes from Drosophila: a cdc2 homologue and string. *EMBO J*. 1990;9(11):3565-3571. doi:10.1002/j.1460-2075.1990.tb07567.x
801. Reber A, Lehner CF, Jacobs HW. Terminal mitoses require negative regulation of Fzr/Cdh1 by Cyclin A, preventing premature degradation of mitotic cyclins and String/Cdc25. *Development*. 2006;133(16):3201-3211. doi:10.1242/dev.02488
802. Jacobs HW, Keidel E, Lehner CF. A complex degradation signal in Cyclin A required for G1 arrest, and a C-terminal region for mitosis. *EMBO J*. 2001;20(10):2376-2386. doi:10.1093/emboj/20.10.2376
803. Zhu C, Jiang W. Cell cycle-dependent translocation of PRC1 on the spindle by Kif4 is essential for midzone formation and cytokinesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(2):343-348. doi:10.1073/pnas.0408438102
804. Ben-Shimon L, Paul VD, David-Kadoch G, et al. Fe-S cluster coordination of the chromokinesin KIF4A alters its subcellular localization during mitosis. *J Cell Sci*. 2018;131(12). doi:10.1242/jcs.211433
805. Mann BJ, Balchand SK, Wadsworth P. Regulation of Kif15 localization and motility by the C-terminus of TPX2 and microtubule dynamics. *Mol Biol Cell*. 2017;28(1):65-75. doi:10.1091/mbc.E16-06-0476
806. Kurasawa Y, Earnshaw WC, Mochizuki Y, Dohmae N, Todokoro K. Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *EMBO J*. 2004;23(16):3237-3248. doi:10.1038/sj.emboj.7600347
807. Mollinari C, Kleman J-P, Jiang W, Schoehn G, Hunter T, Margolis RL. PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol*. 2002;157(7):1175-1186. doi:10.1083/jcb.200111052
808. Seki A, Fang G. CKAP2 is a spindle-associated protein degraded by APC/C-Cdh1 during mitotic exit. *J Biol Chem*. 2007;282(20):15103-15113. doi:10.1074/jbc.M701688200
809. Llamazares S, Moreira A, Tavares A, et al. polo encodes a protein kinase homolog required for mitosis in Drosophila. *Genes Dev*. 1991;5(12A):2153-2165. doi:10.1101/gad.5.12a.2153
810. Savoian MS, Glover DM. Differing requirements for Augmin in male meiotic and mitotic spindle formation in Drosophila. *Open Biol*. 2014;4(5):140047. doi:10.1098/rsob.140047
811. Mamidipudi V, Zhang J, Lee KC, Cartwright CA. RACK1 regulates G1/S progression by suppressing Src kinase activity. *Mol Cell Biol*. 2004;24(15):6788-6798. doi:10.1128/MCB.24.15.6788-6798.2004
812. Keller LC, Geimer S, Romijn E, Yates J 3rd, Zamora I, Marshall WF. Molecular architecture of the centriole proteome: the conserved WD40 domain protein POC1 is required for centriole duplication and length control. *Mol Biol Cell*. 2009;20(4):1150-1166. doi:10.1091/mbc.e08-06-0619
813. Venoux M, Tait X, Hames RS, Straatman KR, Woodland HR, Fry AM. Poc1A and Poc1B act together in human cells to ensure centriole integrity. *J Cell Sci*. 2013;126(Pt 1):163-175. doi:10.1242/jcs.111203
814. Petrovic A, Mosalaganti S, Keller J, et al. Modular assembly of RWD domains on the Mis12 complex underlies

- outer kinetochore organization. *Mol Cell*. 2014;53(4):591-605. doi:10.1016/j.molcel.2014.01.019
815. Hsu J-M, Lee Y-CG, Yu C-TR, Huang C-YF. Fbx7 functions in the SCF complex regulating Cdk1-cyclin B-phosphorylated hepatoma up-regulated protein (HURP) proteolysis by a proline-rich region. *J Biol Chem*. 2004;279(31):32592-32602. doi:10.1074/jbc.M404950200
816. Tsou A-P, Yang C-W, Huang C-YF, et al. Identification of a novel cell cycle regulated gene, HURP, overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2003;22(2):298-307. doi:10.1038/sj.onc.1206129
817. Walker DL, Wang D, Jin Y, et al. Skeletor, a novel chromosomal protein that redistributes during mitosis provides evidence for the formation of a spindle matrix. *J Cell Biol*. 2000;151(7):1401-1412. doi:10.1083/jcb.151.7.1401
818. Lawo S, Bashkurov M, Mullin M, et al. HAUS, the 8-subunit human Augmin complex, regulates centrosome and spindle integrity. *Curr Biol*. 2009;19(10):816-826. doi:10.1016/j.cub.2009.04.033
819. Uehara R, Nozawa R, Tomioka A, et al. The augmin complex plays a critical role in spindle microtubule generation for mitotic progression and cytokinesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(17):6998-7003. doi:10.1073/pnas.0901587106
820. Elliott S, Knop M, Schlenstedt G, Schiebel E. Spc29p is a component of the Spc110p subcomplex and is essential for spindle pole body duplication. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96(11):6205-6210. doi:10.1073/pnas.96.11.6205
821. Durgan J, Kaji N, Jin D, Hall A. Par6B and atypical PKC regulate mitotic spindle orientation during epithelial morphogenesis. *J Biol Chem*. 2011;286(14):12461-12474. doi:10.1074/jbc.M110.174235
822. Nance J. PAR proteins and the establishment of cell polarity during *C. elegans* development. *Bioessays*. 2005;27(2):126-135. doi:10.1002/bies.20175
823. Morisseau C, Hammock BD. Gerry Brooks and epoxide hydrolases: four decades to a pharmaceutical. *Pest Manag Sci Former Pestic Sci*. 2008;64(6):594-609.
824. Endo S, Miyagi N, Matsunaga T, Hara A, Ikari A. Human dehydrogenase/reductase (SDR family) member 11 is a novel type of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;472(1):231-236. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.01.190
825. Li X. Glutathione and Glutathione-S-Transferase in Detoxification Mechanisms. In: *General, Applied and Systems Toxicology*. ; 2009. doi:https://doi.org/10.1002/9780470744307.gat166
826. Kurahashi T, Kwon M, Homma T, et al. Reductive detoxification of acrolein as a potential role for aldehyde reductase (AKR1A) in mammals. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;452(1):136-141. doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.072
827. Takahashi M, Fujii J, Teshima T, Suzuki K, Shiba T, Taniguchi N. Identity of a major 3-deoxyglucosone-reducing enzyme with aldehyde reductase in rat liver established by amino acid sequencing and cDNA expression. *Gene*. 1993;127(2):249-253. doi:10.1016/0378-1119(93)90728-1
828. Lai L, Xu Z, Zhou J, Lee K-D, Amidon GL. Molecular basis of prodrug activation by human valacyclovirase, an alpha-amino acid ester hydrolase. *J Biol Chem*. 2008;283(14):9318-9327. doi:10.1074/jbc.M709530200
829. Rowland A, Miners JO, Mackenzie PI. The UDP-glucuronosyltransferases: Their role in drug metabolism and detoxification. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013;45(6):1121-1132. doi:https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.02.019
830. Green MD, Clarke DJ, Oтуру EM, et al. Cloning and expression of a rat liver phenobarbital-inducible UDP-glucuronosyltransferase (2B12) with specificity for monoterpenoid alcohols. *Arch Biochem Biophys*. 1995;322(2):460-468. doi:10.1006/abbi.1995.1489
831. Motojima K, Kanaya S, Goto S. Cloning and sequence analysis of cDNA for rat liver uricase. *J Biol Chem*. 1988;263(32):16677-16681. doi:https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)37443-X
832. Horsten Burmester T. Evolution and function of the insect hexamerins\*. *Eur J Entomol*. 1999;96(3):213-225. https://www.eje.cz/pdfs/eje/1999/03/01.pdf
833. Martins JR, Nunes FMF, Cristino AS, Simões ZLP, Bitondi MMG. The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. *BMC*

- Mol Biol.* 2010;11(1):23. doi:10.1186/1471-2199-11-23
834. Wu CH, Lee MF, Liao SC, Luo SF. Sequencing analysis of cDNA clones encoding the American cockroach Cr-PI allergens. Homology with insect hemolymph proteins. *J Biol Chem.* 1996;271(30):17937-17943. doi:10.1074/jbc.271.30.17937
835. Suzuki R, Fujimoto Z, Shiotsuki T, et al. Structural mechanism of JH delivery in hemolymph by JHBP of silkworm, *bombyx mori*. *Sci Rep.* 2011;1:1-9. doi:10.1038/srep00133
836. Moreau R, Gourdoux L, Girardie J. Neuropearsin: A new energetic neurohormone in the African locust. *Arch Insect Biochem Physiol.* 1988;8(2):135-145. doi:https://doi.org/10.1002/arch.940080207
837. Fournier B, Dubar M. Relationship between neuropearsin-induced rectal fluid reabsorption and cyclic nucleotides in the migratory locust. *Comp Biochem Physiol Part A Physiol.* 1989;94(2):249-255. doi:https://doi.org/10.1016/0300-9629(89)90543-4
838. Girardie J, Boureme D, Couillaud F, Tamarelle M, Girardie A. Anti-juvenile effect of neuropearsin A, a neuroprotein isolated from locust corpora cardiaca. *Insect Biochem.* 1987;17(7):977-983. doi:https://doi.org/10.1016/0020-1790(87)90106-5
839. Claeys I, Breugelmans B, Simonet G, Franssens V, Van Soest S, Vanden Broeck J. Regulation of *Schistocerca gregaria* neuropearsin transcript levels by juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone. *Arch Insect Biochem Physiol.* 2006;62(3):107-115. doi:10.1002/arch.20127
840. Stay B, Tobe SS. The role of allatostatins in juvenile hormone synthesis in insects and crustaceans. *Annu Rev Entomol.* 2007;52:277-299. doi:10.1146/annurev.ento.51.110104.151050
841. Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, et al. A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet.* 1999;21(4):424-428. doi:10.1038/7766
842. McCoy MG, Sun G-S, Marchadier D, Maugeais C, Glick JM, Rader DJ. Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J Lipid Res.* 2002;43(6):921-929.
843. Klett EL, Chen S, Yechoor A, Lih FB, Coleman RA. Long-chain acyl-CoA synthetase isoforms differ in preferences for eicosanoid species and long-chain fatty acids. *J Lipid Res.* 2017;58(5):884-894. doi:10.1194/jlr.M072512
844. Klett EL, Chen S, Edin ML, et al. Diminished acyl-CoA synthetase isoform 4 activity in INS 832/13 cells reduces cellular epoxyeicosatrienoic acid levels and results in impaired glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem.* 2013;288(30):21618-21629. doi:10.1074/jbc.M113.481077
845. Ohkuni A, Ohno Y, Kihara A. Identification of acyl-CoA synthetases involved in the mammalian sphingosine 1-phosphate metabolic pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;442(3-4):195-201. doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.036
846. Ganformina MD, Do Carmo S, Lora JM, et al. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell.* 2008;7(4):506-515. doi:https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2008.00395.x
847. Bajo-Grañeras R, Sanchez D, Gutierrez G, et al. Apolipoprotein D alters the early transcriptional response to oxidative stress in the adult cerebellum. *J Neurochem.* 2011;117(6):949-960. doi:https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07266.x
848. Bhatia S, Jenner AM, Li H, et al. Increased Apolipoprotein D Dimer Formation in Alzheimer's Disease Hippocampus is Associated with Lipid Conjugated Diene Levels. *J Alzheimer's Dis.* 2013;35:475-486. doi:10.3233/JAD-122278
849. Collins AE, Saleh TM, Kalisch BE. Naturally occurring antioxidant therapy in Alzheimer's disease. *Antioxidants.* 2022;11(2):213.
850. Ruiz M, Ganformina MD, Correnti C, Strong RK, Sanchez D. Ligand binding-dependent functions of the lipocalin NLaz: an in vivo study in *Drosophila*. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2014;28(4):1555-1567.

- doi:10.1096/fj.13-240556
851. Ruiz M, Sanchez D, Canal I, Acebes A, Ganformina MD. Sex-dependent modulation of longevity by two *Drosophila* homologues of human Apolipoprotein D, GLaz and NLaz. *Exp Gerontol*. 2011;46(7):579-589.
852. Thomas EA, George RC, Sutcliffe JG. Apolipoprotein D modulates arachidonic acid signaling in cultured cells: implications for psychiatric disorders. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2003;69(6):421-427. doi:10.1016/j.plefa.2003.08.014
853. Do Carmo S, Jacomy H, Talbot PJ, Rassart E. Neuroprotective effect of apolipoprotein D against human coronavirus OC43-induced encephalitis in mice. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2008;28(41):10330-10338. doi:10.1523/JNEUROSCI.2644-08.2008
854. Raghavachari N. The Impact of Apolipoprotein E Genetic Variability in Health and Life Span. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020;75(10):1855-1857. doi:10.1093/gerona/glaa175
855. Thorpe C, Kim J-JP. Structure and mechanism of action of the Acyl-CoA dehydrogenases1. *FASEB J*. 1995;9(9):718-725. doi:https://doi.org/10.1096/fasebj.9.9.7601336
856. Fujimori H, Zhou YJ, Fukumura K, Matsumoto S, Tukamoto Y, Nagata S. Specific distribution of expression and enzymatic activity of cholesterol biosynthetic enzyme DHCR24 orthologs in the phytophagous insect. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2020;84(1):126-133. doi:10.1080/09168451.2019.1667221
857. Mack YSI, Dehari M, Morooka N, Nagata S. Identification and Characterization of 24-Dehydrocholesterol Reductase (DHCR24) in the Two-Spotted Cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Insects*. 2021;12(9). doi:10.3390/insects12090782
858. McConathy WJ, Alaupovic P. Studies on the isolation and partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D of human plasma. *Biochemistry*. 1976;15(3):515-520. doi:10.1021/bi00648a010
859. Smolenaars MMW, Kasperaitis MAM, Richardson PE, Rodenburg KW, Van der Horst DJ. Biosynthesis and secretion of insect lipoprotein: involvement of furin in cleavage of the apoB homolog, apolipoprotein-II/I. *J Lipid Res*. 2005;46(3):412-421. doi:10.1194/jlr.M400374-JLR200
860. Wilson C, Wardell MR, Weisgraber KH, Mahley RW, Agard DA. Three-dimensional structure of the LDL receptor-binding domain of human apolipoprotein E. *Science*. 1991;252(5014):1817-1822. doi:10.1126/science.2063194
861. Vaz FM, van Gool S, Ofman R, Ijlst L, Wanders RJ. Carnitine biosynthesis: identification of the cDNA encoding human gamma-butyrobetaine hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;250(2):506-510. doi:10.1006/bbrc.1998.9343
862. Vaz FM, Ofman R, Westinga K, Back JW, Wanders RJ. Molecular and Biochemical Characterization of Rat epsilon-N-Trimethyllysine Hydroxylase, the First Enzyme of Carnitine Biosynthesis. *J Biol Chem*. 2001;276(36):33512-33517. doi:10.1074/jbc.M105929200
863. Hänschke L, Heier C, Maya Palacios SJ, et al. *Drosophila* Lipase 3 Mediates the Metabolic Response to Starvation and Aging. *Front aging*. 2022;3:800153. doi:10.3389/fragi.2022.800153
864. Alfaro-Chávez AL, Liu JW, Porter JL, Goldman A, Ollis DL. Improving on nature's shortcomings: Evolving a lipase for increased lipolytic activity, expression and thermostability. *Protein Eng Des Sel*. 2019;32(1):13-24. doi:10.1093/PROTEIN/GZZ024
865. Watkins PA, Maignel D, Jia Z, Pevsner J. Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *J Lipid Res*. 2007;48(12):2736-2750. doi:10.1194/JLR.M700378-JLR200
866. Chen JW, Dodia C, Feinstein SI, Jain MK, Fisher AB. 1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities. *J Biol Chem*. 2000;275(37):28421-28427. doi:10.1074/jbc.M005073200
867. Fisher AB, Dodia C, Sorokina EM, et al. A novel lysophosphatidylcholine acyl transferase activity is expressed by peroxiredoxin 6. *J Lipid Res*. 2016;57(4):587-596. doi:10.1194/jlr.M064758

868. Walsh MT, Iqbal J, Josekutty J, et al. Novel Abetalipoproteinemia Missense Mutation Highlights the Importance of the N-Terminal  $\beta$ -Barrel in Microsomal Triglyceride Transfer Protein Function. *Circ Cardiovasc Genet*. 2015;8(5):677-687. doi:10.1161/CIRCGENETICS.115.001106
869. Rava P, Ojakian GK, Shelness GS, Hussain MM. Phospholipid transfer activity of microsomal triacylglycerol transfer protein is sufficient for the assembly and secretion of apolipoprotein B lipoproteins. *J Biol Chem*. 2006;281(16):11019-11027. doi:10.1074/jbc.M512823200
870. Rava P, Athar H, Johnson C, Hussain MM. Transfer of cholesteryl esters and phospholipids as well as net deposition by microsomal triglyceride transfer protein. *J Lipid Res*. 2005;46(8):1779-1785. doi:10.1194/jlr.D400043-JLR200
871. Parsons WH, Kolar MJ, Kamat SS, et al. AIG1 and ADTRP are atypical integral membrane hydrolases that degrade bioactive FAHFs. *Nat Chem Biol*. 2016;12(5):367-372. doi:10.1038/nchembio.2051
872. Miyazaki M, Jacobson MJ, Man WC, et al. Identification and characterization of murine SCD4, a novel heart-specific stearoyl-CoA desaturase isoform regulated by leptin and dietary factors. *J Biol Chem*. 2003;278(36):33904-33911. doi:10.1074/jbc.M304724200
873. Miyazaki M, Bruggink SM, Ntambi JM. Identification of mouse palmitoyl-coenzyme A Delta9-desaturase. *J Lipid Res*. 2006;47(4):700-704. doi:10.1194/jlr.C500025-JLR200
874. Murakami M, Kudo I. Phospholipase A2. *J Biochem*. 2002;131(3):285-292. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003101
875. Clark JD, Lin LL, Kriz RW, et al. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*. 1991;65(6):1043-1051. doi:10.1016/0092-8674(91)90556-e
876. Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, et al. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*. 2003;423(6941):762-769. doi:10.1038/nature01705
877. Nedvídková J, Smitka K, Kopský V, Hainer V. Adiponectin, an adipocyte-derived protein. *Physiol Res*. 2005;54(2):133-140.
878. Roussel A, Canaan S, Egloff MP, et al. Crystal structure of human gastric lipase and model of lysosomal acid lipase, two lipolytic enzymes of medical interest. *J Biol Chem*. 1999;274(24):16995-17002. doi:10.1074/jbc.274.24.16995
879. Guo Z-Y, Lin S, Heinen JA, Chang CCY, Chang T-Y. The active site His-460 of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1 resides in a hitherto undisclosed transmembrane domain. *J Biol Chem*. 2005;280(45):37814-37826. doi:10.1074/jbc.M508384200
880. Yang H, Cromley D, Wang H, Billheimer JT, Sturley SL. Functional expression of a cDNA to human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase in yeast. Species-dependent substrate specificity and inhibitor sensitivity. *J Biol Chem*. 1997;272(7):3980-3985. doi:10.1074/jbc.272.7.3980
881. Lowe ME, Kaplan MH, Jackson-Grusby L, D'Agostino D, Grusby MJ. Decreased neonatal dietary fat absorption and T cell cytotoxicity in pancreatic lipase-related protein 2-deficient mice. *J Biol Chem*. 1998;273(47):31215-31221. doi:10.1074/jbc.273.47.31215
882. Chávez VM, Marqués G, Delbecque JP, et al. The *Drosophila* disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development*. 2000;127(19):4115-4126. doi:10.1242/dev.127.19.4115
883. Warren JT, Petryk A, Marques G, et al. Molecular and biochemical characterization of two P450 enzymes in the ecdysteroidogenic pathway of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(17):11043-11048. doi:10.1073/pnas.162375799
884. Lou Y, Tian G-Y, Song Y, et al. Characterization of transcriptional modules related to fibrosing-NAFLD progression. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-12.

885. Mukherjee D, Gao M, O'Connor JP, et al. The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J*. 2002;21(1-2):165-174. doi:10.1093/emboj/21.1.165
886. van Dijk EL, Schilders G, Pruijn GJM. Human cell growth requires a functional cytoplasmic exosome, which is involved in various mRNA decay pathways. *RNA*. 2007;13(7):1027-1035. doi:10.1261/rna.575107
887. West S, Gromak N, Norbury CJ, Proudfoot NJ. Adenylation and exosome-mediated degradation of cotranscriptionally cleaved pre-messenger RNA in human cells. *Mol Cell*. 2006;21(3):437-443. doi:10.1016/j.molcel.2005.12.008
888. López DM, Kählau L, Jungnickel KEJ, Löw C, Damme M. Characterization of the complex of the lysosomal membrane transporter MFSD1 and its accessory subunit GLMP. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2020;34(11):14695-14709. doi:10.1096/fj.202000912RR
889. Wu SV, Harikumar KG, Burgess RJ, Reeve JRJ, Miller LJ. Effects of cholecystokinin-58 on type 1 cholecystokinin receptor function and regulation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295(3):G641-7. doi:10.1152/ajpgi.90390.2008
890. Ulrich CD, Ferber I, Holicky E, Hadac E, Buell G, Miller LJ. Molecular cloning and functional expression of the human gallbladder cholecystokinin A receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;193(1):204-211. doi:10.1006/bbrc.1993.1610
891. Griesbacher T, Rainer I, Heinemann A, Groisman D. Haemodynamic and exocrine effects of caerulein at submaximal and supramaximal levels on the rat pancreas: role of cholecystokinin receptor subtypes. *Pancreatol Off J Int Assoc Pancreatol. [et al]*. 2006;6(1-2):65-66. doi:10.1159/000090025
892. Reidelberger RD, Heimann D, Kelsey L, Hulce M. Effects of peripheral CCK receptor blockade on feeding responses to duodenal nutrient infusions in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003;284(2):R389-98. doi:10.1152/ajpregu.00529.2002
893. De Jonghe BC, Hajnal A, Covasa M. Decreased gastric mechanodetection, but preserved gastric emptying, in CCK-1 receptor-deficient OLETF rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291(4):G640-9. doi:10.1152/ajpgi.00109.2006
894. de Weerth A, von Schrenck T, Gronewold M, et al. Characterization of CCK receptors in stomach smooth muscle: evidence for two subtypes. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1327(2):213-221. doi:10.1016/s0005-2736(97)00060-6
895. Kiss B, Szlanka T, Zvara Á, et al. Selective elimination/RNAi silencing of FMRF-related peptides and their receptors decreases the locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Gen Comp Endocrinol*. 2013;191:137-145. doi:10.1016/j.ygcen.2013.05.023
896. Nässel DR, Williams MJ. Cholecystokinin-Like Peptide (DSK) in *Drosophila*, Not Only for Satiety Signaling. *Front Endocrinol*. 2014;5. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2014.00219>
897. Chen X, Ganetzky B. A neuropeptide signaling pathway regulates synaptic growth in *Drosophila*. *J Cell Biol*. 2012;196(4):529-543. doi:10.1083/jcb.201109044
898. Kim N, Stiegler AL, Cameron TO, et al. Lrp4 is a receptor for Agrin and forms a complex with MuSK. *Cell*. 2008;135(2):334-342. doi:10.1016/j.cell.2008.10.002
899. Mosca TJ, Luginbuhl DJ, Wang IE, Luo L. Presynaptic LRP4 promotes synapse number and function of excitatory CNS neurons. *Elife*. 2017;6. doi:10.7554/eLife.27347
900. Tamzin G, B. MM, S. CJ, C. SGP, C. FP. PigS and PigP Regulate Prodigiosin Biosynthesis in *Serratia* via Differential Control of Divergent Operons, Which Include Predicted Transporters of Sulfur-Containing Molecules. *J Bacteriol*. 2011;193(5):1076-1085. doi:10.1128/JB.00352-10
901. Sarro J, Andrews E, Sun L, et al. Requirement for commissureless2 function during dipteran insect nerve cord development. *Dev Dyn an Off Publ Am Assoc Anat*. 2013;242(12):1466-1477. doi:10.1002/dvdy.24059
902. Matsushima S, Shimizu A, Kondo M, et al. Anosmin-1 activates vascular endothelial growth factor receptor and its related signaling pathway for olfactory bulb angiogenesis. *Sci Rep*. 2020;10(1):188. doi:10.1038/s41598-019-



57040-3

903. Di Schiavi E, Vistoli G, Moretti RM, et al. Anosmin-1-Like Effect of UMODL1/Olfactorin on the Chemomigration of Mouse GnRH Neurons and Zebrafish Olfactory Axons Development. *Front cell Dev Biol.* 2022;10:836179. doi:10.3389/fcell.2022.836179
904. Tajiri R, Ogawa N, Fujiwara H, Kojima T. Mechanical Control of Whole Body Shape by a Single Cuticular Protein Obstructor-E in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet.* 2017;13(1):e1006548. doi:10.1371/journal.pgen.1006548
905. Lee W-H, Higuchi H, Ikeda S, et al. Mouse Tmem135 mutation reveals a mechanism involving mitochondrial dynamics that leads to age-dependent retinal pathologies. *Elife.* 2016;5. doi:10.7554/eLife.19264
906. Exil VJ, Silva Avila D, Benedetto A, et al. Stressed-induced TMEM135 protein is part of a conserved genetic network involved in fat storage and longevity regulation in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One.* 2010;5(12):e14228. doi:10.1371/journal.pone.0014228
907. Tamai I, Nezu J, Uchino H, et al. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273(1):251-260. doi:10.1006/bbrc.2000.2922
908. Leuthold S, Hagenbuch B, Mohebbi N, Wagner CA, Meier PJ, Stieger B. Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009;296(3):C570-82. doi:10.1152/ajpcell.00436.2008
909. Elshourbagy NA, Near JC, Kmetz PJ, et al. Cloning and expression of a human ATP-citrate lyase cDNA. *Eur J Biochem.* 1992;204(2):491-499. doi:https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb16659.x
910. Sun T, Hayakawa K, Bateman KS, Fraser ME. Identification of the citrate-binding site of human ATP-citrate lyase using X-ray crystallography. *J Biol Chem.* 2010;285(35):27418-27428. doi:10.1074/jbc.M109.078667
911. Lu JP, Wang Y, Sliter DA, Pearce MMP, Wojcikiewicz RJH. RNF170 protein, an endoplasmic reticulum membrane ubiquitin ligase, mediates inositol 1,4,5-trisphosphate receptor ubiquitination and degradation. *J Biol Chem.* 2011;286(27):24426-24433. doi:10.1074/jbc.M111.251983
912. Timmins JM, Ozcan L, Seimon TA, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J Clin Invest.* 2009;119(10):2925-2941. doi:10.1172/JCI38857
913. Subramanian M, Metya SK, Sadaf S, Kumar S, Schwudke D, Hasan G. Altered lipid homeostasis in *Drosophila* InsP3 receptor mutants leads to obesity and hyperphagia. *Dis Model Mech.* 2013;6(3):734-744. doi:10.1242/dmm.010017
914. Rajan A, Housden BE, Wirtz-Peitz F, Holderbaum L, Perrimon N. A Mechanism Coupling Systemic Energy Sensing to Adipokine Secretion. *Dev Cell.* 2017;43(1):83-98.e6. doi:10.1016/j.devcel.2017.09.007
915. Yamanaka N, Marqués G, O'Connor MB. Vesicle-Mediated Steroid Hormone Secretion in *Drosophila melanogaster*. *Cell.* 2015;163(4):907-919. doi:10.1016/j.cell.2015.10.022
916. Choi S, Quan X, Bang S, et al. Mitochondrial calcium uniporter in *Drosophila* transfers calcium between the endoplasmic reticulum and mitochondria in oxidative stress-induced cell death. *J Biol Chem.* 2017;292(35):14473-14485. doi:10.1074/jbc.M116.765578
917. Kanamori Y, Saito A, Hagiwara-Komoda Y, et al. The trehalose transporter 1 gene sequence is conserved in insects and encodes proteins with different kinetic properties involved in trehalose import into peripheral tissues. *Insect Biochem Mol Biol.* 2010;40(1):30-37. doi:10.1016/j.ibmb.2009.12.006
918. Menuz K, Larter NK, Park J, Carlson JR. An RNA-seq screen of the *Drosophila* antenna identifies a transporter necessary for ammonia detection. *PLoS Genet.* 2014;10(11):e1004810. doi:10.1371/journal.pgen.1004810
919. Fan X, Zhang H, Zhang S, et al. Identification of the gene encoding the enzyme deficient in mucopolysaccharidosis IIIC (Sanfilippo disease type C). *Am J Hum Genet.* 2006;79(4):738-744. doi:10.1086/508068

920. Ma T, Peng Y, Huang W, Liu Y, Ding J. The  $\beta$  and  $\gamma$  subunits play distinct functional roles in the  $\alpha(2)\beta\gamma$  heterotetramer of human NAD-dependent isocitrate dehydrogenase. *Sci Rep*. 2017;7:41882. doi:10.1038/srep41882
921. Kiiskinen L-L, Palonen H, Linder M, Viikari L, Kruus K. Laccase from *Melanocarpus albomyces* binds effectively to cellulose. *FEBS Lett*. 2004;576(1-2):251-255. doi:10.1016/j.febslet.2004.08.040
922. Shimabe M, Goyama S, Watanabe-Okochi N, et al. Pbx1 is a downstream target of Evi-1 in hematopoietic stem/progenitors and leukemic cells. *Oncogene*. 2009;28(49):4364-4374. doi:10.1038/onc.2009.288
923. Chakraborty S, Senyuk V, Sitailo S, Chi Y, Nucifora G. Interaction of EVI1 with cAMP-responsive element-binding protein-binding protein (CBP) and p300/CBP-associated factor (P/CAF) results in reversible acetylation of EVI1 and in co-localization in nuclear speckles. *J Biol Chem*. 2001;276(48):44936-44943. doi:10.1074/jbc.M106733200
924. Kurokawa M, Mitani K, Yamagata T, et al. The evi-1 oncoprotein inhibits c-Jun N-terminal kinase and prevents stress-induced cell death. *EMBO J*. 2000;19(12):2958-2968. doi:10.1093/emboj/19.12.2958
925. Liu Y, Chen L, Ko TC, Fields AP, Thompson EA. Evi1 is a survival factor which conveys resistance to both TGFbeta- and taxol-mediated cell death via PI3K/AKT. *Oncogene*. 2006;25(25):3565-3575. doi:10.1038/sj.onc.1209403
926. Deng T, Stempor P, Appert A, et al. The *Caenorhabditis elegans* homolog of the Evi1 proto-oncogene, egl-43, coordinates G1 cell cycle arrest with pro-invasive gene expression during anchor cell invasion. *PLoS Genet*. 2020;16(3):e1008470. doi:10.1371/journal.pgen.1008470
927. Vigneron S, Brioudes E, Burgess A, Labbé J-C, Lorca T, Castro A. Greatwall maintains mitosis through regulation of PP2A. *EMBO J*. 2009;28(18):2786-2793. doi:10.1038/emboj.2009.228
928. Burgess A, Vigneron S, Brioudes E, Labbé J-C, Lorca T, Castro A. Loss of human Greatwall results in G2 arrest and multiple mitotic defects due to deregulation of the cyclin B-Cdc2/PP2A balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(28):12564-12569. doi:10.1073/pnas.0914191107
929. Wang P, Galan JA, Normandin K, et al. Cell cycle regulation of Greatwall kinase nuclear localization facilitates mitotic progression. *J Cell Biol*. 2013;202(2):277-293. doi:10.1083/jcb.201211141
930. Majander A, Huoponen K, Savontaus ML, Nikoskelainen E, Wikström M. Electron transfer properties of NADH:ubiquinone reductase in the ND1/3460 and the ND4/11778 mutations of the Leber hereditary optic neuroretinopathy (LHON). *FEBS Lett*. 1991;292(1-2):289-292. doi:10.1016/0014-5793(91)80886-8
931. Figueiredo AC, de Sanctis D, Gutiérrez-Gallego R, et al. Unique thrombin inhibition mechanism by anophelin, an anticoagulant from the malaria vector. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109(52):E3649-E3658. doi:10.1073/pnas.1211614109
932. Negulescu H, Guo Y, Garner TP, et al. A Kazal-Type Serine Protease Inhibitor from the Defense Gland Secretion of the Subterranean Termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125376. doi:10.1371/journal.pone.0125376
933. Wolfstetter G, Dahlitz I, Pfeifer K, et al. Characterization of *Drosophila* Nidogen/entactin reveals roles in basement membrane stability, barrier function and nervous system patterning. *Development*. 2019;146(2). doi:10.1242/dev.168948
934. Chung AE, Durkin ME. Entactin: structure and function. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1990;3(4):275-282. doi:10.1165/ajrcmb/3.4.275
935. Woychik NA, Liao SM, Kolodziej PA, Young RA. Subunits shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Genes Dev*. 1990;4(3):313-323. doi:10.1101/gad.4.3.313
936. Izaurrealde E, Kutay U, von Kobbe C, Mattaj IW, Görlich D. The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J*. 1997;16(21):6535-6547. doi:10.1093/emboj/16.21.6535

937. Görlich D, Panté N, Kutay U, Aebi U, Bischoff FR. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J*. 1996;15(20):5584-5594.
938. Palacios I, Weis K, Klebe C, Mattaj IW, Dingwall C. RAN/TC4 mutants identify a common requirement for snRNP and protein import into the nucleus. *J Cell Biol*. 1996;133(3):485-494. doi:10.1083/jcb.133.3.485
939. Carazo-Salas RE, Guarguaglini G, Gruss OJ, Segref A, Karsenti E, Mattaj IW. Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature*. 1999;400(6740):178-181. doi:10.1038/22133
940. Bao X, Liu H, Liu X, et al. Mitosis-specific acetylation tunes Ran effector binding for chromosome segregation. *J Mol Cell Biol*. 2018;10(1):18-32. doi:10.1093/jmcb/mjx045
941. Trieselmann N, Wilde A. Ran localizes around the microtubule spindle in vivo during mitosis in Drosophila embryos. *Curr Biol*. 2002;12(13):1124-1129. doi:10.1016/s0960-9822(02)00934-x
942. Fyfe JC, Madsen M, Højrup P, et al. The functional cobalamin (vitamin B12)-intrinsic factor receptor is a novel complex of cubilin and amnionless. *Blood*. 2004;103(5):1573-1579. doi:10.1182/blood-2003-08-2852
943. Larsen C, Etzerodt A, Madsen M, Skjødt K, Moestrup SK, Andersen CBF. Structural assembly of the megadalton-sized receptor for intestinal vitamin B(12) uptake and kidney protein reabsorption. *Nat Commun*. 2018;9(1):5204. doi:10.1038/s41467-018-07468-4
944. Montgomery E, Sayer JA, Baines LA, et al. Novel compound heterozygous mutations in AMN cause Imerslund-Gräsbeck syndrome in two half-sisters: a case report. *BMC Med Genet*. 2015;16:35. doi:10.1186/s12881-015-0181-2
945. Hengst U, Albrecht H, Hess D, Monard D. The phosphatidylethanolamine-binding protein is the prototype of a novel family of serine protease inhibitors. *J Biol Chem*. 2001;276(1):535-540. doi:10.1074/jbc.M002524200
946. Rath O, Park S, Tang H, et al. The RKIP (Raf-1 Kinase Inhibitor Protein) conserved pocket binds to the phosphorylated N-region of Raf-1 and inhibits the Raf-1-mediated activated phosphorylation of MEK. *Cell Signal*. 2008;20(5):935-941. doi:10.1016/j.cellsig.2008.01.012
947. Cho WL, Raikhel AS. A novel function of 20-hydroxyecdysone: translational repression of the lysosomal protease mRNA in the mosquito fat body. *Insect Biochem Mol Biol*. 2001;31(4-5):283-288. doi:10.1016/s0965-1748(00)00175-2
948. Sala-Rabanal M, Li DC, Dake GR, et al. Polyamine transport by the polyspecific organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3. *Mol Pharm*. 2013;10(4):1450-1458. doi:10.1021/mp400024d
949. Chen L, Shu Y, Liang X, et al. OCT1 is a high-capacity thiamine transporter that regulates hepatic steatosis and is a target of metformin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(27):9983-9988. doi:10.1073/pnas.1314939111
950. Green RM, Lo K, Sterritt C, Beier DR. Cloning and functional expression of a mouse liver organic cation transporter. *Hepatology*. 1999;29(5):1556-1562. doi:10.1002/hep.510290530
951. Kim HI, Raffler J, Lu W, et al. Fine Mapping and Functional Analysis Reveal a Role of SLC22A1 in Acylcarnitine Transport. *Am J Hum Genet*. 2017;101(4):489-502. doi:10.1016/j.ajhg.2017.08.008
952. Jakobsson A, Westerberg R, Jakobsson A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res*. 2006;45(3):237-249. doi:https://doi.org/10.1016/j.plipres.2006.01.004
953. Kitazawa H, Miyamoto Y, Shimamura K, Nagumo A, Tokita S. Development of a High-Density Assay for Long-Chain Fatty Acyl-CoA Elongases. *Lipids*. 2009;44(8):765-773. doi:10.1007/s11745-009-3320-8
954. Vujcic S, Diegelman P, Bacchi CJ, Kramer DL, Porter CW. Identification and characterization of a novel flavin-containing spermine oxidase of mammalian cell origin. *Biochem J*. 2002;367(Pt 3):665-675. doi:10.1042/BJ20020720
955. Cervelli M, Bellini A, Bianchi M, et al. Mouse spermine oxidase gene splice variants. Nuclear subcellular localization of a novel active isoform. *Eur J Biochem*. 2004;271(4):760-770. doi:10.1111/j.1432-1033.2004.03979.x

956. Minois N. Molecular Basis of the ‘ Anti-Aging ’ Effect of Spermidine and Other Natural Polyamines – A Mini-Review. Published online 2014:319-326. doi:10.1159/000356748
957. Pegg AE. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*. 2009;61(9):880-894. doi:https://doi.org/10.1002/iub.230
958. Hofer SJ, Simon AK, Bergmann M, Eisenberg T, Kroemer G, Madeo F. Mechanisms of spermidine-induced autophagy and geroprotection. *Nat Aging*. 2022;2(12):1112-1129. doi:10.1038/s43587-022-00322-9
959. Lee C-Y, Su G-C, Huang W-Y, et al. Promotion of homology-directed DNA repair by polyamines. *Nat Commun*. 2019;10(1):65. doi:10.1038/s41467-018-08011-1
960. Rider JE, Hacker A, Mackintosh CA, Pegg AE, Woster PM, Casero RAJ. Spermine and spermidine mediate protection against oxidative damage caused by hydrogen peroxide. *Amino Acids*. 2007;33(2):231-240. doi:10.1007/s00726-007-0513-4
961. Hashemabadi M, Sasan H, Amandadi M, Esmailzadeh-Salestani K, Esmaeili-Mahani S, Ravan H. CRISPR/Cas9-Mediated Disruption of ZNF543 Gene: An Approach Toward Discovering Its Relation to TRIM28 Gene in Parkinson’s Disease. *Mol Biotechnol*. 2023;65(2):243-251. doi:10.1007/s12033-022-00494-0
962. Wang C, Ivanov A, Chen L, et al. MDM2 interaction with nuclear corepressor KAP1 contributes to p53 inactivation. *EMBO J*. 2005;24(18):3279-3290. doi:10.1038/sj.emboj.7600791
963. Wang C, Rauscher FJ 3rd, Cress WD, Chen J. Regulation of E2F1 function by the nuclear corepressor KAP1. *J Biol Chem*. 2007;282(41):29902-29909. doi:10.1074/jbc.M704757200
964. White DE, Negorev D, Peng H, Ivanov A V, Maul GG, Rauscher FJ 3rd. KAP1, a novel substrate for PIKK family members, colocalizes with numerous damage response factors at DNA lesions. *Cancer Res*. 2006;66(24):11594-11599. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4138
965. Roark M, Sturtevant MA, Emery J, Vaessin H, Grell E, Bier E. scratch, a pan-neural gene encoding a zinc finger protein related to snail, promotes neuronal development. *Genes Dev*. 1995;9(19):2384-2398. doi:10.1101/gad.9.19.2384
966. Nakakura EK, Watkins DN, Schuebel KE, et al. Mammalian Scratch: a neural-specific Snail family transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(7):4010-4015. doi:10.1073/pnas.051014098
967. Ohno CK, Ueda H, Petkovich M. The Drosophila nuclear receptors FTZ-F1 alpha and FTZ-F1 beta compete as monomers for binding to a site in the fushi tarazu gene. *Mol Cell Biol*. 1994;14(5):3166-3175. doi:10.1128/mcb.14.5.3166-3175.1994
968. Hou HY, Heffer A, Anderson WR, Liu J, Bowler T, Pick L. Stripy Ftz target genes are coordinately regulated by Ftz-F1. *Dev Biol*. 2009;335(2):442-453. doi:10.1016/j.ydbio.2009.08.004
969. Löhr U, Pick L. Cofactor-interaction motifs and the cooption of a homeotic Hox protein into the segmentation pathway of Drosophila melanogaster. *Curr Biol*. 2005;15(7):643-649. doi:10.1016/j.cub.2005.02.048
970. Damen WGM. fushi tarazu: a Hox gene changes its role. *Bioessays*. 2002;24(11):992-995. doi:10.1002/bies.10180
971. Moore LA, Broihier HT, Van Doren M, Lunsford LB, Lehmann R. Identification of genes controlling germ cell migration and embryonic gonad formation in Drosophila. *Development*. 1998;125(4):667-678. doi:10.1242/dev.125.4.667
972. Nakamura S, Yoshimori T. Autophagy and Longevity. *Mol Cells*. 2018;41(1):65-72. doi:10.14348/molcells.2018.2333
973. Wilson N, Kataura T, Korsgen ME, Sun C, Sarkar S, Korolchuk VI. The autophagy-NAD axis in longevity and disease. *Trends Cell Biol*. Published online April 2, 2023. doi:10.1016/j.tcb.2023.02.004
974. Chen G, Kroemer G, Kepp O. Mitophagy: An Emerging Role in Aging and Age-Associated Diseases. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:200. doi:10.3389/fcell.2020.00200
975. Guo J, Chiang W-C. Mitophagy in aging and longevity. *IUBMB Life*. 2022;74(4):296-316. doi:10.1002/iub.2585
976. Aggarwal S, Mannam P, Zhang J. Differential regulation of autophagy and mitophagy in pulmonary diseases. *Am J*

- Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;311(2):L433-52. doi:10.1152/ajplung.00128.2016
977. Bjedov I, Cochemé HM, Foley A, et al. Fine-tuning autophagy maximises lifespan and is associated with changes in mitochondrial gene expression in *Drosophila*. *PLoS Genet*. 2020;16(11):e1009083. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009083>
978. Argüelles S, Guerrero-Castilla A, Cano M, Muñoz MF, Ayala A. Advantages and disadvantages of apoptosis in the aging process. *Ann N Y Acad Sci*. 2019;1443(1):20-33. doi:10.1111/nyas.14020
979. Stefania Fulle, Lucia Centurione, Rosa Mancinelli, Silvia Sancilio, Francesco Antonio Manzoli, Roberta Di Pietro. Stem Cell Ageing and Apoptosis. *Curr Pharm Des*. 2012;18(13):1694-1717. doi:10.2174/138161212799859657
980. Tower J. Programmed cell death in aging. *Ageing Res Rev*. 2015;23(Pt A):90-100. doi:10.1016/j.arr.2015.04.002
981. Lu B, Chen H-D, Hong-Guang H-G. The relationship between apoptosis and aging. *Adv Biosci Biotechnol*. 2012;03:705-711. doi:10.4236/abb.2012.326091
982. Salminen A, Ojala J, Kaarniranta K. Apoptosis and aging: Increased resistance to apoptosis enhances the aging process. *Cell Mol Life Sci*. 2011;68(6):1021-1031. doi:10.1007/s00018-010-0597-y
983. Leidal AM, Levine B, Debnath J. Autophagy and the cell biology of age-related disease. *Nat Cell Biol*. 2018;20(12):1338-1348.
984. Hornsby PJ. Senescence and life span. *Pflugers Arch*. 2010;459(2):291-299. doi:10.1007/s00424-009-0723-6
985. Muller M. Cellular senescence: molecular mechanisms, in vivo significance, and redox considerations. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11(1):59-98. doi:10.1089/ars.2008.2104
986. Kirkland JL, Tchkonina T. Clinical strategies and animal models for developing senolytic agents. *Exp Gerontol*. 2015;68:19-25. doi:10.1016/j.exger.2014.10.012
987. Wang E. Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Res*. 1995;55(11):2284-2292.
988. Jejurikar SS, Henkelman EA, Cederna PS, Marcelo CL, Urbanek MG, Kuzon WM. Aging increases the susceptibility of skeletal muscle derived satellite cells to apoptosis. *Exp Gerontol*. 2006;41(9):828-836. doi:<https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.06.053>
989. Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, Leeuwenburgh C. The Role of Apoptosis in the Normal Aging Brain, Skeletal Muscle, and Heart. *Ann N Y Acad Sci*. 2002;959(1):93-107. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb02086.x>
990. Soo KY, Atkin JD, Farg M, Walker AK, Horne MK, Nagley P. Bim Links ER Stress and Apoptosis in Cells Expressing Mutant SOD1 Associated with Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One*. 2012;7(4):e35413. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035413>
991. Bredesen DE, Rao R V, Mehlen P. Cell death in the nervous system. *Nature*. 2006;443(7113):796-802. doi:10.1038/nature05293
992. Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, et al. Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am J Physiol*. 1996;271(3 Pt 2):H1215-28. doi:10.1152/ajpheart.1996.271.3.H1215
993. Kidera H, Hatabu T, Takahashi KH. Apoptosis inhibition mitigates aging effects in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*. 2020;148(2):69-76. doi:10.1007/s10709-020-00088-1
994. Wilson A, Shehadeh LA, Yu H, Webster KA. Age-related molecular genetic changes of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Genomics*. 2010;11:229. doi:10.1186/1471-2164-11-229
995. Feng Z, Hu W, Teresky AK, Hernando E, Cordon-Cardo C, Levine AJ. Declining p53 function in the aging process: a possible mechanism for the increased tumor incidence in older populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(42):16633-16638. doi:10.1073/pnas.0708043104
996. Alt EU, Senst C, Murthy SN, et al. Aging alters tissue resident mesenchymal stem cell properties. *Stem Cell Res*. 2012;8(2):215-225. doi:10.1016/j.scr.2011.11.002
997. Hernández Borrero LJ, El-Deiry WS. Tumor suppressor p53: Biology, signaling pathways, and therapeutic

- targeting. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2021;1876(1):188556.  
doi:<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188556>
998. Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G. Senescence and aging: The critical roles of p53. *Oncogene*. 2013;32(43):5129-5143. doi:10.1038/onc.2012.640
999. Dai C, Gu W. p53 post-translational modification: deregulated in tumorigenesis. *Trends Mol Med*. 2010;16(11):528-536. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2010.09.002>
1000. Ingaramo MC, Sánchez JA, Dekanty A. Regulation and function of p53: A perspective from *Drosophila* studies. *Mech Dev*. 2018;154:82-90. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mod.2018.05.007>
1001. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. 1997;387(6630):296-299. doi:10.1038/387296a0
1002. Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J*. 1993;12(2):461-468. doi:10.1002/j.1460-2075.1993.tb05678.x
1003. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, et al. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*. 2002;415(6867):45-53. doi:10.1038/415045a
1004. Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. *Genes Cancer*. 2011;2(4):466-474. doi:10.1177/1947601911408889
1005. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990;250(4985):1233-1238. doi:10.1126/science.1978757
1006. Puzio-Kuter AM, Levine AJ. Stem cell biology meets p53. *Nat Biotechnol*. 2009;27(10):914-915. doi:10.1038/nbt1009-914
1007. Zhao T, Xu Y. p53 and stem cells: new developments and new concerns. *Trends Cell Biol*. 2010;20(3):170-175. doi:10.1016/j.tcb.2009.12.004
1008. Aranda-Anzaldo A, Dent MAR. Reassessing the role of p53 in cancer and ageing from an evolutionary perspective. *Mech Ageing Dev*. 2007;128(4):293-302. doi:10.1016/j.mad.2007.01.001
1009. Campisi J. Cancer and ageing: rival demons? *Nat Rev Cancer*. 2003;3(5):339-349. doi:10.1038/nrc1073
1010. Kang H-J, Feng Z, Sun Y, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway regulate fertility in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(24):9761-9766. doi:10.1073/pnas.0904280106
1011. Sharpless NE, DePinho RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest*. 2004;113(2):160-168. doi:10.1172/JCI20761
1012. Arum O, Johnson TE. Reduced Expression of the *Caenorhabditis elegans* p53 Ortholog cep-1 Results in Increased Longevity. *Journals Gerontol Ser A*. 2007;62(9):951-959. doi:10.1093/gerona/62.9.951
1013. Waskar M, Landis GN, Shen J, et al. *Drosophila melanogaster* p53 has developmental stage-specific and sex-specific effects on adult life span indicative of sexual antagonistic pleiotropy. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(11):903-936. doi:10.18632/aging.100099
1014. Kobayashi Y, Furukawa-Hibi Y, Chen C, et al. SIRT1 is critical regulator of FOXO-mediated transcription in response to oxidative stress. *Int J Mol Med*. 2005;16(2):237-243.
1015. Bauer JH, Chang C, Morris SNS, et al. Expression of dominant-negative Dmp53 in the adult fly brain inhibits insulin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(33):13355-13360. doi:10.1073/pnas.0706121104
1016. Bauer JH, Morris SNS, Chang C, Flatt T, Wood JG, Helfand SL. dSir2 and Dmp53 interact to mediate aspects of CR-dependent lifespan extension in *D. melanogaster*. *Aging (Albany NY)*. 2009;1(1):38-48. doi:10.18632/aging.100001
1017. McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene*. 2007;26(22):3113-3121. doi:10.1038/sj.onc.1210394
1018. Shaul YD, Seger R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773(8):1213-1226. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.10.005

1019. Zhang W, Thompson BJ, Hietakangas V, Cohen SM. MAPK/ERK signaling regulates insulin sensitivity to control glucose metabolism in *Drosophila*. *PLoS Genet*. 2011;7(12):e1002429. doi:10.1371/journal.pgen.1002429
1020. Yue J, López JM. Understanding MAPK Signaling Pathways in Apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2020;21(7). doi:10.3390/ijms21072346
1021. Slack C, Alic N, Foley A, Cabecinha M, Hoddinott MP, Partridge L. The Ras-Erk-ETS-Signaling Pathway Is a Drug Target for Longevity. *Cell*. 2015;162(1):72-83. doi:10.1016/j.cell.2015.06.023
1022. Fabrizio P, Liou L-L, Moy VN, et al. SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics*. 2003;163(1):35-46. doi:10.1093/genetics/163.1.35
1023. Fernández-Medarde A, Santos E. The RasGrf family of mammalian guanine nucleotide exchange factors. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1815(2):170-188. doi:10.1016/j.bbcan.2010.11.001
1024. Okuyama T, Inoue H, Ookuma S, et al. The ERK-MAPK Pathway Regulates Longevity through SKN-1 and Insulin-like Signaling in *Caenorhabditis elegans*\*. *J Biol Chem*. 2010;285(39):30274-30281. doi:https://doi.org/10.1074/jbc.M110.146274
1025. Sundaramurthy P, Gakkhar S. Dynamic modeling and simulation of JNK and P38 kinase cascades with feedbacks and crosstalks. *IEEE Trans Nanobioscience*. 2010;9(4):225-231. doi:10.1109/TNB.2010.2061863
1026. Karin M, Gallagher E. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life*. 2005;57(4-5):283-295. doi:10.1080/15216540500097111
1027. Weston CR, Davis RJ. The JNK signal transduction pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(2):142-149. doi:10.1016/J.CEB.2007.02.001
1028. Rincón M, Davis RJ. Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunol Rev*. 2009;228(1):212-224. doi:10.1111/J.1600-065X.2008.00744.X
1029. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 2001;81(2):807-869. doi:10.1152/PHYSREV.2001.81.2.807
1030. Fuchs SY, Adler V, Pincus MR, Ronai Z. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(18):10541-10546. doi:10.1073/pnas.95.18.10541
1031. Wolf ER, McAtarsney CP, Bredhold KE, Kline AM, Mayo LD. Mutant and wild-type p53 form complexes with p73 upon phosphorylation by the kinase JNK. *Sci Signal*. 2018;11(524). doi:10.1126/scisignal.aao4170
1032. Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, et al. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J*. 2004;23(8):1889-1899. doi:10.1038/sj.emboj.7600194
1033. Donovan N, Becker EBE, Konishi Y, Bonni A. JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery. *J Biol Chem*. 2002;277(43):40944-40949. doi:10.1074/jbc.M206113200
1034. Kim B-J, Ryu S-W, Song B-J. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem*. 2006;281(30):21256-21265. doi:10.1074/jbc.M510644200
1035. Farley N, Pedraza-Alva G, Serrano-Gomez D, et al. p38 mitogen-activated protein kinase mediates the Fas-induced mitochondrial death pathway in CD8+ T cells. *Mol Cell Biol*. 2006;26(6):2118-2129. doi:10.1128/MCB.26.6.2118-2129.2006
1036. Srivastava RK, Mi QS, Hardwick JM, Longo DL. Deletion of the loop region of Bcl-2 completely blocks paclitaxel-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(7):3775-3780. doi:10.1073/pnas.96.7.3775
1037. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol*. 1999;19(12):8469-8478. doi:10.1128/MCB.19.12.8469
1038. Inoshita S, Takeda K, Hatai T, et al. Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem*. 2002;277(46):43730-43734. doi:10.1074/jbc.M207951200

1039. Marudhupandiyam S, Balamurugan K. Intrinsic JNK-MAPK pathway involvement requires daf-16-mediated immune response during *Shigella flexneri* infection in *C. elegans*. *Immunol Res.* 2017;65(3):609-621. doi:10.1007/s12026-016-8879-6
1040. Oh SW, Mukhopadhyay A, Svrzikapa N, Jiang F, Davis RJ, Tissenbaum HA. JNK regulates lifespan in *Caenorhabditis elegans* by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(12):4494-4499. doi:10.1073/pnas.0500749102
1041. Essers MAG, Weijzen S, de Vries-Smits AMM, et al. FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J.* 2004;23(24):4802-4812. doi:10.1038/sj.emboj.7600476
1042. Moriyama M, Moriyama H, Uda J, et al. BNIP3 upregulation via stimulation of ERK and JNK activity is required for the protection of keratinocytes from UVB-induced apoptosis. *Cell Death Dis.* 2017;8(2):e2576. doi:10.1038/cddis.2017.4
1043. Brown M, Strudwick N, Suwara M, et al. An initial phase of JNK activation inhibits cell death early in the endoplasmic reticulum stress response. *J Cell Sci.* 2016;129(12):2317-2328. doi:10.1242/jcs.179127
1044. Feng X, Liu H, Zhang Z, Gu Y, Qiu H, He Z. Annexin A2 contributes to cisplatin resistance by activation of JNK-p53 pathway in non-small cell lung cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2017;36(1):123. doi:10.1186/s13046-017-0594-1
1045. Shao Q, Han F, Peng S, He B. Nur77 inhibits oxLDL induced apoptosis of macrophages via the p38 MAPK signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;471(4):633-638. doi:10.1016/j.bbrc.2016.01.004
1046. Tran TH, Andrecka P, Rodrigues CO, Webster KA, Bishopric NH. Jun kinase delays caspase-9 activation by interaction with the apoptosome. *J Biol Chem.* 2007;282(28):20340-20350. doi:10.1074/jbc.M702210200
1047. Ryan SM. The Role of p38 MAPK in Protein Homeostasis and Aging. Published online 2016. <https://digitalcommons.du.edu/etd/1179>
1048. Wu Z, Isik M, Moroz N, Steinbaugh MJ, Zhang P, Blackwell TK. Dietary Restriction Extends Lifespan through Metabolic Regulation of Innate Immunity. *Cell Metab.* 2019;29(5):1192-1205.e8. doi:10.1016/j.cmet.2019.02.013
1049. Liberati NT, Fitzgerald KA, Kim DH, Feinbaum R, Golenbock DT, Ausubel FM. Requirement for a conserved Toll/interleukin-1 resistance domain protein in the *Caenorhabditis elegans* immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(17):6593-6598. doi:10.1073/pnas.0308625101
1050. Pujol N, Cypowyj S, Ziegler K, et al. Distinct innate immune responses to infection and wounding in the *C. elegans* epidermis. *Curr Biol.* 2008;18(7):481-489. doi:10.1016/j.cub.2008.02.079
1051. Troemel ER, Chu SW, Reinke V, Lee SS, Ausubel FM, Kim DH. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 2006;2(11):e183. doi:10.1371/journal.pgen.0020183
1052. Biteau B, Karpac J, Hwangbo D, Jasper H. Regulation of *Drosophila* lifespan by JNK signaling. *Exp Gerontol.* 2011;46(5):349-354. doi:10.1016/j.exger.2010.11.003
1053. Biteau B, Karpac J, Supoyo S, Degennaro M, Lehmann R, Jasper H. Lifespan extension by preserving proliferative homeostasis in *Drosophila*. *PLoS Genet.* 2010;6(10):e1001159. doi:10.1371/journal.pgen.1001159
1054. Wang MC, Bohmann D, Jasper H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling. *Cell.* 2005;121(1):115-125. doi:10.1016/j.cell.2005.02.030
1055. Gan T, Fan L, Zhao L, et al. JNK Signaling in *Drosophila* Aging and Longevity. *Int J Mol Sci.* 2021;22(17). doi:10.3390/ijms22179649
1056. Ashton-Beaucage D, Udell CM, Gendron P, et al. A functional screen reveals an extensive layer of transcriptional and splicing control underlying RAS/MAPK signaling in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 2014;12(3):e1001809. doi:10.1371/journal.pbio.1001809
1057. Rushworth LK, Hindley AD, O'Neill E, Kolch W. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heterodimerization. *Mol Cell Biol.* 2006;26(6):2262-2272. doi:10.1128/MCB.26.6.2262-2272.2006



1058. Waterman MJ, Stavridi ES, Waterman JL, Halazonetis TD. ATM-dependent activation of p53 involves dephosphorylation and association with 14-3-3 proteins. *Nat Genet.* 1998;19(2):175-178. doi:10.1038/542
1059. Lee J-H, Jin Y, He G, et al. Hypoxia activates tumor suppressor p53 by inducing ATR-Chk1 kinase cascade-mediated phosphorylation and consequent 14-3-3 $\gamma$  inactivation of MDMX protein. *J Biol Chem.* 2012;287(25):20898-20903. doi:10.1074/jbc.M111.336875
1060. LeBron C, Chen L, Gilkes DM, Chen J. Regulation of MDMX nuclear import and degradation by Chk2 and 14-3-3. *EMBO J.* 2006;25(6):1196-1206. doi:10.1038/sj.emboj.7601032
1061. Rajagopalan S, Jaulent AM, Wells M, Veprintsev DB, Fersht AR. 14-3-3 activation of DNA binding of p53 by enhancing its association into tetramers. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(18):5983-5991. doi:10.1093/nar/gkn598
1062. Wang B, Liu K, Lin F-T, Lin W-C. A role for 14-3-3 tau in E2F1 stabilization and DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2004;279(52):54140-54152. doi:10.1074/jbc.M410493200
1063. Li Y, Inoki K, Yeung R, Guan K-L. Regulation of TSC2 by 14-3-3 binding. *J Biol Chem.* 2002;277(47):44593-44596. doi:10.1074/jbc.C200510200
1064. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan K-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol.* 2002;4(9):648-657. doi:10.1038/ncb839
1065. Cai S-L, Tee AR, Short JD, et al. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *J Cell Biol.* 2006;173(2):279-289. doi:10.1083/jcb.200507119
1066. Sancak Y, Thoreen CC, Peterson TR, et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell.* 2007;25(6):903-915.
1067. Vander Haar E, Lee S-I, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D-H. Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol.* 2007;9(3):316-323. doi:10.1038/ncb1547
1068. Inoki K, Zhu T, Guan K-L. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* 2003;115(5):577-590. doi:10.1016/s0092-8674(03)00929-2
1069. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2008;30(2):214-226. doi:10.1016/j.molcel.2008.03.003
1070. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine Phosphorylation of Death Agonist BAD in Response to Survival Factor Results in Binding to 14-3-3 Not BCL-XL. *Cell.* 1996;87(4):619-628. doi:https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81382-3
1071. Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *Curr Biol.* 1998;8(13):779-785.
1072. Qi X-J, Wildey GM, Howe PH. Evidence That Ser87 of BimEL Is Phosphorylated by Akt and Regulates BimEL Apoptotic Function\*. *J Biol Chem.* 2006;281(2):813-823. doi:https://doi.org/10.1074/jbc.M505546200
1073. Sunayama J, Tsuruta F, Masuyama N, Gotoh Y. JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3. *J Cell Biol.* 2005;170(2):295-304. doi:10.1083/jcb.200409117
1074. Yoshida K, Yamaguchi T, Natsume T, Kufe D, Miki Y. JNK phosphorylation of 14-3-3 proteins regulates nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *Nat Cell Biol.* 2005;7(3):278-285. doi:10.1038/ncb1228
1075. Kim W, Jang YG, Yang J, Chung J. Spatial Activation of TORC1 Is Regulated by Hedgehog and E2F1 Signaling in the Drosophila Eye. *Dev Cell.* 2017;42(4):363-375.e4. doi:10.1016/j.devcel.2017.07.020
1076. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004;303(5666):2011-2015. doi:10.1126/science.1094637
1077. Morikawa M, Derynck R, Miyazono K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(5). doi:10.1101/cshperspect.a021873
1078. Zhang Y, Alexander PB, Wang X-F. TGF- $\beta$  Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017;9(4). doi:10.1101/cshperspect.a022145

1079. Upadhyay A, Moss-Taylor L, Kim M-J, Ghosh AC, O'Connor MB. TGF- $\beta$  Family Signaling in *Drosophila*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(9). doi:10.1101/cshperspect.a022152
1080. Luo K. Signaling Cross Talk between TGF- $\beta$ /Smad and Other Signaling Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;9(1). doi:10.1101/cshperspect.a022137
1081. Liu C, Xu P, Lamouille S, Xu J, Derynck R. TACE-mediated ectodomain shedding of the type I TGF-beta receptor downregulates TGF-beta signaling. *Mol Cell*. 2009;35(1):26-36. doi:10.1016/j.molcel.2009.06.018
1082. Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*. 1997;89(7):1067-1076. doi:10.1016/s0092-8674(00)80294-9
1083. Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA. TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol*. 2001;3(8):708-714. doi:10.1038/35087019
1084. Larisch S, Yi Y, Lotan R, et al. A novel mitochondrial septin-like protein, ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat Cell Biol*. 2000;2(12):915-921. doi:10.1038/35046566
1085. Jang C-W, Chen C-H, Chen C-C, Chen J, Su Y-H, Chen R-H. TGF-beta induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nat Cell Biol*. 2002;4(1):51-58. doi:10.1038/ncb731
1086. Valderrama-Carvajal H, Cocolakis E, Lacerte A, et al. Activin/TGF-beta induce apoptosis through Smad-dependent expression of the lipid phosphatase SHIP. *Nat Cell Biol*. 2002;4(12):963-969. doi:10.1038/ncb885
1087. Yoo J, Ghiassi M, Jirmanova L, et al. Transforming growth factor-beta-induced apoptosis is mediated by Smad-dependent expression of GADD45b through p38 activation. *J Biol Chem*. 2003;278(44):43001-43007. doi:10.1074/jbc.M307869200
1088. Ramjaun AR, Tomlinson S, Eddaoudi A, Downward J. Upregulation of two BH3-only proteins, Bmf and Bim, during TGF beta-induced apoptosis. *Oncogene*. 2007;26(7):970-981. doi:10.1038/sj.onc.1209852
1089. Ohgushi M, Kuroki S, Fukamachi H, et al. Transforming growth factor beta-dependent sequential activation of Smad, Bim, and caspase-9 mediates physiological apoptosis in gastric epithelial cells. *Mol Cell Biol*. 2005;25(22):10017-10028. doi:10.1128/MCB.25.22.10017-10028.2005
1090. Chalaux E, López-Rovira T, Rosa JL, et al. A zinc-finger transcription factor induced by TGF-beta promotes apoptotic cell death in epithelial Mv1Lu cells. *FEBS Lett*. 1999;457(3):478-482. doi:10.1016/s0014-5793(99)01051-0
1091. Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CMJ, Ko TC, Luo K. Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2004;6(4):366-372. doi:10.1038/ncb1117
1092. Remy I, Montmarquette A, Michnick SW. PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol*. 2004;6(4):358-365. doi:10.1038/ncb1113
1093. Bai H, Kang P, Hernandez AM, Tatar M. Activin Signaling Targeted by Insulin/dFOXO Regulates Aging and Muscle Proteostasis in *Drosophila*. *PLoS Genet*. 2013;9(11):e1003941. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003941>
1094. Datto MB, Li Y, Panus JF, Howe DJ, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5545-5549. doi:10.1073/pnas.92.12.5545
1095. Dupont S, Zacchigna L, Adorno M, et al. Convergence of p53 and TGF-beta signaling networks. *Cancer Lett*. 2004;213(2):129-138. doi:10.1016/j.canlet.2004.06.008
1096. Elston R, Inman GJ. Crosstalk between p53 and TGF- $\beta$  Signalling. *J Signal Transduct*. 2012;2012:294097. doi:10.1155/2012/294097
1097. Tominaga K, Suzuki HI. TGF- $\beta$  Signaling in Cellular Senescence and Aging-Related Pathology. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20). doi:10.3390/ijms20205002
1098. Kirilly D, Spana EP, Perrimon N, Padgett RW, Xie T. BMP signaling is required for controlling somatic stem cell self-renewal in the *Drosophila* ovary. *Dev Cell*. 2005;9(5):651-662. doi:10.1016/j.devcel.2005.09.013

1099. Pan L, Chen S, Weng C, et al. Stem Cell Aging Is Controlled Both Intrinsically and Extrinsically in the *Drosophila* Ovary. *Cell Stem Cell*. 2007;1(4):458-469. doi:10.1016/j.stem.2007.09.010
1100. Luijsterburg MS, Lindh M, Acs K, et al. DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *J Cell Biol*. 2012;197(2):267-281. doi:10.1083/jcb.201106074
1101. Amitai A, Seeber A, Gasser SM, Holcman D. Visualization of Chromatin Decompaction and Break Site Extrusion as Predicted by Statistical Polymer Modeling of Single-Locus Trajectories. *Cell Rep*. 2017;18(5):1200-1214. doi:10.1016/j.celrep.2017.01.018
1102. Seeber A, Dion V, Gasser SM. Checkpoint kinases and the INO80 nucleosome remodeling complex enhance global chromatin mobility in response to DNA damage. *Genes Dev*. 2013;27(18):1999-2008. doi:10.1101/gad.222992.113
1103. Hauer MH, Gasser SM. Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair. *Genes Dev*. 2017;31(22):2204-2221. doi:10.1101/gad.307702.117
1104. Nakayama Y, Yamaguchi N. Role of cyclin B1 levels in DNA damage and DNA damage-induced senescence. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2013;305:303-337. doi:10.1016/B978-0-12-407695-2.00007-X
1105. Mitra J, Enders GH. Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene*. 2004;23(19):3361-3367. doi:10.1038/sj.onc.1207446
1106. Fagundes R, Teixeira LK. Cyclin E/CDK2: DNA Replication, Replication Stress and Genomic Instability. *Front cell Dev Biol*. 2021;9:774845. doi:10.3389/fcell.2021.774845
1107. Giunta S, Belotserkovskaya R, Jackson SP. DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J Cell Biol*. 2010;190(2):197-207. doi:10.1083/jcb.200911156
1108. Thompson R, Gatenby R, Sidi S. How Cells Handle DNA Breaks during Mitosis: Detection, Signaling, Repair, and Fate Choice. *Cells*. 2019;8(9). doi:10.3390/cells8091049
1109. Seluanov A, Mittelman D, Pereira-Smith OM, Wilson JH, Gorbunova V. DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(20):7624-7629. doi:10.1073/pnas.0400726101
1110. Grice GL, Nathan JA. The recognition of ubiquitinated proteins by the proteasome. *Cell Mol Life Sci*. 2016;73(18):3497-3506. doi:10.1007/s00018-016-2255-5
1111. Kaneko T, Silverman N. Bacterial recognition and signalling by the *Drosophila* IMD pathway. *Cell Microbiol*. 2005;7(4):461-469. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00504.x
1112. Ashok Y. *Drosophila* toll pathway: the new model. *Sci Signal*. 2009;2(52):jc1. doi:10.1126/scisignal.252jc1
1113. Rosales C. Cellular and Molecular Mechanisms of Insect Immunity. In : ; 2017.
1114. Libert S, Chao Y, Chu X, Pletcher SD. Trade-offs between longevity and pathogen resistance in *Drosophila melanogaster* are mediated by NFκB signaling. *Aging Cell*. 2006;5(6):533-543. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00251.x
1115. Takehana A, Yano T, Mita S, Kotani A, Oshima Y, Kurata S. Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *EMBO J*. 2004;23(23):4690-4700. doi:10.1038/sj.emboj.7600466
1116. DeVeale B, Brummel T, Seroude L. Immunity and aging: the enemy within? *Aging Cell*. 2004;3(4):195-208. doi:10.1111/j.1474-9728.2004.00106.x
1117. Paik D, Jang YG, Lee YE, et al. Misexpression screen delineates novel genes controlling *Drosophila* lifespan. *Mech Ageing Dev*. 2012;133(5):234-245. doi:10.1016/j.mad.2012.02.001
1118. Paredes JC, Welchman DP, Poidevin M, Lemaitre B. Negative regulation by amidase PGRPs shapes the *Drosophila* antibacterial response and protects the fly from innocuous infection. *Immunity*. 2011;35(5):770-779. doi:10.1016/j.immuni.2011.09.018
1119. Petersen AJ, Rimkus SA, Wassarman DA. ATM kinase inhibition in glial cells activates the innate immune

- response and causes neurodegeneration in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(11):E656-64. doi:10.1073/pnas.1110470109
1120. Petersen AJ, Katzenberger RJ, Wassarman DA. The innate immune response transcription factor relish is necessary for neurodegeneration in a *Drosophila* model of ataxia-telangiectasia. *Genetics*. 2013;194(1):133-142. doi:10.1534/genetics.113.150854
1121. Kounatidis I, Chtarbanova S, Cao Y, et al. NF- $\kappa$ B Immunity in the Brain Determines Fly Lifespan in Healthy Aging and Age-Related Neurodegeneration. *Cell Rep*. 2017;19(4):836-848. doi:10.1016/j.celrep.2017.04.007
1122. Ryu J-H, Kim S-H, Lee H-Y, et al. Innate immune homeostasis by the homeobox gene caudal and commensal-gut mutualism in *Drosophila*. *Science*. 2008;319(5864):777-782. doi:10.1126/science.1149357
1123. Davoodi S, Galenza A, Panteluk A, et al. The Immune Deficiency Pathway Regulates Metabolic Homeostasis in *Drosophila*. *J Immunol*. 2019;202(9):2747-2759. doi:10.4049/jimmunol.1801632
1124. Zhang G, Li J, Purkayastha S, et al. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK- $\beta$ , NF- $\kappa$ B and GnRH. *Nature*. 2013;497(7448):211-216. doi:10.1038/nature12143
1125. Jurk D, Wilson C, Passos JF, et al. Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nat Commun*. 2014;5(1):4172. doi:10.1038/ncomms5172
1126. Tilstra JS, Robinson AR, Wang J, et al. NF- $\kappa$ B inhibition delays DNA damage-induced senescence and aging in mice. *J Clin Invest*. 2012;122(7):2601-2612. doi:10.1172/JCI45785
1127. Tilstra JS, Clauson CL, Niedernhofer LJ, Robbins PD. NF- $\kappa$ B in Aging and Disease. *Aging Dis*. 2011;2(6):449-465.
1128. Garsin DA, Villanueva JM, Begun J, et al. Long-lived *C. elegans* daf-2 mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science*. 2003;300(5627):1921. doi:10.1126/science.1080147
1129. Anyanful A, Dolan-Livengood JM, Lewis T, et al. Paralysis and killing of *Caenorhabditis elegans* by enteropathogenic *Escherichia coli* requires the bacterial tryptophanase gene. *Mol Microbiol*. 2005;57(4):988-1007. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04739.x
1130. Hansen M, Taubert S, Crawford D, Libina N, Lee S-J, Kenyon C. Lifespan extension by conditions that inhibit translation in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 2007;6(1):95-110. doi:10.1111/j.1474-9726.2006.00267.x
1131. Seo K, Choi E, Lee D, Jeong D-E, Jang SK, Lee S-J. Heat shock factor 1 mediates the longevity conferred by inhibition of TOR and insulin/IGF-1 signaling pathways in *C. elegans*. *Aging Cell*. 2013;12(6):1073-1081. doi:10.1111/accel.12140
1132. Libert S, Chao Y, Zwiener J, Pletcher SD. Realized immune response is enhanced in long-lived puc and chico mutants but is unaffected by dietary restriction. *Mol Immunol*. 2008;45(3):810-817. doi:10.1016/j.molimm.2007.06.353
1133. Varma D, Bülow MH, Pesch Y-Y, Loch G, Hoch M. Forkhead, a new cross regulator of metabolism and innate immunity downstream of TOR in *Drosophila*. *J Insect Physiol*. 2014;69:80-88. doi:10.1016/j.jinsphys.2014.04.006
1134. Zou C-G, Tu Q, Niu J, Ji X-L, Zhang K-Q. The DAF-16/FOXO Transcription Factor Functions as a Regulator of Epidermal Innate Immunity. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003660. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003660>
1135. Becker T, Loch G, Beyer M, et al. FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature*. 2010;463(7279):369-373. doi:10.1038/nature08698
1136. McCormack S, Yadav S, Shokal U, Kenney E, Cooper D, Eleftherianos I. The insulin receptor substrate Chico regulates antibacterial immune function in *Drosophila*. *Immun Ageing*. 2016;13(1):15. doi:10.1186/s12979-016-0072-1
1137. Ragab A, Buechling T, Gesellchen V, Spirohn K, Boettcher A-L, Boutros M. *Drosophila* Ras/MAPK signalling regulates innate immune responses in immune and intestinal stem cells. *EMBO J*. 2011;30(6):1123-1136. doi:10.1038/emboj.2011.4

1138. Papp D, Csermely P, S6ti C. A role for SKN-1/Nrf in pathogen resistance and immunosenescence in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002673. doi:10.1371/journal.ppat.1002673
1139. Nicholas HR, Hodgkin J. The ERK MAP kinase cascade mediates tail swelling and a protective response to rectal infection in *C. elegans*. *Curr Biol.* 2004;14(14):1256-1261. doi:10.1016/j.cub.2004.07.022
1140. Xu J, Hopkins K, Sabin L, et al. ERK signaling couples nutrient status to antiviral defense in the insect gut. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(37):15025-15030. doi:10.1073/pnas.1303193110
1141. Irazoqui JE, Urbach JM, Ausubel FM. Evolution of host innate defence: insights from *Caenorhabditis elegans* and primitive invertebrates. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(1):47-58. doi:10.1038/nri2689
1142. Han ZS, Enslin H, Hu X, et al. A conserved p38 mitogen-activated protein kinase pathway regulates *Drosophila* immunity gene expression. *Mol Cell Biol.* 1998;18(6):3527-3539. doi:10.1128/MCB.18.6.3527
1143. West C, Silverman N. p38b and JAK-STAT signaling protect against Invertebrate iridescent virus 6 infection in *Drosophila*. *PLoS Pathog.* 2018;14(5):e1007020. doi:10.1371/journal.ppat.1007020
1144. Delaney JR, St6ven S, Uvell H, Anderson K V, Engstr6m Y, Mlodzik M. Cooperative control of *Drosophila* immune responses by the JNK and NF-kappaB signaling pathways. *EMBO J.* 2006;25(13):3068-3077. doi:10.1038/sj.emboj.7601182
1145. Souvannaseng L, Hun LV, Baker H, et al. Inhibition of JNK signaling in the Asian malaria vector *Anopheles stephensi* extends mosquito longevity and improves resistance to *Plasmodium falciparum* infection. *PLOS Pathog.* 2018;14(11):e1007418. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007418>
1146. Clark RI, Woodcock KJ, Geissmann F, Trouillet C, Dionne MS. Multiple TGF- $\beta$  superfamily signals modulate the adult *Drosophila* immune response. *Curr Biol.* 2011;21(19):1672-1677. doi:10.1016/j.cub.2011.08.048
1147. Mallo G V, Kurz CL, Couillault C, et al. Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Curr Biol.* 2002;12(14):1209-1214. doi:10.1016/s0960-9822(02)00928-4
1148. Munro D, Blier PU. The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. *Aging Cell.* 2012;11(5):845-855. doi:10.1111/J.1474-9726.2012.00847.X
1149. Mitchell TW, Buffenstein R, Hulbert AJ. Membrane phospholipid composition may contribute to exceptional longevity of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*): A comparative study using shotgun lipidomics. *Exp Gerontol.* 2007;42(11):1053-1062. doi:10.1016/J.EXGER.2007.09.004
1150. Hulbert AJ, Martin N, Else PL. Lipid peroxidation and animal longevity. *Lipid Peroxidation Inhib Eff Mech Nov Publ.* Published online 2017.
1151. Ponnappan U, Holley DH, Lipschitz DA. Effect of age on the fatty acid composition of phospholipids in human lymphocytes. *Exp Gerontol.* 1996;31(1-2):125-133. doi:10.1016/0531-5565(95)02017-9
1152. Rabini RA, Moretti N, Staffolani R, et al. Reduced susceptibility to peroxidation of erythrocyte plasma membranes from centenarians. *Exp Gerontol.* 2002;37(5):657-663. doi:10.1016/S0531-5565(02)00006-2
1153. Shmookler Reis RJ, Xu L, Lee H, et al. Modulation of lipid biosynthesis contributes to stress resistance and longevity of *C. elegans* mutants. *Aging (Albany NY).* 2011;3(2):125-147. doi:10.18632/AGING.100275
1154. Murphy CT, McCarroll SA, Bargmann CI, et al. Genes that act downstream of DAF-16 to influence the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2003;424(6946):277.
1155. Han S, Schroeder EA, Silva-García CG, Hebestreit K, Mair WB, Brunet A. Mono-unsaturated fatty acids link H3K4me3 modifiers to *C. elegans* lifespan. *Nat* 2017 5447649. 2017;544(7649):185-190. doi:10.1038/nature21686
1156. Knipple DC, Rosenfield CL, Miller SJ, et al. Cloning and functional expression of a cDNA encoding a pheromone gland-specific acyl-CoA Delta 11-desaturase of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(26):15287-15292. doi:10.1073/pnas.95.26.15287
1157. Golej DL, Askari B, Kramer F, et al. Long-chain acyl-CoA synthetase 4 modulates prostaglandin E<sub>2</sub> release from human arterial smooth muscle cells. *J Lipid Res.* 2011;52(4):782-793. doi:10.1194/jlr.M013292
1158. Zhou L, Nilsson Å. Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J Lipid Res.* 2001;42(10):1521-

1542. doi:[https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32206-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32206-9)
1159. Sonnweber T, Pizzini A, Nairz M, Weiss G, Tancevski I. Arachidonic Acid Metabolites in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11). doi:10.3390/ijms19113285
1160. Bennett M, Gilroy DW. Lipid Mediators in Inflammation. *Microbiol Spectr.* 2016;4(6). doi:10.1128/microbiolspec.MCHD-0035-2016
1161. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2006;75(3):197-202. doi:10.1016/j.plefa.2006.05.012
1162. Nelson JR, Raskin S. The eicosapentaenoic acid:arachidonic acid ratio and its clinical utility in cardiovascular disease. *Postgrad Med.* 2019;131(4):268-277. doi:10.1080/00325481.2019.1607414
1163. Shojima Y, Ueno Y, Tanaka R, et al. Eicosapentaenoic-to-Arachidonic Acid Ratio Predicts Mortality and Recurrent Vascular Events in Ischemic Stroke Patients. *J Atheroscler Thromb.* 2020;27(9):969-977. doi:10.5551/jat.52373
1164. Qi W, Gutierrez GE, Gao X, et al. The  $\omega$ -3 fatty acid  $\alpha$ -linolenic acid extends *Caenorhabditis elegans* lifespan via NHR-49/PPAR $\alpha$  and oxidation to oxylipins. *Aging Cell.* 2017;16(5):1125-1135. doi:10.1111/ace1.12651
1165. O'Rourke EJ, Kuballa P, Xavier R, Ruvkun G.  $\omega$ -6 Polyunsaturated fatty acids extend life span through the activation of autophagy. *Genes Dev.* 2013;27(4):429-440. doi:10.1101/gad.205294.112
1166. Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(21):11280-11285. doi:10.1073/pnas.200367597
1167. Inceoglu B, Schmelzer KR, Morisseau C, Jinks SL, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase inhibition reveals novel biological functions of epoxyeicosatrienoic acids (EETs). *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007;82(1):42-49. doi:<https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2006.05.004>
1168. Yu Z, Xu F, Huse LM, et al. Soluble epoxide hydrolase regulates hydrolysis of vasoactive epoxyeicosatrienoic acids. *Circ Res.* 2000;87(11):992-998. doi:10.1161/01.res.87.11.992
1169. Rifkind AB, Lee C, Chang TKH, Waxman DJ. Arachidonic acid metabolism by human cytochrome P450s 2C8, 2C9, 2E1, and 1A2: Regioselective oxygenation and evidence for a role for CYP2C enzymes in arachidonic acid epoxyoxygenation in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 1995;320(2):380-389. doi:[https://doi.org/10.1016/0003-9861\(95\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(95)90023-3)
1170. Keeney DS, Skinner C, Wei S, Friedberg T, Waterman MR. A keratinocyte-specific epoxygenase, CYP2B12, metabolizes arachidonic acid with unusual selectivity, producing a single major epoxyeicosatrienoic acid. *J Biol Chem.* 1998;273(15):9279-9284. doi:10.1074/jbc.273.15.9279
1171. Zeldin DC, Dubois RN, Falck JR, Capdevila JH. Molecular Cloning, Expression and Characterization of an Endogenous Human Cytochrome P450 Arachidonic Acid Epoxygenase Isoform. *Arch Biochem Biophys.* 1995;322(1):76-86. doi:<https://doi.org/10.1006/abbi.1995.1438>
1172. Oleksiak MF, Wu S, Parker C, Karchner SI, Stegeman JJ, Zeldin DC. Identification, Functional Characterization, and Regulation of a New Cytochrome P450 Subfamily, the CYP2Ns\*. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2312-2321. doi:<https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2312>
1173. Walker DW, Muffat J, Rundel C, Benzer S. Overexpression of a *Drosophila* homolog of apolipoprotein D leads to increased stress resistance and extended lifespan. *Curr Biol.* 2006;16(7):674-679. doi:10.1016/j.cub.2006.01.057
1174. Sanchez D, López-Arias B, Torroja L, et al. Loss of glial lazarrillo, a homolog of apolipoprotein D, reduces lifespan and stress resistance in *Drosophila*. *Curr Biol.* 2006;16(7):680-686.
1175. Cadenas C, Vosbeck S, Edlund K, et al. LIPG-promoted lipid storage mediates adaptation to oxidative stress in breast cancer. *Int J cancer.* 2019;145(4):901-915. doi:10.1002/ijc.32138
1176. Tylki-Szymańska A, Jurecka A. Lysosomal acid lipase deficiency: wolman disease and cholesteryl ester storage disease. *Pril (Makedonska Akad na Nauk i Umet Oddelenie za Med Nauk.* 2014;35(1):99-106.
1177. Anderson RA, Bryson GM, Parks JS. Lysosomal acid lipase mutations that determine phenotype in Wolman and

- cholesterol ester storage disease. *Mol Genet Metab.* 1999;68(3):333-345. doi:10.1006/mgme.1999.2904
1178. Yamamoto K, Kitano Y, Shuang E, et al. Decreased lipid absorption due to reduced pancreatic lipase activity in aging male mice. *Biogerontology.* 2014;15(5):463-473. doi:10.1007/s10522-014-9512-5
1179. Roe CR, Ding J. Mitochondrial fatty acid oxidation disorders. En: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Eds. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. Published online 2001.
1180. Longo N, Frigeni M, Pasquali M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1863(10):2422-2435. doi:10.1016/j.bbamcr.2016.01.023
1181. Yang L, Zhang Y, Wang S, Zhang W, Shi R. Decreased liver peroxisomal  $\beta$ -oxidation accompanied by changes in brain fatty acid composition in aged rats. *Neurol Sci.* 2014;35(2):289-293. doi:10.1007/s10072-013-1509-3
1182. Watanabe K, Wilmsanski T, Baloni P, et al. Lifespan-extending interventions induce consistent patterns of fatty acid oxidation in mouse livers. *Commun Biol.* 2023;6(1):768. doi:10.1038/s42003-023-05128-y
1183. Lee S-H, Lee S-K, Paik D, Min K-J. Overexpression of fatty-acid- $\beta$ -oxidation-related genes extends the lifespan of *Drosophila melanogaster*. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:854502. doi:10.1155/2012/854502
1184. Laranjeira A, Schulz J, Dotti CG. Genes Related to Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation Play a Role in the Functional Decline of the *Drosophila* Brain with Age. *PLoS One.* 2016;11(8):e0161143. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161143>
1185. Liu D, Zeng X, Li L, Ou Z-L. Carnitine promotes recovery from oxidative stress and extends lifespan in *C. elegans*. *Aging (Albany NY).* 2020;13(1):813-830. doi:10.18632/aging.202187
1186. Jiang F, Zhang Z, Zhang Y, Wu J, Yu L, Liu S. L-carnitine ameliorates the liver inflammatory response by regulating carnitine palmitoyltransferase I-dependent PPAR $\gamma$  signaling. *Mol Med Rep.* 2016;13(2):1320-1328. doi:10.3892/mmr.2015.4639
1187. Ferreira GC, McKenna MC. L-Carnitine and Acetyl-L-carnitine Roles and Neuroprotection in Developing Brain. *Neurochem Res.* 2017;42(6):1661-1675. doi:10.1007/s11064-017-2288-7
1188. Lee B-J, Lin J-S, Lin Y-C, Lin P-T. Antiinflammatory effects of L-carnitine supplementation (1000 mg/d) in coronary artery disease patients. *Nutrition.* 2015;31(3):475-479. doi:10.1016/j.nut.2014.10.001
1189. Hiskens MI, Li KM, Schneiders AG, Fenning AS. Repetitive mild traumatic brain injury-induced neurodegeneration and inflammation is attenuated by acetyl-L-carnitine in a preclinical model. *Front Pharmacol.* 2023;14. doi:10.3389/fphar.2023.1254382
1190. Ramachandran P V, Savini M, Follick AK, et al. Lysosomal Signaling Promotes Longevity by Adjusting Mitochondrial Activity. *Dev Cell.* 2019;48(5):685-696.e5. doi:<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.12.022>
1191. Doering KRS, Ermakova G, Taubert S. Nuclear hormone receptor NHR-49 is an essential regulator of stress resilience and healthy aging in *Caenorhabditis elegans*. *Front Physiol.* 2023;14:1241591. doi:10.3389/fphys.2023.1241591
1192. Muratsu J, Kamide K, Fujimoto T, et al. The Combination of High Levels of Adiponectin and Insulin Resistance Are Affected by Aging in Non-Obese Old Peoples. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022;12(January):1-10. doi:10.3389/fendo.2021.805244
1193. Iwabu M, Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Kadowaki T. Adiponectin/adiponectin receptor in disease and aging. *npjj Aging Mech Dis.* 2015;1(1):15013. doi:10.1038/npjamd.2015.13
1194. Wang Z V, Scherer PE. Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol.* 2016;8(2):93-100. doi:10.1093/jmcb/mjw011
1195. Li N, Zhao S, Zhang Z, et al. Adiponectin preserves metabolic fitness during aging. *Elife.* 2021;10. doi:10.7554/eLife.65108
1196. Li S, Kim H-E. Implications of Sphingolipids on Aging and Age-Related Diseases. *Front Aging.* 2022;2(March):1-16. doi:10.3389/fragi.2021.797320
1197. Hallett PJ, Huebeker M, Brekk OR, et al. Glycosphingolipid levels and glucocerebrosidase activity are altered in normal aging of the mouse brain. *Neurobiol Aging.* 2018;67:189-200. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2018.02.028

1198. Rocha EM, Smith GA, Park E, et al. Progressive decline of glucocerebrosidase in aging and Parkinson's disease. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015;2(4):433-438. doi:<https://doi.org/10.1002/acn3.177>
1199. Cutler RG, Thompson KW, Camandola S, Mack KT, Mattson MP. Sphingolipid metabolism regulates development and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev.* 2014;143-144:9-18. doi:10.1016/j.mad.2014.11.002
1200. Levros L-C, Labrie M, Charfi C, Rassart E. Binding and repressive activities of apolipoprotein E3 and E4 isoforms on the human ApoD promoter. *Mol Neurobiol.* 2013;48:669-680.
1201. Ruiz M, Sanchez D, Correnti C, Strong RK, Ganfomina MD. Lipid-binding properties of human Apo D and L azarillo-related lipocalins: functional implications for cell differentiation. *FEBS J.* 2013;280(16):3928-3943.
1202. Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science.* 1988;240(4852):622-630. doi:10.1126/science.3283935
1203. Endo S, Morikawa Y, Kudo Y, et al. Human dehydrogenase/reductase SDR family member 11 (DHRS11) and aldo-keto reductase 1C isoforms in comparison: Substrate and reaction specificity in the reduction of 11-keto-C19-steroids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2020;199:105586. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2020.105586>
1204. Seybold SJ, Tittiger C. Biochemistry and molecular biology of de novo isoprenoid pheromone production in the Scolytidae. *Annu Rev Entomol.* 2003;48:425-453. doi:10.1146/annurev.ento.48.091801.112645
1205. Feng Z, Hanson RW, Berger NA, Trubitsyn A. Reprogramming of energy metabolism as a driver of aging. *Oncotarget.* 2016;7(13):15410-15420. doi:10.18632/oncotarget.7645
1206. Ma Z, Wang H, Cai Y, et al. Epigenetic drift of H3K27me3 in aging links glycolysis to healthy longevity in *Drosophila*. Kaeberlein M, ed. *Elife.* 2018;7:e35368. doi:10.7554/eLife.35368
1207. Ravera S, Podestà M, Sabatini F, et al. Discrete Changes in Glucose Metabolism Define Aging. *Sci Rep.* 2019;9(1):10347. doi:10.1038/s41598-019-46749-w
1208. Sikora E, Bielak-Zmijewska A, Dudkowska M, et al. Cellular Senescence in Brain Aging. *Front Aging Neurosci.* 2021;13. doi:10.3389/fnagi.2021.646924 WE - Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED)
1209. Camandola S, Mattson MP. Brain metabolism in health, aging, and neurodegeneration. *EMBO J.* 2017;36(11):1474-1492. doi:10.15252/embj.201695810 WE - Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED) WE - Social Science Citation Index (SSCI)
1210. Grimm A, Eckert A. Brain aging and neurodegeneration: from a mitochondrial point of view. *J Neurochem.* 2017;143(4):418-431. doi:10.1111/jnc.14037 WE - Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED)