

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Alena Jelínková

Proč rypoši nestárnou?

The longevity in mole rat

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Michaela Schierová, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, dne 11.5.2016

.....

Alena Jelínková

Poděkování:

Děkuji RNDr. Michaele Schierové, Ph.D. za vedení, trpělivost a veškerý čas, který mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovala.

Dále děkuji RNDr. Martině Johnson Pokorné, Ph.D. za objasnění problematiky evoluční biologie v souvislosti s tématem práce.

Abstrakt

Rypoši jsou vhodnými modelovými organismy pro studium lidských chorob souvisejících se stářím. Na rozdíl od člověka se dožívají vysokého věku v nezvykle dobré kondici. Nejedná se o blízce příbuzné druhy, i když by se tak dle českého rodového jména mohlo zdát. V porovnání s jinými hlodavci nebo s člověkem, jsou u rypošů geny spojené se stárnutím a tumorigenezí regulovány odlišným způsobem nebo mutovány. V extrémních případech mají rypoši větší počet kopií daného genu, geny zcela nové nebo naopak určité geny postrádají. U rypošů lysých je zvýšená hladina některých proteinů, které zabraňují tvorbě plaků amyloidu β a podporují zvýšenou odolnost vůči oxidativnímu poškození. Procesu stárnutí zabraňuje i účinné odstraňování poškozených proteinů, přirozená kalorická restrikce nebo posílení angiogeneze. Rypoši lysí mají efektivní časnou kontaktní inhibici, která rozvoji tumoru zabrání, a také vysoké množství α -2-makroglobulinu v krvi, který blokuje signální dráhy nutné pro rozvoj a migraci tumoru. K prodloužení života u rypošů přispívá mnoho různých mechanismů, které se vzájemně doplňují. Cílem práce je představit některé odlišnosti v genomu a proteomu rypošů, které k jejich dlouhověkosti přispívají.

Klíčová slova: rypoš lysý, rypoš slepý, rezistence k nádorové transformaci, senescence, stárnutí, choroby spojené se stárnutím

Abstract

Naked mole rat and blind mole rat are useful model organisms for human age-associated diseases studies. Unlike human, their long lifespan is not accompanied by physical health impairment. In both species, the genes involved in aging process or carcinogenesis are under positive selection or their regulation differs from the regulatory pattern known in other rodents or human. Some genes are present in higher number of copies, missing or entirely new and not observed in other organisms. In naked mole rat, the degenerative development is reduced by elevated level of proteins which prevent amyloid β aggregation and contribute to oxidative damage tolerance. Their healthy aging is also caused by effective elimination of damaged proteins, natural caloric restriction or angiogenesis enhancement. High level of α -2-macroglobulin in blood, which is able to inhibit signal pathways required for tumor growth and malignancy, as well as the early contact inhibition repress tumorigenesis in naked mole rat. Many different mechanisms are involved in prolonged lifespan in both naked and blind mole rat species. The aim of this thesis is to present the most important genome and proteome differences contributing to their long lifespan.

Key words: naked mole rat, blind mole rat, tumorigenesis resistance, senescence, aging, age-associated diseases

Seznam zkratk:

8-OHdG	8-Oxo-2'-deoxyguanosine	8-hydroxy-2-deoxyguanosin
A2M	α -2-macroglobulin	α -2-makroglobulin
ALDO	fructose-bisphosphate aldolase	fruktóza-bisfosfát aldoláza
ALT	alanine transaminase	alanin transamináza
ARE element	antioxidant response element	vazebná sekvence pro transkripční faktor antioxidantní odpovědi
ARF	ADP ribosylation factor	ADP ribozylační faktor
Atf3	activating transcription factor 3	gen kódující aktivační transkripční faktor 3
BACH	brain acyl-coenzym A hydrolase	acyl-koenzym A hydroláza specifická pro mozek
BMR	basal metabolism rate	hodnota bazálního metabolismu
BRCA1	breast cancer 1	protein rakoviny prsu 1
CDK4	cyklin-dependent kinase 4	cyklin-dependentní kináza 4
CDK6	cyklin-dependent kinase 6	cyklin-dependentní kináza 6
CEBPG	CCAAT/enhancer binding protein-gama	CCAAT/enhancer vazebný protein gama
Cttnb1	catenin β 1 coding gene	gen kódující katenin β 1
CYP46A1	cholesterol 24-hydroxylase coding gene	gen kódující cholesterol 24-hydrolázu
Dap10	DNAX-activation protein 10 coding gene	gen kódující aktivační protein pro DNAX 10
DDX5	DEAD-box protein 5	DEAD-box protein 5
ECI	early contact inhibition	časná kontaktní inhibice
ENO1	α -enolase	α -enoláza
FAS	fas cell surface death receptor coding gene	gen kódující povrchový receptor fas indukující smrt
FASTK	Fas-activated serine/threonine kinase coding gene	gen kódující serin/threonin kinázu aktivovanou Fas
FASTKD2	Fas-activated serine/threonine kinase domains 2 coding gene	gen kódující serin/threonin kinázu aktivovanou Fas, doménu 2
Foxo3A	forkhead box O3 coding gene	gen kódující forkhead box O3 protein
FZD	frizzled receptor	frizzled receptor
G0s2	G0 /G1 switch coding gene	gen kódující G0 /G1 switch protein
GH	growth hormone	růstový hormon

GHR	growth hormone receptor	receptor pro růstový hormon
GSK3	glycogen synthase kinase-3 β	kináza-3 β pro glykogen syntázu
GST	glutathion-S-transferase	glutathion-S-transferáza
HA	hyaluronan	hyaluronan
HAS	hyaluronan syntase	hyaluronan syntáza
HES1	enhancer of split 1 coding gene	Gen kódující enhancer rozdělení 1
HIF	hypoxia inducible factor	hypoxií indukovaný faktor
HMM-HA	high molecular mass hyaluronan	hyaluronan s vysokou molekulární hmotností
Hras1	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	homolog onkogenu virového původu (kmen Harvey)
HSPs	heat shock proteins	proteiny teplotního šoku
IGF	insulin – like growth factor	růstový faktor podobný inzulinu
IGF BP	insulin – like growth factor binding proteins	vazebné proteiny pro růstový faktor podobný inzulinu
IGF-R	insulin – like growth factor receptor	receptor pro růstový faktor podobný inzulinu
IIS	insulin/insulin-like growth factor-1 signal pathway	signální dráha inzulinu a růstového faktoru podobného inzulinu 1
IL1β	interleukin 1 β	interleukin 1 β
INK4	inhibitor of cyclin-dependent kinase 4	inhibitor cyklin-dependentní kinázy 4
Keap1	kelch-like ECH-associated protein 1	protein 1 podobný kelch, asociovaný s ECH
LC3-II	microtubule-associated protein light chain 3, phosphatidylethanolamine conjugate	lehký řetězec 3 proteinu asociovaného s mikrotubuly, konjugovaný s fosfatidylethanolaminem
LEF	lymphoid enhancer factor	lymfoidní enhancer faktor
LRP-1	low-density lipoprotein receptor-related protein	protein příbuzný lipoproteinovému receptoru s nízkou denzitou
MDH	malate dehydrogenase	malát dehydrogenáza
Mdm2	mouse double minute 2 homolog	myší double minute 2 homolog
Mnda	the myeloid cell nuclear differentiation antigen coding gene	gen kódující jaderný diferenciační antigen myeloidních buněk
NF2	neurofibromin 2	neurofibromin 2
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor-2	jaderný faktor 2 příbuzný erythroidu 2
NRG-1	neuregulin-1	neuregulin-1
PAPP-A	pregnancy-associated plasma protein-A	plazmatický protein A asociovaný s těhotenstvím
PUFAs	polyunsaturated fatty acids	polynenasycené mastné kyseliny
Rb	retinoblastoma protein	retinoblastomový protein

Rcan1	regulator of calcineurin coding gene	gen kódující regulátor kalcineurinu
RHAMM	high molecular mass hyaluronan receptor	receptor pro hyaluronan s vysokou molekulární hmotností
RHO	rhodopsin coding gene	gen kódující rhodopsin
ROS	reactive oxygen species	reaktivní radikály kyslíku
SASP	senescence-associated secretory phenotype	sekreční fenotyp asociovaný se senescencí
sCarp	spalax Cardiac adriamycin-responsive protein	gen spalaxe kódující srdeční protein responzivní na adramycin
Serpina10	Serpin Peptidase Inhibitor, Clade B coding gene	gen kódující inhibitor serpin peptidázy, skupina B
SINE	short interspersed elements	krátké rozptýlené elementy
Smad3	SMAD Family Member 3 coding gene	gen kódující člen 3 rodiny SMAD
TCF	T-cell factor	faktor T-buněk
TEP1	telomerase-associated protein 1 coding gene	gen kódující protein jedna asociující s telomerázou
TERF	telomeric repeat-binding factor 1 coding gene	gen kódující vazebný faktor 1 pro repetitivní sekvenci telomer
TERT	telomerase reverse transcriptase coding gene	gen kódující podjednotku telomerázy s funkcí reverzní transkriptázy
TGFβ	Transforming growth factor β	růstový faktor β indukující (nádorovou) transformaci
TINF2	TERF1 interacting nuclear factor (TERF1 - Telomeric Repeat Binding Factor 1)	gen kódující jaderný faktor interagující s TERF1 (faktor 1 vázající se na telomerické repetitivní sekvence)
Tnfrsf12a	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A coding gene	gen kódující člen 12A superrodiny receptorů pro tumor nekrotické faktory
TPI	triose phosphate isomerase	triozafosfát izomeráza
TRAIN	transcription of repeats activates interferon	jev spojený s produkcí interferonu vyvolanou transkripcí repetitivních sekvencí
Tsp1	thrombospondin coding gene	gen kódující thrombospondin
UBE1	ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	aktivační enzym 1 pro modifikátor podobný ubiquitinu
UBE2v2	ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant2	enzym E2 konjugující ubiquitin, varianta 2
UCH	ubiquitin-carboxyl-terminal hydrolase	hydroláza specifická pro C-konec ubiquitinu
UPS	ubiquitin/proteasome system	ubiquitin/proteasomální systém
Vegf	vascular epithelial growth factor coding gene	gen kódující vaskulární epiteliální růstový faktor
β-TrCP	β-transducin repeat-containing protein	protein obsahující β-transducinovou repetici

Obsah

Proč rypoši nestárnou?.....	1
1 Úvod	1
1.1 Biologie rypošů	2
2 Genom a transkriptom rypoše lysého a rypoše slepého.....	4
3 Specifické znaky rypošů.....	8
3.1 Adaptace na hypoxii	8
3.2 Rypoši lysí a oxidativní stres	12
3.3 Zajištění proteostáze u rypoše lysého	14
3.4 Nízký bazální metabolismus prodlužuje život	16
4 Rezistence k nádorové transformaci	19
4.1 Změny v genech rypošů spojených s nádorovou transformací.....	19
4.2 p53 u rypoše slepého a lysého	20
4.3 Časná kontaktní inhibice u rypoše lysého	22
4.4 Proteiny ovlivňující odolnost proti nádorové transformaci	26
5 Využití pro člověka	27
6 Závěr	29
7 Reference	31

Proč rypoši nestárnou?

1 Úvod

Se zlepšující se životní úroveň a zdravotní péčí dochází k prodlužování života člověka. Jelikož lidí v pokročilém věku stále přibývá, je studiu příčin senescence a zmírnění degenerativních procesů věnováno hodně pozornosti.

Ke studiu mechanismů stárnutí u lidí se zpravidla používají modelové organismy s krátkou délkou života. Lidé však žijí déle a stárnou pomaleji, než by se dalo očekávat vzhledem ke korelaci mezi tělesnou hmotností a maximální délkou života. (Speakman 2005) Z tohoto důvodu je vhodné mezi modelové organismy zařadit i dlouhověké organismy.

Hlodavci (*Rodentia*) patří mezi hojně využívané modelové organismy. Jejich chov v laboratoři je nenáročný a mají vysoký počet potomků. Zhruba 40% všech savců patří do řádu hlodavců. Jde tedy o velmi rozmanitou skupinu příbuzných živočichů, vhodných pro nejrůznější studie. Délka jejich života se pohybuje od několika let až k desítkám. Velmi vysokého věku se dožívají například bobří (*Castor canadensis*) a veverka (*Sciurus carolinensis*). Maximální délka života u obou druhů je 24 let. Nejdéle žijícími hlodavci v poměru k jejich tělesné hmotnosti jsou rypoši – rypoš lysý (*Heterocephalus glaber*), který se dožívá až 32 let a rypoš slepý (*Spalax ehrenbergi*), který žije až 24 let. (Gorbunova *et al.* 2014)

Velké rozdíly v délce života u hlodavců mohou být zapříčiněny, mimo jiné, způsobem života a ohrožením predátory, respektive úmrtností způsobenou predátory. Geny související s dlouhověkostí jsou preferovány v nepřítomnosti predátorů. (Shattuck, Williams 2010)

Extrémní délka života u rypošů je způsobena kombinací znaků a schopností, preferovaných během jejich evoluce a fixovaných v jejich současné populaci.

Stárnutí můžeme chápat jako nezvratný proces pozvolného snižování fyziologických a biochemických funkcí, které jsou nezbytné jak pro jednotlivé buňky, tak pro celý organismus, a jediným zakončením tohoto procesu, je smrt. (Brohus *et al.* 2015)

Existuje několik teorií, které se pokouší nalézt a vysvětlit konkrétní příčiny stárnutí organismu. Tyto hypotézy vysvětlují poškození a opotřebením organismu několika mechanismy - oxidativním poškozením kyslíkovými radikály (ROS – reactive oxygen species), akumulací vedlejších produktů metabolismu a nesprávně regulovanými drahami, zkracováním konců telomer nebo vlivem rychlosti metabolismu a biologickými hodinami. (Yang *et al.* 2010; Tümpel *et al.* 2012; Speakman 2005; Colman *et al.* 2014; Pride *et al.* 2015) Podíl jednotlivých faktorů na projevech stárnutí není doposud jasný a může se lišit u různých druhů i mezi jedinci téhož druhu.

Cílem této práce je představit rypoše lysého a rypoše slepého jako unikátní modelové organismy pro studium stárnutí a dlouhověkosti. Zaměřím se především na jejich specifické vlastnosti, které přispívají k vysoké odolnosti vůči rakovině a k dlouhověkosti bez omezení fyzické zdatnosti. Zda budou poznatky o rypoších využitelné při prevenci stárnutí u člověka nebo jen přispějí k našim znalostem o procesu stárnutí, je dosud otevřená otázka.

1.1 Biologie rypošů

Společnými znaky obou druhů rypošů je život v podzemí, minimální projevy stárnutí a s ním spojených nemocí a vysoká rezistence vůči nádorové transformaci.

Navzdory tomu jsou rypoši lysí a slepí taxonomicky málo příbuzní. Rypoš lysý spadá do čeledi *Bathyergidae*, rodu

Heterocephalus a je blíže

příbuzný morčeti. Rypoš slepý patří do čeledi

Spalacidae, rodu *Spalax* a

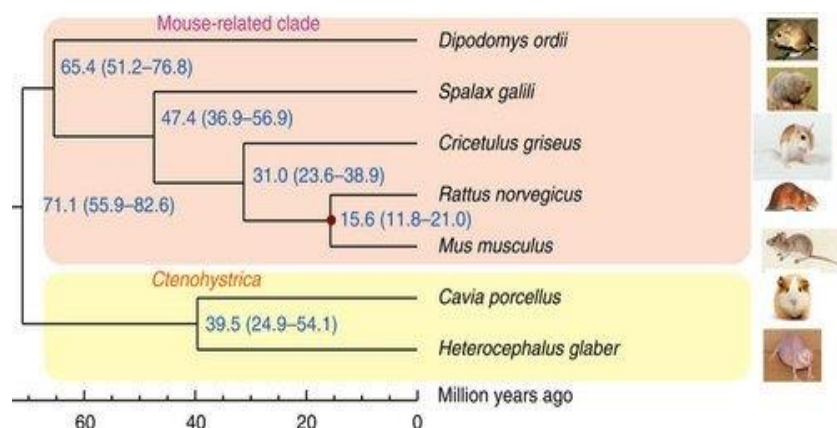
jeho blízkými příbuznými jsou např. myš nebo

potkan. (Du *et al.* 2015)

Vzájemné příbuzenské

vztahy jsou znázorněny

na Obrázku 1.



Obrázek 1 - Fylogenetický strom zobrazující rypoše slepého a rypoše lysého. Modře popsané oddělení jednotlivých větví (milióny let); Převzato a upraveno z Fang *et al.* 2013

Rypoši lysí (*Heterocephalus glaber*; Obr. 2) mají zhruba velikost myši, žijí pod zemí a mají průměrně 35 gramů. Obývají území severovýchodní Afriky (Etiopie, Somálsko, Keňa) a na rozdíl od většiny ostatních podzemních savců žijí ve velkých koloniích (až 300 jedinců). Jsou to eusociální savci. Mají jedinou reprodukcující se „královnu“, zbytek samic se množit nemůže. Pouze několik samců z kolonie, zpravidla 1-3, se s „královnou“ páří. (Jarvis 1981 podle Buffenstein *et al.* 2008) Během chovu v laboratoři bylo zjištěno, že pokud se „královna“ z kolonie odstraní, některá z nereprodukcujících se samic ji nahradí.

Výjimečná dlouhověkost a odolnost rypošů vůči nemocem spojených se senescencí souvisí s dokonalou adaptací na jejich přirozené prostředí. Žijí v absolutní tmě, nízké koncentraci kyslíku a vysoké koncentraci oxidu uhličitého a amoniaku. (Larson *et al.* 2009)

Přestože mají redukované oči, jsou stále citliví na světlo a mají zachované některé geny, které kódují pigmenty. Jsou odolní proti bolesti, zejména vyvolané vysokou koncentrací CO₂. Vážný zájem o biologii rypošů byl v poslední době vyvolán skutečností, že u nich nebyla zaznamenána spontánní ani indukovaná tumorigeneze. Dožívají se až 5x delší doby, než odpovídá jejich tělesné hmotnosti, a jsou bez projevů senescence až do vysokého věku. (Buffenstein *et al.* 2008) Stavba těla a srdce,



Obrázek 2 - *Heterocephalus glaber*, foto: Smithsonian's National Zoo, zdroj: <http://naturewatch.org.nz> (staženo 26. 3. 2016)

struktura kostí a reprodukční potenciál zůstávají u rypoše lysého neměnné prvních 24 let života. (Sanchez *et al.* 2015)

Rypoš lysý je poikilotermní živočich s nízkým bazálním metabolismem. Sám nedokáže kontrolovat svoji tělesnou teplotu, což je u savců velice neobvyklé. K udržení tělesné teploty napomáhá stále klima a vysoká vzdušná vlhkost jejich životního prostředí a také některé jejich návyky (společný odpočinek mnoha jedinců pohromadě). (Buffenstein *et al.* 1991)

Rypoš slepý (*Spalax ehrenbergi*; Obr. 3) je o něco větší než rypoš lysý, hmotnost dospělého samce se pohybuje kolem 150g. Vyskytuje se ve Středomoří a dožívá se zhruba 24 let. Na rozdíl od rypoše lysého je to samotářský živočich, s ostatními jedinci svého druhu se setkává především v době rozmnožování. Rypoš slepý se dělí na několik poddruhů, *Spalax galili*, *S. golani* (jižní druhy) a *S. judaei* a *S. carmeli* (severní druhy). Poddruhy se, mimo jiné, liší v počtu chromosomů (*S. galili* (2n = 52), *S. golani* (2n = 54), *S. carmeli* (2n = 58), *S. judaei* (2n = 60)) a jsou přizpůsobeny na různé podmínky svého přirozeného prostředí. (Nevo *et al.* 2013)



Obrázek 3 - *Spalax ehrenbergi*, foto: Roberto Sindaco, zdroj: <http://naturewatch.org.nz> (staženo 26. 3. 2016)

Studii rypoše slepého je méně, zaměřené jsou nejen na genom a proteom, ale i na morfologické a fyziologické změny spojené s adaptací a způsob života.

V poslední době se studium rypoše slepého

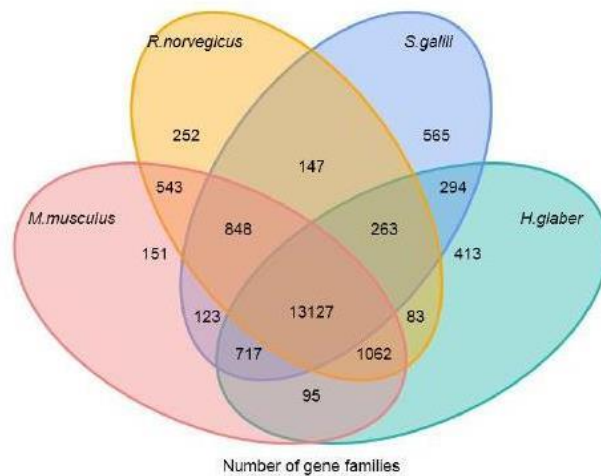
specializuje zejména na jeho dlouhověkost, odolnost vůči karcinogenezi a toleranci hypoxie.

Rypoš slepý má v porovnání se stejně velkými hlodavci objemnější mozek, a to především neokortex s dobře vyvinutým smyslovým vnímáním (např. hmat, čich, vnímání vibrací a magnetického pole), které nahrazuje zrak. Rypoš slepý je fyziologicky přizpůsoben prostředí s nízkou koncentrací O₂ a vysokou koncentrací CO₂. K životu v takovém prostředí je uzpůsoben respirační i kardiovaskulární systém rypoše. (Fang *et al.* 2014a)

Během 40 let pozorování rypošů slepých (včetně jedinců starších 20 let) nebyla zaznamenána spontánní karcinogeneze. Ani při působení karcinogeny, které mělo za následek tvorbu tumorů u 100% myší, nevyvolalo u rypoše slepého rakovinu. (Fang *et al.* 2014a)

2 Genom a transkriptom rypoše lysého a rypoše slepého

Analýzám genomu a transkriptomu rypošů lysých a rypošů slepých je věnováno mnoho studií, které se zaměřují v přední řadě na geny s pozitivní a divergentní selekcí, chybějící geny a geny s unikátní sekvencí u rypošů. Některé změny v jejich genomu a transkriptomu souvisí s resistencí k rakovině, dlouhověkostí nebo s adaptacemi na extrémní podmínky jejich prostředí. Přehled vybraných analýz a některých genů, které odhalily, je uveden v tabulce 1. Obrázek 4 ukazuje počty společných a rozdílných genových rodin rypošů slepých a lysých, myši a potkana podle Fang *et al.* (2014a)



Obrázek 4 – Znárodnění společných a unikátních genových rodin u rypoše slepého, lysého, myši a potkana; Převzato a upraveno z Fang *et al.* (2014a)

Kim *et al.* (2011) sekvenovali genom dospělého samečka rypoše lysého. Odhadují, že genom obsahuje 22 561 genů, které jsou z 95 % transkribovány. U většiny z nich (98%) lze popsat jejich funkci na základě orthologie s geny člověka nebo myši. Počet genů s pozitivní selekcí odhadují na 45.

Fang (2014a) zaznamenali sekvenací genomu dospělé samičky rypoše slepého 22 168 genů s kódující sekvencí a 48 genů pozitivně selektovaných.

Avivi *et al.* (2006) se zaměřuje v přední řadě na reakci rypoše slepého na hypoxii (více v kapitole 3.1), také se podílí na množství dalších studií rypošů, stejně jako Nevo (Avivi *et al.* 2006; Baek *et al.* 2009; Fang *et al.* 2014a; Avivi *et al.* 2010; Nevo 2013; Ashur-Fabian *et al.* 2004)

Yang *et al.* 2015 provedli analýzu genomu rypoše lysého ve srovnání s 11 vybranými savci. Nalezli 66 genů, které chyběly u ostatních savců, a 89 genů, které chyběly pouze u rypoše. Autoři této studie se věnovali genům, které jsou známé svou asociací s různými typy tumorů. Detailněji se touto studií budu zabývat v 4.1

Geny, spojenými s nádorovou resistencí a dlouhověkostí, se zabývají též Keane *et al.* (2014), jak je dále rozebráno v 4.2.

Transkriptom rypoše lysého s orthology člověka, myši a dalšími hlodavci porovnávali Davies *et al.* (2015). Produkty genů, unikátních pro rypoše, měly funkci např. v aktivitě telomerázy, smyslovém vnímání, odpovědi na stres, metabolismu karcinogenů nebo jako tumosupresory.

Tabulka 1: Výběr studií zabývajících se analýzou genomu rypošů

Autor (rok)	Druh rypoše	Hlavní cíle	Geny s neobvyklou expresí / proteiny v neobvyklém množství*	Geny s pozitivní selekcí	Chybějící geny
Brodsky et al. (2005)	rypoš slepý	Porovnání transkriptomu jižních a severních poddruhů	ephrin, neuregulin, Tctex-1 (↑)*	/	/
Avivi et al. (2006)	rypoš slepý	Srovnání transkriptomu za hypoxie a normoxie	<i>sCarp, Atf3, Tnfrsf12a, RhoB</i> (↑)	/	/
Kim et al. (2011)	rypoš lysý	Studium genomu a transkriptomu, zaměření na geny v asociaci s dlouhověkostí	<i>CYP46A1, Smad3</i> (↑)	<i>TEP1, TERF</i>	<i>OPN1L, OPN1MW</i>
Fang et al. (2014)	rypoš slepý	Studium genomu, zaměření na geny v asociaci se stresovým prostředím rypošů	<i>Hk1, Adm, Mif, Ccnd2, Cdk4</i> (↑)	<i>Tnfrsf1a, Tnfsf15, Nfkb1</i>	<i>ANKRD36, NACA2, SERHL2, FGFBP1</i>
Keane et al. (2014)	rypoš lysý	Studium genomu, zaměření na geny v asociaci s dlouhověkostí a rezistencí k rakovině	/	<i>BRCA1, TP53, CD44, HMMR</i>	/
Du et al. (2015)	rypoš slepý, rypoš lysý	Konvergentní evoluce rypošů, porovnání genomu rypoše lysého, slepého, myši a morčete	/	<i>BRCA1, TP53, CD45</i>	/
Yang et al. (2015)	Rypoš lysý	Srovnání genomu rypoše s 11 vybranými savci, zaměření na geny v asociaci s rakovinou	<i>Smad3</i> (↑)	/	<i>Mnda, Dap10, Serpinb10,</i>

Sdílené vlastnosti obou druhů rypoše jsou nepochybně důsledkem adaptace na podobné prostředí. Du et al. (2015) porovnávali genom rypoše lysého, rypoše slepého, myši a morčete. Pozitivně selektované geny (tabulka 1), nalezené u obou druhů rypošů, se podílejí především na tvorbě oběhové soustavy, imunitní reakci a tvorbě epitelu.

Mezi 45 genů nalezených u rypoše lysého s pozitivní selekcí patří gen *TEP1*, který kóduje protein „Telomerase protein component 1“ podílející se na aktivitě telomerázy. Další pozitivně selektovaný gen, souvisejícím s telomerázou, je *TERF1*. Produkt tohoto genu je jedním z proteinů patřící do komplexu shelterinu. Exprese genu *TERT* (telomerase reverse transcriptase), jehož protein je katalytickou podjednotkou telomerázy, se s věkem u rypoše nemění. (Kim et al. 2011)

Myši s vyřazeným genem *TERT* vykazují degenerativní poškození mnohých tkání, včetně mozku. Při reaktivaci telomerázy obnovením funkce genu *TERT* je poškození orgánů redukováno. (Jaskelioff et al. 2011) Zvýšení exprese genu *TERT* u myši (vpravením AAV (adeno-associated virus) exprimujícího *TERF*) má pozitivní vliv na zdraví kostí, metabolismus a fungování mitochondrií. Nejvýznamnějším efektem zvýšené exprese *TERT* je prodloužení života myši (u jednoletých myši 24%, u dvouletých myši o 13%).(Bernardes de Jesus et al. 2012)

Protože u rypoše lysého zůstává exprese genu *TERF* stabilní do vysokého věku, je pravděpodobné, že přispívá k jeho dlouhověkosti. I další změny v sekvenci genů podílejících se na aktivitě telomerázového komplexu a jejich odlišná regulace mohou ovlivňovat regenerační schopnosti rypoše lysého a jeho dlouhověkost. Přestože vliv telomerázy může být významný, studií zabývajících se touto problematikou u rypošů není mnoho a je vyžadován další výzkum.

McRae *et al.* (2015) porovnávali sekvence genů udržujících stabilitu genomu (GM geny, genome maintenance) rypoše lysého, člověka a myši. Očekávali totiž, že odolnost vůči rakovině i pomalejší stárnutí mohou být způsobeny zvýšenou účinností kontroly integrity genomu.

Zjistili, že u rypoše lysého došlo k duplikaci genů *CEBPG* (CCAAT/enhancer binding protein-gama) a *TINF2* (TERF1 interacting nuclear factor; TERF1 - Telomeric Repeat Binding Factor 1 (NIMA-Interacting)) v porovnání s člověkem a myší. Sekvence RNA potvrdila, že jsou exprimovány obě kopie genů. Produkt genu *CEBPG* se podílí na regulaci oprav DNA a produkt genu *TINF2* stabilizuje shelterin, který chrání čepičky telomer a zároveň funguje v signalizaci poškození DNA. (Takai *et al.* 2011) Vyšší počet kopií *CEBPG* by mohl účinněji chránit buňky rypoše před stresem. Naopak, u myši chyběl gen pro protein RPA4. Protein RPA4 (replikační protein A4) je nezbytný pro replikaci a opravu DNA a kontrolu buněčného cyklu, jelikož je podjednotkou replikačního komplexu A. (MacRae *et al.* 2015)

Du *et al.* (2015) zjišťovali, zda lze v genomu rypoše lysého a rypoše slepého odhalit shodné rysy, vyplývající z adaptace na život v podzemí. Zjistili, že frekvence substitučních mutací je u obou podzemních druhů nižší než u jejich nejbližších příbuzných žijících na povrchu. To může být způsobeno jejich dlouhověkostí a delším obdobím reprodukční aktivity. Organismy s kratší generační dobou duplikují své genomy častěji a také k chybám při replikaci dochází s vyšší frekvencí. (Thomas *et al.* 2015) U obou rypošů však byl v porovnání s myší a morčetem výrazně vyšší poměr dN/dS (poměr frekvence nesynonymních a synonymních substitucí). To svědčí o menším vlivu negativní selekce u podzemních druhů. Vysoká hodnota poměru dN/dS je také způsobena velkými rozdíly v hodnotách dS mezi podzemními a povrchovými hlodavci. (Du *et al.* 2015)

Evoluce kódujících sekvencí u podzemních rypošů probíhá pomaleji než u jejich nadzemních příbuzných, což spolu s větší frekvencí nesynonymních mutací může být důsledkem nižšího selekčního tlaku na podzemní živočichy. (Du *et al.* 2015)

Zejména se způsobem reprodukce (eusociální rypoši lysý a damarský) (Fang *et al.* 2014b), nižší frekvencí mutací a možná i s lepší kvalitou DNA reparací souvisí nízký podíl heterozygotních lokusů u všech rypošů, výrazněji u rypošů z čeledi *Bathyergidae*. V důsledku eusociálního způsobu reprodukce je u nich efektivní velikost populace výrazně snížena a zvyšuje se koeficient inbreedingu. (Kim *et al.* 2011)

Tabulka 2: Srovnání výskytu polymorfismů

	Počet		Podíl heterozygotních lokusů (%)	
	SNP x 10 ⁶	Indel x 10 ⁶	SNP	Indel
Rypoš lysý	1,87	/	0,07	/
Rypoš damarský	1,3	/	0,06	/
Rypoš slepý	3,26	0,627	0,11	0,02
Myš	56,7	8,8	/	/
Člověk	84,7	3,6	/	/

Indel = krátké posunové mutace

Data převzata z: Kim *et al.* 2011; Keane *et al.* 2011; Fang *et al.* 2014a,b; Consortium 2015; T. M. Keane *et al.* 2011)

Hodnoty jsou zatíženy chybou způsobenou malým počtem sekvencovaných jedinců

Rypoš damarský a rypoš lysý sdílí několik genů s pozitivní selekcí. Mezi ně patří gen pro rhodopsin (*RHO*), který zlepšuje zrak za horších světelných podmínek. Argináza 1, která katalyzuje poslední krok cyklu močoviny, má u rypoše lysého a rypoše damarského stejnou aminokyselinovou záměnu (His254 nahrazuje Leu/Tyr), která se navíc objevuje i u dalších nepříbuzných podzemních savců (Osmák degu (*Octodon degus*)).

Naopak neaktivní je u obou afrických rypošů, damarského i lysého, gen *FASTK*. *FASTK* kóduje receptorem FAS aktivovanou serin/threonin kinázu, která reguluje apoptózu závislou na receptoru FAS (více v kapitole 3.1). (Fang *et al.* 2014b)

Rypoši lysý, slepý i damarský mají stejnou aminokyselinovou záměnu v sodném kanálu Na(V)1.7. (Fang *et al.* 2014b) Ve vysoce konzervované doméně (doména IV) kanálu je motiv pozitivně nabitých aminokyselin nahrazen negativně nabitými aminokyselinami. (Smith *et al.* 2011)

Zvýšená koncentrace CO₂ evokuje bolest v očích a dýchacím traktu. CO₂ je konvertován na kyselinu, která dráždí receptory bolesti. Kyselina u rypoše lysého nedráždí nocireceptory nervových somatosenzitivních C-vlákien a bolest nevyvolá. K podráždění nedochází ani při nízkém pH, což je pozorováno i u dalších živočichů, kteří jsou přirozeně vystaveni vysoké koncentraci CO₂. (Smith *et al.* 2011)

Kim *et al.* 2011 se zaměřili na studium transkriptomu rypoše lysého, především ve vztahu ke stárnutí a dlouhověkosti. Porovnávali transkriptom 3 vývojových stádií rypoše (novorozený, dospělý a starý jedinec) z ledvin, mozku a jater a sledovali geny, jejichž exprese se měnila v závislosti na věku. Podobná studie byla provedena i u člověka, myši a potkana (Magalhães *et al.* 2009), a proto bylo možné výsledky srovnávat. (Hong *et al.* 2008; Magalhães *et al.* 2009; podle Kim *et al.* 2011)

Mnoho genů, které u člověka míru exprese s věkem mění, jsou u rypoše exprimovány stabilně. Dva z těchto genů, *CYP46A1* a *Smad3*, byly u starého rypoše dokonce exprimované ve vyšší míře, zatímco u člověka se s věkem míra exprese snížila. *CYP46A1* kóduje enzym, který je zodpovědný za homeostázu cholesterolu, jež ovlivňuje tendenci amyloidu β k agregaci. Produkt genu *Smad3* reguluje signalizaci TGFβ (Transforming growth factor β) a zpomaluje buněčnou proliferaci. (Kim *et al.* 2011)

3 Specifické znaky rypošů

3.1 Adaptace na hypoxii

Rypoši slepí i lysí snázejí velmi nízké koncentrace kyslíku. Rypoš slepý žije v prostředí se zhruba 7,2% kyslíku. (Avivi *et al.* 2006) V nejhlubších částech podzemních systémů rypoše lysého se koncentrace kyslíku pohybuje kolem 8%. (Zhao *et al.* 2014) Většina organismů není schopna se s dlouhodobou hypoxií vyrovnat.

Cílem následující kapitoly je objasnit, jak adaptace rypošů na chronickou hypoxii ovlivňuje jejich dlouhověkost i regulaci proliferace a vznik nádorů. Brodsky *et al.* (2005), Avivi *et al.* (2006), Kim *et al.* (2011) a Malik *et al.* (2012) popsali množství genů, jejichž exprese je za hypoxie u rypošů odlišná od jiných savců. Produkty těchto genů se podílejí především na regulaci tumorogeneze, angiogeneze, apoptózy vyvolané hypoxií i energetickém metabolismu.

Nádorové buňky masivnějších tumorů jsou vystavené hypoxii a také u nich za hypoxie dochází ke změně exprese mnoha genů, jak ukázali Lendahl *et al.* (2009). Ve své studii vystavili buňky rakoviny tlustého střeva (HCT116) akutní a chronické hypoxii. Při akutní hypoxii došlo jen k malým změnám v regulaci několika genů odpovědi na stres, ale při chronické hypoxii byla změněna exprese více než 4 000 genů. U některých markerových genů rakoviny tlustého střeva došlo ke snížení exprese, zatímco u genu *HES1* (enhancer of split 1) došlo naopak ke zvýšení. Tento gen se podílí na zastavení diferenciaci buněk. (Lendahl *et al.* 2009) Jak je popsáno dále, některé regulační faktory jsou společně jak pro reakci na hypoxii, tak pro modulaci tumorogeneze.

Ve vztahu k hypoxii je zajímavá unikátní substituce v genu pro HIF1 α (hypoxia inducible factor-1), T407I, která zasahuje do vazebné domény pro VHL a ovlivňuje tak ubiquitin dependentní degradaci HIF1 α za normoxických podmínek. U rypoše je degradace HIF1 α redukována kvůli mutaci v genu VHL v oblasti genu odpovídající aktivnímu centru. (Kim *et al.* 2011)

HIF proteiny jsou nejnámějšími modulatory odpovědi na hypoxii a ovlivňují expresi mnoha genů. Některé cílové geny HIF faktorů mají vliv na senescenci. (Welford, Giaccia 2011) HIF1 α funguje, mimo jiné, jako modulatory stárnutí. Klimova *et al.* (2009) sledovali vliv ROS na senescenci fibroblastů plicní tkáně člověka. Buňky s deficiencí HIF1 α vykazovaly senescentní fenotyp i za normoxie. Při hypoxii (2% O₂) tyto buňky umíraly ve výrazně větším množství. Při expresi HIF1 α bylo stárnutí fibroblastů signifikantně zpžděné. (Welford *et al.* 2006)

HIF faktory také hrají roli v tumorogenezi. HIF1 α vyvolává odpověď, která tlumí proliferaci buněk, zatímco HIF2 α nádorové buňky v růstu podporuje. (Welford, Giaccia 2011) HIF α 2 je v rakovinných buňkách exprimován ve větší míře. HIF α blokuje degradaci p53 indukovanou proteinem Mdm2 (Mouse double minute 2 homolog), stabilizuje p53 a podporuje transkripci jeho cílových genů. (Chen *et al.* 2003)

Adaptací na hypoxii se ale zabývají v přední řadě studie rypoše slepého. (Brodsky *et al.* 2005; Avivi *et al.* 2006) Je zde možné navíc sledovat rozdíly v adaptaci dvou podruhů, rypoše severního *S. galili* a

rypoše jižního, *S. judaei*. Rypoš severní snáší lépe velmi nízké koncentrace kyslíku, které jsou pro jižní poddruh letální.

Avivi *et al.* (2006) srovnávali transkriptomy z příčně pruhované svaloviny dospělých jedinců obou poddruhů rypoše slepého při normoxii (21 % O₂) a extrémní hypoxii (3% O₂). Expres 380 genů se lišila mezi jižními a severními poddruhy. Největší rozdíly mezi oběma poddruhy byly v expresi genů, které se účastní odpovědi na stres způsobený hypoxií a také u genů ovlivňujících angiogenezi a apoptózu. (Avivi *et al.* 2006) Ke shodné změně genové exprese indukované hypoxií došlo u 193 genů. Druhově specifická odpověď na hypoxii byla zjištěna u 73 genů („interakční geny“).

Geny s největším rozdílem v intenzitě genové exprese za hypoxických a normoxických podmínek u obou poddruhů rypoše slepého jsou uvedeny v Tabulce 3. Geny s největšími rozdíly v expresi mezi severními a jižními poddruhy rypoše slepého jsou shrnuty v Tabulce 4.

Tabulka 3: Geny s největším rozdílem v expresi za hypoxie

Symbol genu	Název genu	Funkce	Poměr exprese hypoxie/normoxie
<i>sCarp</i>	„ankyrin repeat domain 1“ (sCarp)	stimuluje angiogenezi	19,6
<i>Arrdc3</i>	„arrestin domain containing 3“	adaptace na hypoxii	7,24
<i>Rhob</i>	„Ras homolog gene family, member B“	stimuluje angiogenezi	4,08
<i>Pdk3</i>	„pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 3“	adaptace na hypoxii	3,94
<i>Foxo1</i>	„forkhead box O1“	v angiogenezi	3,11
<i>Mt2</i>	„metallothionein 2“	adaptace na hypoxii	3,08

Převzato a upraveno z Avivi *et al.* 2006

Tabulka 4: Geny s největším rozdílem v expresi za hypoxie u poddruhů rypoše slepého

Symbol genu	Název genu	Poměr exprese hypoxie/normoxie	
		<i>S. galili</i>	<i>S. judaei</i>
<i>sCarp</i>	„ <i>Spalax</i> ankyrin repeat domain 1“	38,24	1,04
<i>Atf3</i>	„activating transcription factor 3“	4,37	1,38
<i>Tnfrsf12a</i>	„tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a“	2,87	0,93

Převzato a upraveno z Avivi *et al.* 2006

Významné bylo hlavně zvýšené množství proteinů sCarp a Atf3.

sCarp patří do konzervované genové rodiny „muscular ankyrin repeat proteins“ a je exprimován ve vysokém množství v srdečních a kosterních svalech dospělých jedinců a také při srdeční hypertrofii. (Aihara *et al.* 2000) U myši a krysy bylo pozorováno značné zvýšení hladiny *Carp* (proteinu i transkriptu) během hojení zraněné pokožky v blízkosti místa poškození. *Carp* v okolí poškozené tkáně indukuje tvorbu nových cév a hojení napomáhá. (Shi *et al.* 2005)

Zdá se, že *Carp* hraje roli i v apoptóze, jeho přesná funkce ale není k tomuto datu plně odhalena. Han *et al.* (2005) ve své studii popsali snížení apoptózy indukované hypoxií pomocí *Carp* v tkáňové kultuře potkana H9c2 odvozené ze srdeční svaloviny. Novější studie (Shen *et al.* 2015) naopak uvádí, že u hlodavců zvýšená míra exprese *Carp* podporuje apoptózu kardiomyocytů.

Produkce *Atf3* podporuje přežívání buněk při hypoxii, u *S. galili* je hladina transkriptu genu *Atf3* více než 4x zvýšená. (Avivi *et al.* 2006) *Atf3* interaguje s *p53* a zabraňuje jeho ubiquitinaci, čímž zvyšuje hladinu *p53* v buňce.

Hypoxie indukuje zvýšenou produkci interferonů a jejich regulátorů. Gen pro interferon $\beta 1$ je u rypoše slepého duplikován, u rypoše lysého nikoliv. Fang *et al.* (2014a) předpokládají, že si rypoš slepý vyvinul kompenzační mechanismus obrany proti tumorogenezi, založený na aktivaci interferonové odpovědi (TRAIN). (Fang *et al.* 2014a)

Při hypoxii dojde u *S. galili* k trojnásobnému zvýšení exprese *Tnfrsf12a* kódujícího receptor pro TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis, patří mezi tumor necrosis faktory). *Tnfrsf12a* spouští angiogenezi a dělení endoteliálních buněk. (Avivi *et al.* 2006)

Malik *et al.* (2012) sledovali vliv extrémní hypoxie (3% a 6% O_2) a mírné hypoxie (10% O_2) na změny transkriptomu v mozku a svalech rypoše slepého. Výsledky analýzy srovnali s transkriptomem potkana vystaveného 6% O_2 , což je nejnižší koncentrace kyslíku, tolerovaná tímto druhem. Autoři zjistili řadu změn v genové expresi rypoše a potkana.

V kontrastu s předchozími výsledky, Malik *et al.* (2012) zjistili, že u rypoše slepého dochází při hypoxii ke zvýšení exprese genů kódujících supresory angiogeneze a tumorogeneze. Exprese genu *Tsp1* (thrombospondin), byla při hypoxii (6% O_2) zvýšena až 19x oproti normoxii. *Tsp1* interaguje s mnoha receptory pro adhezi buněk a také s proteázami fungujícími při angiogenezi. Tím inhibuje angiogenezi i tumorogenezi. Dalším příkladem je 13x vyšší exprese genu *Rcan1* (regulator of calcineurin neboli *Dscr1*, Down syndrome critical region 1), jehož zvýšená exprese podmiňuje rezistenci k tumorogenezi typickou pro pacienty s Downovým syndromem. (Baek *et al.* 2009) Exprese ani jednoho z genů (*Tsp1*, *Rcan1*) nebyla za hypoxie zvýšena u potkana. (Malik *et al.* 2012)

K redukci apoptózy endoteliálních buněk u rypoše slepého přispívá zvýšená exprese genu *Foxo3A* (inhibitor apoptózy vyvolané $HIF1\alpha$ při hypoxii) a naopak snížená exprese proapoptického genu *G0s2* (G0 /G1 switch). Stejnému trendu odpovídá i exprese genu pro *Vegf* (vascular epithelial growth factor), která se ve svalech rypoše na rozdíl od jiných savců za hypoxie nezvýšila. Pouze v mozku byl exprimován ve vyšší míře. Protein *Vegf* stimuluje rozvoj cévní sítě. Indukce apoptózy je redukována i kvůli nefunkčnímu proteinu *p53*, kterému se budu věnovat v 4.2.

Ke specifickým změnám v genové expresi i fyziologii dochází při hypoxii v mozku rypoše. Za běžných podmínek hematoencefalická bariéra udržuje homeostázu mozkových buněk. Při hypoxii dochází ke

zvýšení propustnosti bariéry a otoku mozku. U rypoše slepého jsou ve větší míře exprimovány geny pro kontraktilní vláknité proteiny, Abcc9 a Kcnj8, které patří mezi markery pericytů, a mohou přispívat k homeostázi mozku rypoše při chronické hypoxii. Podobně jako ve svalectech je změněna exprese mnoha genů ovlivňujících angiogenezi. (Malik *et al.* 2012)

Ačkoliv hypoxie vyvolává apoptózu pomocí zvýšené exprese HIF1 α , tento proces je ve svalových buňkách i mozku rypoše lysého silně redukován zvýšenou expresí genů kódujících angiogenní inhibitory a tumorsupresorové proteiny.

Fang *et al.* (2014b) popsali u afrických rypošů ztrátu funkce genu *FASTK*. Tento gen stimuluje apoptózu při hypoxii. Gen *FASTK* kóduje Fas-aktivovanou serin/threonin kinázu (FASTK), která fosforylací aktivuje TIA-1 (T-cell intracellular antigen 1). Společně tyto 2 proteiny ovlivňují sestřih mRNA pro receptor FAS ve prospěch delší formy obsahující 6. exon, který kóduje transmembránovou doménu proapoptického FAS-receptoru. Pokud je FASTK neaktivní, vzniká pouze transkript FAS bez 6. exonu, který má anti-apoptickou funkci. (Izquierdo a Valcárcel 2007)

Gen pro FAS-receptor je jedním z cílů proteinu p53. Hypoxie indukuje apoptózu zprostředkovanou receptorem FAS jen u buněk s funkčním p53. Liu *et al.* (2006) ukázali, že při blokaci receptoru FAS jsou buňky za hypoxie k apoptóze resistantní.

Gen *FASTK*, resp. *FASTKD2* (Fas-activated serine/threonine kinase domains 2) je exprimován ve zvýšené míře u nádorových buněk, např. v buňkách rakoviny prsu. Jeho inhibice redukuje růst nádoru. (Das *et al.* 2014; Zhi *et al.* 2013) Naopak, u pacientů s Alzheimerovou a Parkinsonovou chorobou je exprimován méně. (Sekar *et al.* 2015)

Neaktivní gen *FASTK* u rypoše lysého redukuje apoptickou odpověď při hypoxii a zřejmě přispívá i k odolnosti vůči tumorogenezi.

Pro úspěšné přizpůsobení hypoxickému prostředí je nutné dostatečné zásobení tkání kyslíkem, což zajišťují globiny. V této souvislosti je exprese globinů sledována především v mozku, který je nedostatkem kyslíku nejvíce ohrožen. Schelshorn *et al.* (2009) zjistili, že zvýšená exprese hemoglobinu indukovaná erythropoetinem za hypoxie má neuroprotektivní účinky.

Hemoglobin u rypoše lysého má v pozici 44 zaměněný prolin za histidin (Fang *et al.* 2014b) a jeho afinita ke kyslíku je vyšší, než je obvyklé. (Johansen 1976 podle Fang *et al.* 2014b) Geny pro hemoglobin a neuroglobin jsou za normoxie v mozku rypoše lysého exprimované ve zvýšené míře. Při hypoxii se exprese globinů v mozku rypoše lysého již nezvýší, ale v porovnání s krysou je stále vyšší. (Fang *et al.* 2014b)

Rypoše slepý má standardní gen pro hemoglobin. U *Spalax galili*, poddruhu s nejvyšší odolností k hypoxii, se při hypoxii také nemění exprese genu pro neuroglobin, na rozdíl od ostatních poddruhů. Hypoxie indukuje v mozku a srdeční svalovině výrazné zvýšení exprese genu pro cytoglobin. (Avivi *et al.* 2010)

Rozdíly v expresi genů pro globiny u obou rypošů i změna v sekvenci hemoglobinu u rypoše lysého naznačují, že jde o adaptace na podzemní prostředí, které jsou pro přežití rypošů důležité. Plné porozumění problematice ovšem vyžaduje další výzkum. (Fang *et al.* 2014b)

3.2 Rypoši lysí a oxidativní stres

Oxidativní stres je dnes uznáván jako jedna z hlavních příčin senescence. Jako první tuto hypotézu představil D. Harman v roce 1956. (Harman 2002) Oxidativní poškození je způsobeno vytvářením ROS (reactive oxygen species) během aerobních metabolických dějů v mitochondriích. ROS, kam patří hydroxylové radikály, peroxid vodíku a superoxidový anion, poškozují makromolekuly v buňce, jako jsou DNA, proteiny a lipidy. (Lewis *et al.* 2013)

Velmi náchylné k oxidaci jsou thiolové skupiny v postranním řetězci cysteinů. Dochází jak k reversibilním změnám (vznik S-S můstků, vznik kyseliny sulfenové), tak ke změnám ireversibilním (sulfinové a sulfonové kyseliny). Cysteiny bývají často v aktivním nebo regulačním místě proteinu, a proto jejich poškození může způsobit změnu enzymové aktivity. (Pérez *et al.* 2009)

Míru poškození proteinů lze proto kvantifikovat pozorováním oxidace cysteinu. Přestože se rypoš dlouhodobě nachází v hypoxickém prostředí, byl v jaterní tkáni mladého rypoše lysého nalezen vyšší podíl disulfidických můstků než u myši odpovídajícího fyziologického věku. Tento podíl se však u rypoše v průběhu stárnutí nemění, zatímco u myši ano. Stejný trend byl pozorován u hladin kyselin sulfenové, sulfinové a sulfonové. (Pérez *et al.* 2009)

Buňky rypoše lysého tolerují oxidativní poškození dvou referenčních proteinů, triosafosfát-isomerázy (TPI) a cytozolického peredoxinu 2, mnohem déle než jiné živočišné druhy. (Andziak *et al.* 2006; De Waal *et al.* 2013) TPI má významnou roli v glykolýze, kde přeměňuje dihydroxyaceton fosfát na glyceraldehyd-3-fosfát. Zvláštní je, že u rypoše lysého byla jeho aktivita až o 42% větší (další zdroj De Waal *et al.* 2013 uvádí 30%) než u myši, přestože u rypoše bylo oxidativní poškození proteinu o 50% větší. (Andziak *et al.* 2006) Klíčové aminokyseliny (cytosin nebo lysin) v aktivním místě enzymu jsou pravděpodobně chráněny před karbonylací, nebo má oxidace naopak pozitivní vliv na aktivitu. V druhém případě by k oxidaci muselo docházet mimo aktivní centrum enzymu. K poškození vyvolanému ROS je obzvláště citlivý β -aktin, jehož cysteinový zbytek je snadno oxidovatelný. U rypoše lysého je tento cysteinový zbytek nahrazen serinem. Serin je více resistantní k oxidaci a pravděpodobně napomáhá k vysoké toleranci vůči oxidativnímu stresu. (Fang *et al.* 2014b)

Karbonylace proteinů, způsobená ROS, je u rypoše lysého velmi nízká v jádru a endoplasmatickém retikulu. Vysoká ochrana těchto kompartmentů může bránit poškození důležitých proteinů a vzniku mutací. (Lewis *et al.* 2013) Karbonylované proteiny vznikají štěpením peptidických vazeb pomocí α -amidace, oxidací glutamylových skupin nebo postranních řetězců lyzinu, argininu, prolinu a threoninu. (Yuan *et al.* 1981 podle Andziak *et al.* 2006)

Reakce ROS s polynenasycenými kyselinami, například v membránových lipidech, vede k řetězové reakci, při které vznikají lipidové hydroperoxydy. Ty jsou obratem konvertovány na množství α,β -nenasycených aldehydů (jako je 4-hydroxynon-2-enal), které se mohou kovalentně vázat na postranní řetězce proteinů. (Zimniak *et al.* 2008) Čím je větší podíl nenasycených mastných kyselin, tím je větší riziko oxidace. Oxidací lipidů se zvyšuje fluidita a také plasticita membrán a může docházet k uvolnění membránových proteinů. (Shi *et al.* 2010)

V moči rypoše lysého byla až 10x vyšší koncentrace isoprostanů (signalizují poškození lipidů) než u myši, přestože se poškození lipidů nelišilo. Autoři rozdíl vysvětlili zvýšenou hladinou nenasycených mastných kyselin (n6-PUFAs - polyunsaturated fatty acids – např. kyselina arachidonová), které jsou zdrojem isoprostanů. (Andziak *et al.* 2006)

Membrány rypoše lysého obsahují menší množství n3-PUFA (DHA - docosahexaenoic acid, k. all-cis-dokosa-4,7,10,13,16,19-hexoenová) než myš, navíc je na jeho membránových fosfolipidech navázáno velké množství etherů. Tyto fosfolipidy se nazývají plasmogeny a jsou náchylnější ke štěpení způsobenému oxidací, než běžné acyl-glycerol fosfolipidy. Etherová vazba, citlivá k oxidaci, může být přednostně oxidována, čímž zabrání oxidaci lipidů vedoucí k řetězové reakci. (Lewis *et al.* 2013)

Nejvýznamnější je poškození DNA. K oxidaci je nejcitlivější cytosin, jehož oxidace je ireversibilní. Poškození a zastavení replikace DNA přispívá ke stárnutí buněk i celého organismu. (Lewis *et al.* 2013)

Míra poškození DNA u rypoše lysého byla sledována měřením hladiny 8-hydroxy-2-deoxyguanosinu (8-OHdG), což je hlavní stabilní produkt oxidace DNA. Poškození cytosinu je sice častější, ale u obratlovců je účinně rozpoznáváno a opravováno. V moči dvouletého rypoše lysého bylo naměřeno menší množství 8-OHdG než u dvouleté myši. Poškození mitochondriální DNA z ledvin bylo ale 2x vyšší, jaderné DNA z jater až 8x vyšší. Vyšší míra poškození ovšem může být způsobena experimentálními podmínkami. Koncentrace kyslíku za experimentálních podmínek byla okolo 21%, přičemž rypoš žije v podmínkách s koncentrací menší než 15%. Největší poškození bylo v tkáních plic a metabolicky aktivních orgánů. (Andziak *et al.* 2006)

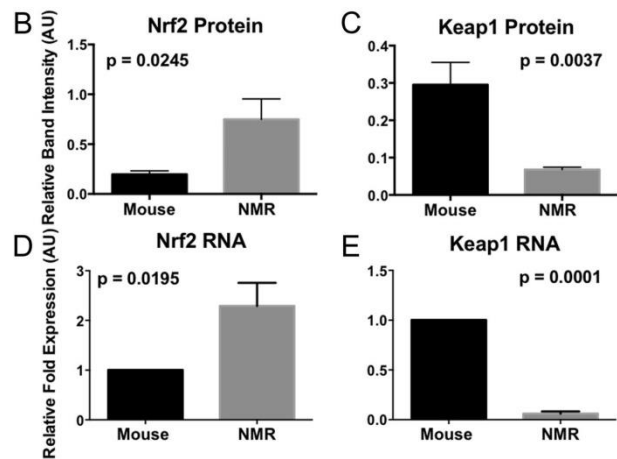
Pro správnou funkci ROS je nezbytná regulace jejich hladiny v buňce. (Salminen *et al.* 2013) Hladina ROS v buňce je snižována pomocí antioxidantů, které je neutralizují. Jediný enzym, který se podílí na odstraňování ROS a u kterého byla u rypoše vyšší aktivita než u myši, je cytosolická glutathion-S-transferáza (GST). Zvýšení množství a aktivity GST přispívá k účinnější obraně proti ROS. (Lewis *et al.* 2013)

Ke schopnosti rypoše lysého snášet velké oxidativní poškození s velkou pravděpodobností také přispívá protein Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor-2). Nrf2 je transkripční faktor, který ovlivňuje expresi genů, jejichž produkty hrají roli v buněčném růstu, detoxifikaci nebo imunitní odpovědi. Svým působením tedy spouští obranné mechanismy, které mohou prodloužit život buňky. Astrocyty myši s vyřazeným genem pro Nrf2 jsou citlivější k oxidativnímu poškození než buňky s genem funkčním. (Lee *et al.* 2003)

Rypoš lysý má v jaterní tkáni až 5x vyšší množství Nrf2 než fyziologicky odpovídající myš. Transkript tohoto proteinu byl v játrech rypoše přítomen ve 2,5x vyšší míře v porovnání s myši. Také množství Nrf2 navázaného na ARE element (antioxidant response element) byla u rypoše o 50% vyšší než myši. Jedním z jeho cílů je i glutathion-S-transferáza, která je u rypoše přítomna ve vyšším množství a s vyšší aktivitou. (Lewis *et al.* 2015)

Při porovnání 10 druhů hlodavců byla nalezena korelace mezi aktivitou proteinu Nrf2 a délkou jejich života. Expresí genů kódujících negativní regulátory jako Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) nebo β -TrCP (β -Transducin Repeat-Containing Protein) korelovala s délkou života naopak negativně. Rypoš lysý měl v jaterní tkáni až 3x nižší hladinu Keap1 ve srovnání s myší. Zajímavé také je, že i rypoš slepý měl zvýšenou aktivitu Nrf2 jako rypoš lysý. (Lewis *et al.* 2015)

Vysoká míra oxidativního poškození je již u mláďat rypošů lysých, ale na rozdíl od myši ale rypoš lysý nevykazuje akumulaci oxidovaných proteinů během života. (Andziak *et al.* 2006) Míra oxidativního stresu u rypošů lysých tedy nekoreluje s jejich dlouhověkostí. Klíčové není samo poškození, ale efektivita obrany proti němu, stejně jako tolerance vysoké míry poškození. (Pickering *et al.* 2015)



Obrázek 5 – Porovnání celkového množství Nrf2 a Keap1 u rypoše lysého a myši; Převzato a upraveno z Lewis *et al.* (2015)

3.3 Zajištění proteostáze u rypoše lysého

Neobvykle dlouhý život rypoše lysého je, mimo jiné, podmíněn zajištěním proteostáze (homeostáze proteinů), neboť nahromaděním defektních proteinů by došlo k cytotoxicitě a smrti buněk. Proteostáze zahrnuje degradaci nebo opravu špatně sbalených a poškozených proteinů. Na udržování proteostáze se podílí ubiquitin/proteasomální systém (UPS), autofágie a heat shock proteiny (HSP; chaperony a chaperoniny). (Pride *et al.* 2015)

U rypoše lysého nedochází ke zvyšování hladiny ubiquitovaných proteinů s věkem, což klade vysoké nároky na rychlé odstraňování nesprávně sbalených a oxidovaných proteinů. Aktivita proteazomu je u rypoše lysého až 8x vyšší než u myši. (Pickering *et al.* 2015)

Navíc jsou proteiny rypoše vůči poruchám sbalování velmi odolné. (Lewis *et al.* 2013) Při působení močovinou (až do maximální koncentrace 3M) na proteiny rypoše došlo pouze k zanedbatelnému poškození. Denaturace vyvolaná působením močoviny způsobí odhalení hydrofobních kapes proteinů, které mohou být označeny fluorescenční sondou BisANS (4_-dianilino-1,1_-binaphthyl-5,5_-disulfonic acid). Pomocí ní lze kvantifikovat množství poškozených proteinů. (Pérez *et al.* 2009)

Analýza PDQuest proteomu 4 skupin rypoše lysého (mladí (2-3 roky), středně staří (4-6 let), staří (7-12 let) a nejstarší (15-24 let)) odhalila několik proteinů, které se účastní proteostatické dráhy a jejichž hladina se mění během stárnutí. U dvou proteinů byly pozorovány signifikantní změny se stoupajícím věkem. Těmito dvěma proteiny jsou UBE2v2 (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant2, synonymum MMS2 Methyl Methanesulfonate Sensitive) a UBE1 (ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1). Protein UBE1 byl přítomen v mozku skupiny starších rypošů ve větší míře v porovnání se

skupinou mladých jedinců. (Triplett *et al.* 2015a) Tento protein se kromě prvního kroku polyubikvitinace podílí i na opravách dvojřetězcových zlomů DNA, což je považováno za prevenci nemocí spojených se senescencí. Ubikvitinace proteinů indukovaná UBE1 je závislá na aktivitě p53 a BRCA1. (Moudry *et al.* 2012) UBE1 je zodpovědný i za aktivaci nedylace při oxidativním stresu, teplotním šoku nebo při inhibici 26S proteazomu. (Leidecker *et al.* 2012)

Protein UBE2v2 měl nejvyšší hladinu u skupiny středně starých rypošů. (Triplett *et al.* 2015a) Kromě účasti při reparaci DNA ovlivňuje postup buněčného cyklu, diferenciaci a odolnost buněk vůči mutagenům. Při jeho inhibici u myši dochází ke stárnutí cév, naopak zvýšená aktivita přispívá k ochraně neuronů diferenciaci neuronů v raném embryonálním vývoji. Navzdory svému jménu nemá konjugující aktivitu, ale podílí se na selekci substrátu pro ubiquitinaci. (Triplett *et al.* 2015a; Mogi *et al.* 2006; Min *et al.* 2008; van Wijk *et al.* 2010)

Imunodetekcí byl identifikován výrazný vzrůst UCH (ubiquitine-carboxyl-terminal hydrolase) v mozku jedinců z nejstarší skupiny rypošů. (Triplett *et al.* 2015a) Tento protein má deubikvitinační aktivitu, štěpí polyubikvitinové řetězce a tvoří monomery ubiquitinu. (Choi *et al.* 2004) Při poruše jeho aktivity se hromadí plaky amyloidu- β a rozvíjí se Alzheimerova porucha. Celkové množství UCH je v mozku pacientů s Parkinsonovou chorobou a Alzheimerovou chorobou snižené. (Choi *et al.* 2004)

V mozku rypoše lysého ale k hromadění plaků amyloidu- β nedochází, u jedinců ve věku 2 až 26 let je počet ubiquitinovaných proteinů stabilní a při věku nad 26 let (nejstarší skupina) se zvyšuje hladina UCH. Mozkový lysát skupin starých rypošů vykazoval silnou proteazomální aktivitu. Ta byla spojena se sníženou fosforylací PS β 1 (Human Pregnancy Specific β 1), který odpovídá za PGPH (peptidyl glutamyl-peptide hydrolyzin) aktivitu (štěpení vazeb za acidickými aminokyselinami). Jeho fosforylace se snižovala s věkem, byla snižena u středně starých a nejstarších jedinců. Méně fosforylovaný PS β 1 zvyšuje anti-apoptickou aktivitu PAI2 (plasminogen activator inhibitor 2). (Triplett *et al.* 2015a)

Buňky rypoše jsou výrazně odolnější vůči inhibitorům proteazomu než myší buňky. Rezistence je závislá na přítomnosti proteinů HSP72 a HSP40 v cytosolu buněk rypoše. Bylo potvrzeno, že v přítomnosti cytosolu rypoše získávají rezistenci vůči inhibitorům i buňky kvasinek, myši nebo člověka. (Rodriguez *et al.* 2014)

Ve srovnávací studii (Pride *et al.* 2015) bylo zjištěno, že u dlouhověkých živočichů je intenzita autofagie vyšší než u podobných živočichů s kratší dobou života. Ta byla u rypoše lysého až 8x vyšší než u myši.

V buňkách kůže, plic, ledvin a jater rypoše lysého je větší množství autofagozómů, než bylo pozorováno u myši. Závěry z mikroskopického pozorování byly potvrzeny sledováním množství LC3-II, který se používá jako marker pro autofagozóm. Jednodenní rypoš vykazoval více LC3-II než stejně stará myš. (Zhao *et al.* 2014)

3.4 Nízký bazální metabolismus prodlužuje život

Rypoši lysí i slepí se živí kořeny, cibulkami a hlízkami, které naleznou ve svých podzemních systémech a jejich bazální metabolismus je velmi nízký. Rypoš lysý má zhruba 75% hodnotu BMR stejně velkého živočicha s kratší dobou dožití. (Sanchez *et al.* 2015)

Studiu metabolických drah rypoše lysého se věnovali Triplett *et al.* (2015b). Data byla získána elektroforetickou analýzou mozkové tkáně 4 skupin jedinců ve věku od 2 do 24 let (mladí, středně staří, staří a nejstarší). Nalezli 13 proteinů, které vykazovaly rozdíl v expresi nebo stupni fosforylace v porovnání s myši u nejméně jedné skupiny.

Mezi tyto proteiny patří pyruvát kináza, jejíž hladina v mozku hlodavců zpravidla klesá se stoupajícím věkem. U rypoše lysého byl pozorován opačný trend, nejvyšší hladina pyruvát kinázy byla zaznamenána u nejstarších jedinců. I u skupiny středně starých jedinců byla specifická izoforma pyruvát kináza M ve zvýšené míře v porovnání se skupinou mladých jedinců. Navíc byla pyruvát kináza M fosforylovaná ve snížené míře, což má za následek zvýšení její aktivity. Zvýšení hladiny zmíněných pyruvát kináz by mohlo pomáhat v udržení dostatečného množství energie, nutného k zachování důležitých buněčných funkcí ve stárnoucím organismu. (Triplett *et al.* 2015b)

Dalším významným proteinem, jehož množství se v mozku rypoše s věkem zvyšuje, je cytosolická acyl-CoA thioester hydroláza (také „brain“ acyl-koenzym A hydroláza – BACH). BACH štěpí acyl-CoA na mastné kyseliny a koenzym A (CoA-SH). Tyto produkty jsou dále využívány v mnoha procesech. Zvýšení koncentrace BACH způsobuje zlepšení stability membrán a zvyšuje integritu buňky. BACH se podílí i na regulaci β -oxidace mastných kyselin a energetického metabolismu. Nejvyšší aktivitu BACH zjistili u starých jedinců rypošů, u nejstarších byla její aktivita nižší. (Triplett *et al.* 2015b)

Glukóza-6-fosfát izomeráza byla přítomná ve větším množství již u mladých jedinců. S věkem nestoupá její množství, ale dochází ke snížení fosforylace, což podporuje její aktivitu. V mozku rypoše má tento enzym pravděpodobně neuroprotektivní účinek. (Triplett *et al.* 2015b)

Další dva glykolytické enzymy s důležitou rolí v senescenci jsou ALDO (fruktóza-bisfosfát aldoláza) a ENO1 (α -enoláza). Na rozdíl od mozkových buněk pacientů s Alzheimerovou chorobou, kde je ALDO výrazně fosforylován, je u rypoše míra jeho fosforylace významně snížena. Tento fakt by mohl poukazovat na to, že ALDO snižuje agregaci amyloidu β do plaků a hladinu proteinu tau. ENO1 je při oxidativním stresu modifikován a u některých degenerativních poruch se mění jeho hladina. U Alzheimerovy choroby je jeho fosforylace 2,5x častější. Skupina nejstarších rypošů má ENO1 o 68% méně fosforylovaný než nejmladší rypoši. (Triplett *et al.* 2015b)

Protein tau je asociovaný s mikrotubuly, reguluje jejich nukleaci a polymerizaci, polaritu i celkovou dynamiku. Nefunkčnost tau či snížení jeho aktivity vyvolané zvýšenou fosforylací se vyskytují u mnoha patologií, včetně Alzheimerovy choroby. Protože jde o stochastický jev, riziko roste se zvyšujícím se věkem. U rypoše lysého se exprese genu pro protein tau v mozku s věkem snižuje. Nejvyšší hladina fosforylovaného i nefosforylovaného tau byla u rypošů mladších než 6 měsíců. Přesto je exprese genu pro tau v mozku dospělého rypoše až 4x vyšší než u myši odpovídajícího chronologického věku s patologií způsobenou nesprávnou funkcí tau. Hyperfosforylovaný tau byl u

myši transportován z axonů, kde je potřebný. U rypoše k této delokalizaci nedochází ani při nejvyšší koncentraci proteinu. (Orr *et al.* 2015)

Amyloid β , rovněž spojený s Alzheimerovou chorobou, je v mozku rypoše lysého přítomen v mnohem větší míře než u myši. V mozku rypoše ovšem nedochází k tvorbě plaků amyloidu β ani ke zvýšení jeho hladiny s věkem. Amyloid β má u rypoše i u myši menší tendenci ke shlukování než lidský protein. Protein z mozku rypoše se od lidského liší v jedné aminokyselině, od proteinu myši a potkana ve dvou. Při vystavení myších hipokampálních neuronů amyloidu β rypoše a člověka dojde ke stejné reakci – 18% buněk zemře. Z toho vyplývá, že nehledě na rozdíly v primární struktuře, amyloid β z rypoše působí na buňky myši toxicky. (Edrey *et al.* 2013)

U rypoše lysého je toxicita amyloidu β potlačována. V mozku rypoše byla nalezena vysoká hladina proteinu Neuregulin-1 (NRG-1), který má neuroprotektivní účinky a pravděpodobně snižuje toxicitu amyloidu β . Ve studii byla sledována jeho hladina v mozku rypoše lysého ve srovnání s dalšími hlodavci, včetně rypoše slepého. (Edrey *et al.* 2012)

Tabulka 5: Množství neuregulinu-1 v mozkové tkáni hlodavců

Druh	Průměrná hmotnost (g)	Průměrná hmotnost mozku (g)	Maximální délka života (roky)	Neuregulin -1 (a.u.)
Rypoš slepý (<i>Spalax carmeli</i>)	130	1,7	19	1,17
Rypoš slepý (<i>Spalax judaei</i>)	100	1,4	19	0,87
Rypoš lysý (<i>Heterocephalus glaber</i>)	40	0,4	32	1,63
Myš domácí (<i>Mus musculus</i>)	30	0,4	3,5	0,84
Morče domácí (<i>Cavia porcellus</i>)	970	3,1	12	1

a.u. – arbitrary units (arbitrární jednotky); Převzato a upraveno z Edrey *et al.* 2012

U skupiny starých rypošů lysých byla nejvyšší hladina proteinu MDH1 (malát dehydrogenáza 1) v porovnání s ostatními skupinami rypošů. Tento protein je nezbytný pro přenos $\text{NADH} + \text{H}^+$ z cytosolu do mitochondrií k následné oxidaci. Snížená fosforylace proteinu pozitivně ovlivňuje syntézu ATP. Ve snížené míře byla MDH1 fosforylována u nejstarších jedinců rypoše. (Triplett *et al.* 2015b) V lidských kožních fibroblastech starších jedinců je ve srovnání s mladými 2x méně MDH1. Kultura mladých fibroblastů člověka s delecí obou alel pro MDH1 proliferovala výrazně méně ve srovnání s kontrolou. Zároveň došlo ke zvýšení exprese genů pro tumorsupresorové proteiny p16 a p21. Pokud je MDH1 neaktivní, nedochází k tvorbě NAD^+ a dojde k senescenci buněk. Rozdílná hladina a míra fosforylace proteinu MDH1 u starších jedinců rypoše napomáhá udržovat dostatečné množství energie i v pokročilém věku. (Lee *et al.* 2012)

Ke zvýšení aktivity enzymů MDH a ENO1, které se podílejí na produkci ATP, došlo za kalorické restriktce v mozkové tkáni krysy. Kalorická restriktce způsobuje sníženou oxidaci těchto proteinů a zároveň podporuje produkci neuroprotektivních molekul. (Poon *et al.* 2006)

Autoři studie (Blackwell *et al.* 1995) sledovali vliv kalorické restrikce na stárnutí u myši. Kalorická restrikce prodloužila život myši v průměru o 18%, výskyt tumorů se u těchto myši snížil více než o 20%. Kalorická restrikce má vliv i na jiné savce, včetně primátů, jak potvrdila studie u makaků. (Colman *et al.* 2014)

Signální dráha IIS (Insulin/Insulin-like growth factor-1 signal pathway) a GH (growth hormone) signální dráha mají pluripotentní účinky na úrovni buněk i celého organismu. U rypoše byly nalezeny substituce tyrozinů v receptoru pro růstový hormon (GHR), které jsou u jiných živočichů konzervované a jsou pravděpodobně klíčové pro další přenos signálu. (Derr *et al.* 2011 podle Sanchez *et al.* 2015) Jejich záměna u rypoše může způsobovat sníženou signalizaci zprostředkovanou GHR. GH a jeho receptory svým působením ovlivňují expresi IGF (Insulin – Like Growth Factor). (Sanchez *et al.* 2015) Signální dráha IGF zahrnuje ligandy, receptory, IGF vazebné proteiny a jejich proteázy.

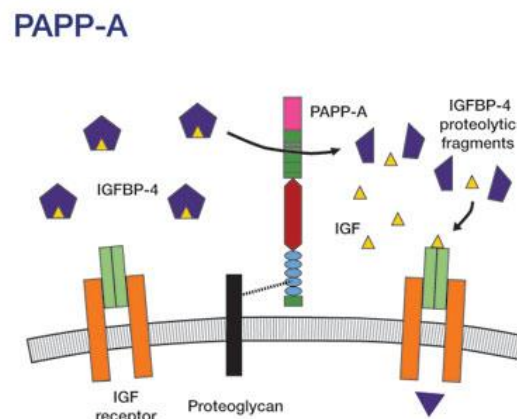
Volné IGF aktivují transmembránové receptory IGF-R. Jejich dostupnost je ovlivněna hladinou vazebných proteinů pro IGF (IGF BP). Množství IGF BP je redukováno proteázami, specifickými pro IGF BP.

Rypoši produkují velmi malé množství inzulínu a IGF2, a proto reagují velmi pomalu na vysokou koncentraci glukózy. Vzhledem ke způsobu jejich života se přirozeně s vysokou koncentrací glukózy nesetkávají. (Kramer, Buffenstein 2004)

Snížená aktivace signální dráhy IIS přispívá k prodloužení délky života, jak bylo potvrzeno nejdříve u *Caenorhabditis elegans* (Kimura *et al.* 1997), posléze u *Drosophila melanogaster* (Tatar *et al.* 2001), myši (Russell, Kahn 2007) a člověka. Snížená signalizace byla typická pro jedince starší než 100 let. (Suh *et al.* 2008) U PAPP-A (pregnancy-associated plasma protein-A, obr. 6), který je proteázou pro IGFBP 4 a 5, byl prokázán výrazný negativní efekt na délku života u myši. Jedinci s neaktivním enzymem žili o 30-40% déle než nemutované myši a měli vyšší odolnost vůči rakovině. (Conover *et al.* 2010)

U rypoše lysého je v mozku méně IGF receptorů než u jiných hlodavců. Azpurua *et al.* (2013) srovnávali hladinu IGF1R v srdci, plicích, ledvinách a mozku u 16 druhů hlodavců, kteří se výrazně lišili délkou života i velikostí těla, včetně rypoše lysého. Autoři zjistili, že pouze u vzorků z mozku vykazuje hladina IGF1R negativní korelaci s maximální délkou života. To je v souladu s dřívějším zjištěním, že nervová soustava ovlivňuje délku života jedince prostřednictvím IGF signalizace. (Kappeler *et al.* 2008)

Brohus *et al.* (2015) se pokusili vysvětlit rozdíl v IGF signalizaci mezi rypoši a ostatními sledovanými savci v primární sekvenci zúčastněných proteinů: IGF, IGF-R i IGFBP a PAPP-A. Všechny proteiny vykazují vysoký stupeň homologie, což odpovídá esenciálnímu charakteru signální dráhy.



Obrázek 6 - Staženo (13 .4. 2016) z : www.mayoclinic.org/medical-professionals/clinical-updates/endocrinology/pregnancy-associated-plasma-protein-a-new-anti-aging-target

V proteinu PAPP-A byly nalezeny 2 nesynonymní substituce, které však pravděpodobně neovlivňují aktivitu enzymu. Autoři zjistili, že hladina PAPP-A mRNA v kožních fibroblastech rypoše je nezávislá na přidání růstových faktorů a není ovlivněna ani rapamycinem. To je v rozporu se známou regulací PAPP-A u člověka. Narozdíl od PAPP-A, exprese genů kódujících IGF-BP byla zvýšená v přítomnosti IL1 β . (Brohus *et al.* 2015)

Hlavním rozdílem mezi rypošem lysým a ostatními hlodavci je v množství receptorů pro IGF. (Azpurua *et al.* 2013)

BLAST analýza proteinových sekvencí IGF člověka, rypoše lysého a myši ukázala, že IGF-2 rypoše je 100% identický s lidským a IGF-1 identický z 98,6%. IGF-1 rypoše se od lidského liší v jedné aminokyselině, alanin v poloze 67 u lidského IGF-1 je u rypoše nahrazen prolinem. (Brohus *et al.* 2015)

Ve vazebných proteinech IGF-BPs jsou již větší rozdíly, hlavně v N-koncových a C-koncových oblastech. Funkční vazebné domény jsou ale konzervované. Také u těchto proteinů se uplatňují posttranslační modifikace, nalezené pouze u myši a rypoše. (Brohus *et al.* 2015)

S přibývajícím věkem klesají hodnoty PAPP-A, IGF1 i IGFB3, IGFB5 a IGFB6 v plicích, zatímco IGF2 se zvyšuje v ledvinách i plicích rypoše lysého. Odlišné posttranskripční a posttranslační úpravy se pravděpodobně podílejí na dlouhověkosti rypoše. (Brohus *et al.* 2015)

4 Rezistence k nádorové transformaci

Nádorová transformace se stárnutím úzce souvisí. S přibývajícím věkem se akumulují chyby v organismu a zvyšuje se riziko tumorogeneze. Mimo to v senescentních buňkách dochází k mnoha změnám, hromadně označovaných jako „senescence-associated secretory phenotype“ (SASP). Tyto procesy mají zabránit nádorové transformaci a podpořit regeneraci tkáně. Proteiny podílející se na SASP regulují buněčný cyklus a mohou ho zastavit, aby nedocházelo k proliferaci senescentních buněk. Některé z proteinů SASP (Vegf) mohou ale paradoxně způsobit maligní transformaci (např. v prostředí vyhovujícím rakovinným buňkám). (Campisi *et al.* 2011; Campisi 2013)

Je pravděpodobné, že některé proteiny SASP jsou u rypošů pozměněné a jimi zprostředkovaná odpověď je modulovaná. V této kapitole jsou posány nejvýznamější změny v genomu a proteomu rypošů slepého a lysého, které se na rezistenci vůči nádorové transformaci podílejí.

4.1 Změny v genech rypošů spojených s nádorovou transformací

Rypoš lysý ztratil několik genů (kapitola 2 tabulka 1, Yang *et al.* 2015), které jsou ve zvýšené míře exprimovány u různých typů tumorů. Mezi chybějící geny patří geny *Mnda*, *Dap10*, *Serpinb10*. *Mnda*

(The myeloid cell nuclear differentiation antigen) je exprimován ve vysokém množství v lymfomech (Cousar 1990 podle Yang *et al.* 2015). *Dap10* (DNAX-activation protein 10) je vysoce exprimován při leukemii z velkých granulárních lymfocytů, proto i geny závislé na jeho aktivaci mají stabilně vysokou expresi. (Chen *et al.* 2009) *Serp1b10* (Serp1 Peptidase Inhibitor, Clade B) je exprimován ve zvýšeném množství v tumorech plic. (van Gent *et al.* 2003)

Protoonkogeny *Ctnnb1* a *Rad51*, jejichž mutace je přítomna u nádorů močového měchýře (*Ctnnb1*) a tlustého střeva (*Rad51*), mají u rypoše lysého substituce. Avšak u rypoše nádorovou transformaci nezpůsobují a autoři proto předpokládají, že mutace přispívají k rezistenci vůči tumorogenezi. Protoonkogen *Hras1* (tumory psru) u rypoše lysého zcela chybí. (Yang *et al.* 2015)

Substituční mutace byly u rypoše lysého nalezeny v genech MAP kinázové signální dráhy (mitogen-activated protein kinases) a Wnt (Wingless/Int-1) signální dráhy. (Yang *et al.* 2013; Yang *et al.* 2015) Jedním z proteinů s aminokyselinovou záměnou je SMAD3, kde je zaměněna kyselina asparagová v pozici 138 za kyselinu glutamovou a serin v pozici 141 za threonin. SMAD3 se účastní signálních drah v tumorech žaludku a tlustého střeva. Gen *Smad3* je v mozku rypoše lysého exprimován ve vysoké míře a mohl by u něj podporovat rychlost apoptózy. Protein Ctbp2 má v pozici 126 zaměněn izoleucin za threonin. Tento protein reguluje produkci tumorsupresorového proteinu p16 regulací exprese lokusu *INK4* a mohl by mít podíl na časnou kontaktní inhibici rypoše lysého, zprostředkovanou p16 (více v kapitole 4.3). (Yang *et al.* 2015)

Fang *et al.* (2014a) identifikovali několik genů v neobvykle vysokém počtu kopií u rypoše lysého i rypoše slepého. Tumorsupresorový gen *CYLD* je u rypoše lysého v 15 kopiích, zatímco u myši, potkana i rypoše slepého pouze v 1 kopii. Proapoptický gen *FEM1B* je duplikován u obou rypošů (u slepého ve 2 kopiích, u lysého v 5 kopiích), stejně jako gen *MX1*, účastníci se interferonové odpovědi (u rypoše slepého 7 a u rypoše lysého 6 kopií).

4.2 p53 u rypoše slepého a lysého

Produkty genu *tp53* se podílí na apoptóze a zastavení buněčného cyklu. Tímto způsobem hraje významnou roli v supresi nádorů. Protein p53 a jeho homology p63 a p73 mají kromě potlačování tumorogeneze i další funkce. Mimo jiné působí i jako transkripční faktory genů, jejichž transkripty se podílejí na opravě DNA. (Pagano *et al.* 2013) Substituce v těchto genech byly pozorovány v mnoha typech lidských tumorů (40-50% (Ashur-Fabian *et al.* 2004)). p53 je složen z C-terminální regulační domény, transaktivační domény, tetramerizační domény a centrální vazebné domény. Meziidruhově nejvíce konzervovaná je centrální vazebná doména. (Pagano *et al.* 2013)

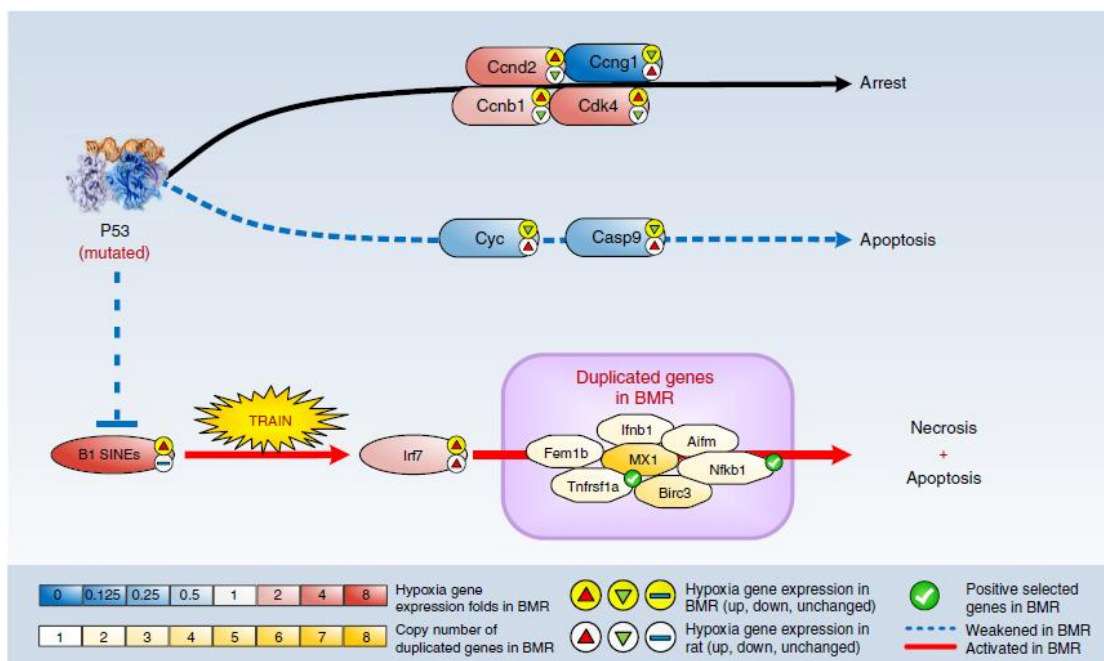
p53 je jeden z hlavních tumor-supresorových genů, který má pod kontrolou odpověď buněk na mnoho typů stresu (např. poškození DNA, zvýšená proliferace buněk a také hypoxie) vedoucí k zastavení buněčného cyklu a apoptóze. V proteinu p53 u rypoše slepého došlo k náhradě argininu za lysin v pozici 174 v DNA vazebné doméně. Tato substituce se vyskytuje v nádorových buňkách u některých známých typů nádorů a způsobuje zvýhodnění nádorových buněk za hypoxických

podmínek. U rypoše vede k neschopnosti p53 aktivovat promotor genu *FAS* (*apaf1*) a indukovat jeho expresi. Produkty tohoto genu jsou klíčové ve dráze indukující apoptózu. (Ashur-Fabian *et al.* 2004)

Při kultivaci fibroblastů rypoše je po krátké proliferaci (7-20 buněčných cyklů) zahájena produkce interferonu- β , která indukuje nekrózu. Pomocí průtokové cytometrie bylo ověřeno, že nekróza je u rypoše slepého majoritním mechanismem smrti buněk (46% buněk nekróza, 28% buněk apoptóza). Aby k nekróze došlo, musí být inaktivované obě dráhy hlavních tumorsupresorů p53 a Rb (retinoblastoma protein). Interferonu- β se akumuluje v buňkách starších jedinců, nejvyšší hladiny dosahuje těsně před nekrózou. (Gorbunova *et al.* 2012)

Vyvstala zde otázka, zda umírající buňky, které produkují interferon- β , dokáží způsobit smrt mladých buněk rypoše slepého nebo lidských a myších buněk. Staré fibroblasty rypoše slepého byly přidány ke kulturám buněk lidských nebo myších. U myších buněk došlo k apoptóze a na lidské buňky to nemělo žádný efekt. U buněk pocházejících z mladého jedince rypoše slepého došlo k masivní nekróze buněk. Nekróza namísto apoptózy může být výhodná v tom, že dojde k likvidaci jak buněk rozpoznaných jako potenciálně rakovinné, tak buněk v jejich okolí. Tento mechanismus se tedy zdá být efektivnější. Preference nekrotické smrti je pravděpodobně následkem substituce v p53 u rypoše slepého. (Gorbunova *et al.* 2012)

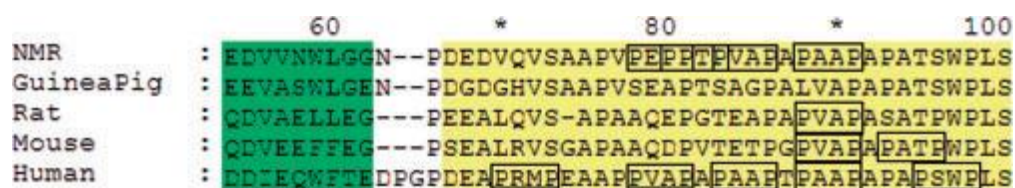
Běžně vede aktivace p53 k zastavení buněčného cyku nebo apoptóze a negativní regulaci B1 SINE elementů. U rypoše slepého jsou ale signální dráhy vedoucí k apoptóze a regulaci B1 SINE oslabené a namísto nich je přednostně aktivována nekróza, jak je schématicky znázorněno na obrázku 7.



Obrázek 7 – Schéma odlišné regulace pomocí mutovaného p53 u rypoše slepého ; Převzato z Fang *et al.* (2014b)

Rypoš lysý zmíněnou substitucí v p53 nemá, nicméně gen *TP53* je u něj pozitivně selektovaný (kapitola 2). Prolinová doména (proline-rich domain) proteinu p53 rypoše lysého obsahuje 4 PXXP motivy (Keane *et al.* 2014, obr. 8), na rozdíl od myši (2 motivy), potkana (1 motiv) a člověka (5 motivů). (Toledo *et al.* 2007)

U člověka je prolinová doména důležitá pro transkripci proapoptických genů. (Venot *et al.* 1998), u myši efekt delece není výrazný. (Edwards *et al.* 2003)



Obrázek 8 – Část sekvence p53 rypoše lysého, morčete, potkana, myši a člověka; Převzato z Keane *et al.* (2014)

4 motivy PXXP (P= prolin, X= jakákoliv aminokyselina), 3 překrývající se motivy – PEPP, PPTP, PVAP a jeden následující PAAP

4.3 Časná kontaktní inhibice u rypoše lysého:

U rypoše lysého je vyvinut odlišný mechanismus pro obranu proti rakovině a tím je časná kontaktní inhibice (Early Contact Inhibition – ECI). Poprvé ji popsali Seluanov *et al.* (2009). Buňky rypoše lysého jsou velmi citlivé na vzájemný kontakt, při vyšší hustotě dojde k inhibici proliferace. U rypoše slepého k ECI nedochází, jak ukázala analýza fibroblastů z tkáně plic a kůže. (Gorbunova *et al.* 2012)

Časná inhibice buněčného dělení je u rypoše závislá na hyaluronanu s vysokou molekulární hmotností (HMM-HA (6-12 MDa)). HA myši nebo morčete má molekulární hmotnost mnohem nižší (0,5 - 3 MDa), stejně tak i člověk (0,5 - 2 MDa). Kůže rypoše lysého je díky hyaluronanu volná a elastická, což usnadňuje průchod podzemními chodbami. (Tian *et al.* 2013)

Produkce hyaluronanu ve velkém množství i vyšší Mw, původně zjištěná v tkáňové kultuře, byla potvrzena i v různých orgánech rypoše lysého. (Tian *et al.* 2013)

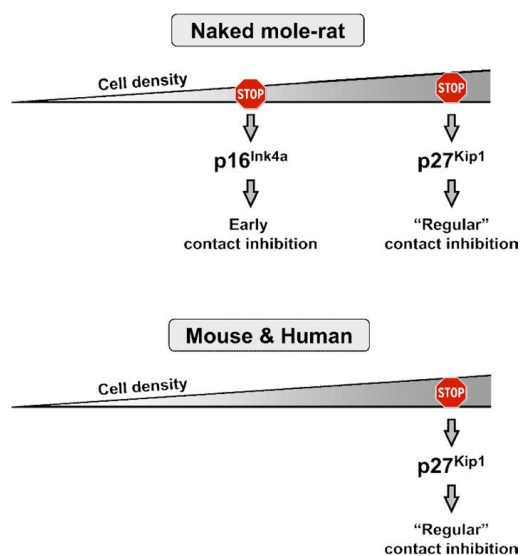
Při dlouhodobé kultivaci buněk rypoše lysého vznikl 1 klon, označený jako SF Mut, který ECI nepodléhal a dosáhl denzity myších buněk. (Seluanov *et al.* 2009) Mutované fibroblasty (SF Mut) přesto HMM-HA stále produkují. Z toho vyplývá, že ECI není závislá pouze na HMM-HA. Tento mutant netvoří tumorsupresorový protein p16 lze proto předpokládat, že se protein p16 účastní procesu ECI. (Tian *et al.* 2013)

Avšak pokud k buňkám rypoše lysého přidáme bakteriální hyaluronidázu, enzym zodpovědný za degradaci HA, buňky schopnost ECI ztratí. Běžně jsou tyto enzymy u rypoše méně aktivní, naopak enzymy syntetizující HA, HA syntázy (HAS1, HAS2, HAS3), jsou u něj aktivní více, zejména HAS2. HAS2 rypoše má unikátní strukturu, 2 asparaginy, které jsou u ostatních druhů 100% konzervované, jsou u rypoše nahrazeny seriny. Tian *et al.* (2013) prokázali, že exprese genu HAS2 z rypoše v lidských buňkách vede k produkci HMM-HA. Substituce u HAS2 způsobuje lepší procesivitu enzymu. Při deleci genu pro HAS2 nebo při zvýšení aktivity hyaluronidázy se zvýší proliferace a může dojít k rozvoji tumoru. (Tian *et al.* 2013)

Hyaluronan se u myši i člověka váže na receptor CD44. Při inaktivaci receptoru, např. pomocí protilátky anti-CD44, se hustota buněk rýpoše zvýší a buňky tvoří kolonie. Gen pro tento receptor, ale také gen pro další hyaluronový receptor (RHAMM), vykazují u rýpoše lysého též pozitivní selekci ($K_A/K_S = 1$). S receptorem CD44 je na intracelulární straně membrány spojen protein NF2 (merlin), který stimuluje kontaktní inhibici. Fosforylovaná forma proteinu NF2 se spolu s hyaluronidázou nachází v rostoucích buňkách, nefosforylovaná forma NF2 se nachází v buňkách bez hyaluronidázy a růst inhibuje. Pomocí průtokové cytometrie bylo zjištěno, že buňky rýpoše mají až 2x vyšší afinitu k HA než buňky myši nebo člověka. (Tian *et al.* 2013) To by opět mohlo posilovat rezistenci ke vzniku nádorů.

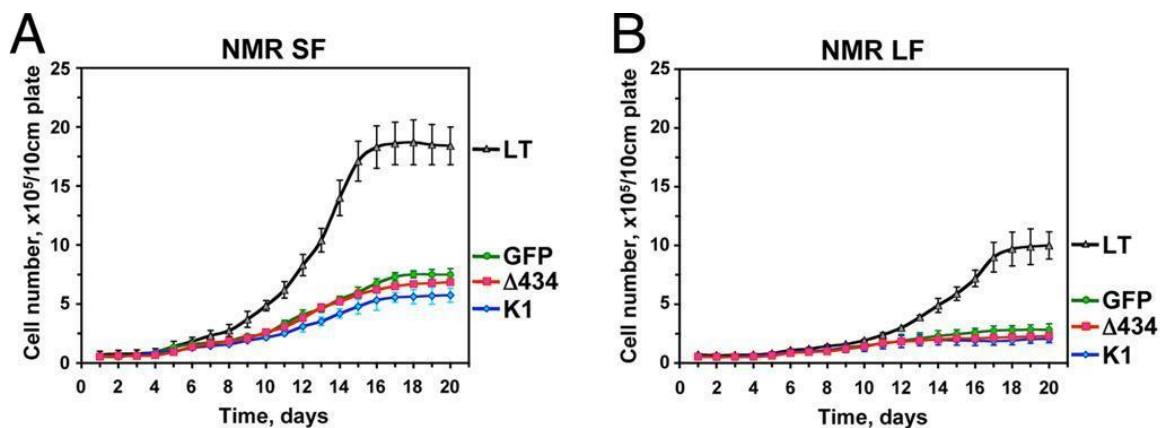
Ve vazbě s CD44 je i receptor LRP-1 (low-density lipoprotein receptor-related protein), který tlumí adhezivitu buněk. (Blacker *et al.* 1998) Při blokaci LRP-1 v nádorových buňkách dojde ke dvojnásobnému zvýšení jejich adhezivity, což je následkem nárůstu množství receptorů CD44 na membráně. LRP-1 dependentní endocytóza zajišťuje odstraňování receptorů CD44 z membrány. (Perrot *et al.* 2012)

Setuanov *et al.* (2009) pomocí transformace kožních a plicních fibroblastů plazmidy s intaktním genem pro SV40 LT (funkční gen inhibuje aktivitu p53, Rb a částečně protein fosfatázu A2) nebo s jeho mutovanými variantami, které inhibují pouze p53 nebo pouze Rb, zjistili, že k inhibici ECI dochází jen v případě, že jsou inaktivovány oba hlavní tumorsupresorové proteiny p53 a Rb. K zastavení buněčného cyklu a zástavě proliferace dochází u rýpoše při zvýšené hladině p16 a p27, což jsou inhibitory cyklin dependentních kináz. Tato regulace probíhá na dvou úrovních. Při časně kontaktní inhibici se zvýší hladina p16 a zároveň se sníží fosforylace Rb. p27 indukuje zastavení buněčného cyklu v kultuře, která dosáhla vysoké hustoty buněk. Hladina p27 je výrazně vyšší v kultuře myších nebo lidských fibroblastů než v kultuře fibroblastů rýpoše lysého. Jeho hladina se výrazně zvyšuje u SF Mut. (Seluanov *et al.* 2009) Funkce p16 v časně kontaktní inhibici je pro rýpoše specifická, u člověka i myši ke kontaktní inhibici dochází pouze pomocí p27. (Kim *et al.* 2011)



Obrázek 9 – Porovnání kontaktní inhibice a jejích mediátorů u rýpoše lysého, člověka a myši; Převzato ze Seluanov *et al.* 2009

Úspěšnost transformace fibroblastů rýpoše pomocí H-Ras V12 (onkogenní alela navozující ztrátu kontaktní inhibice) a SV40 LT se zvýší, je-li narušena interakce mezi HMM-HA a CD44. Vznik velkých kolonií z fibroblastů rýpoše lysého lze vyvolat přidáním hyaluronidázy nebo zablokováním receptoru CD44. (Tian *et al.* 2013) Transformace fibroblastů byla úspěšná i při inhibici Rb signalizace spolu s inhibicí interakce HMM-HA –CD44 při zachování funkce p53. Dosud není známo, jakým způsobem extracelulární HMM-HA indukuje produkci p16, přímý vliv signalizace HMM-HA—CD44-NF2 nebyl zjištěn. (Fisher *et al.* 2015)



Obrázek 10 – Proliferace (A) fibroblastů z kůže (NMR SF) a (B) fibroblastů z plic (NMR LF) rypošé lysého. Po transfekci fibroblastů genem pro SV40LT, který inhibuje oba tumorsupresory p53 i Rb, došlo ke zvýšení proliferace. Mutované varianty genu SV40LT (varianta K1 (LTK1) inhibuje pouze p53, varianta $\Delta 434$ (LT $\Delta 434$) inhibuje pouze Rb) neměly na proliferaci buněk vliv, úroveň proliferace se shoduje s negativní kontrolou, fibroblasty s genem GFP (green fluorescent protein); NMR SF (naked mole rat skin fibroblast); NMR LF (naked mole rat lung fibroblast); Převzato ze Seluanov *et al.* 2009

Tumorsupresorový protein p16 je produktem lokusu INK4a/b, u člověka označovaného jako INK4a/ARF/INK4b. (Kim, Sharpless, 2006) Některé nádory u člověka jsou spojeny s jeho delecí nebo umlčením. Produkty lokusu INK4a/ARF/INK4b jsou tumor-supresory p16, p15 a p14, u myši p19. Tyto supresory se účastní drah RB a p53 (Tian *et al.* 2015), podílejí se na udržení integrity genomu, zároveň snižují proliferaci buněk, regenerační schopnost tkání a mají vliv na stárnutí buněk. Míra exprese lokusu INK4a/b se u člověka zvyšuje s věkem. (Szklarczyk *et al.* 2007) Delece tohoto lokusu má stejný efekt jako inaktivace tumorsupresorů Rb a p53. Zvýšená míra exprese tohoto lokusu u myši způsobuje zvýšenou odolnost vůči rakovině, avšak nezpůsobuje urychlení procesu stárnutí. (Matheu *et al.* 2004) Zajímavé také je, že změny v tomto lokusu u lidí byly pozorovány u některých chorob spojených se stárnutím (diabetes 2. typu, aneurisma aorty, ischemická choroba srdeční). (Sherr 2012)

Matheu *et al.* (2004) sledovali vliv zvýšení a snížení aktivity lokusu INK4. Myši s neaktivním lokusem měly výrazně zvýšený výskyt tumorů než myši s aktivním lokusem. U transgenní myši se třemi alelami lokusu INK4 došlo k tumorigenezi jen v 22%, zatímco u WT myši v 60%.

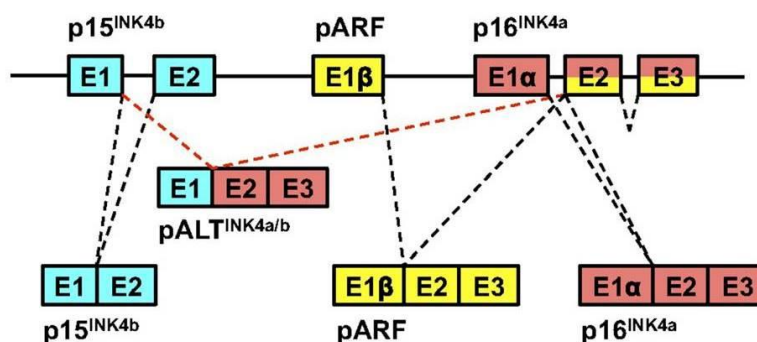
INK4a/b u rypošé lysého je malý genový lokus (25kbp). Jak je patrné na obrázku 11, protein p15 je kódován odděleně z oblasti INK4b. Proteiny p16 a pARF sdílejí exony 2 a 3, které jsou součástí oblasti INK4a, liší se však v 1. exonu. Sestřih transkriptu pro protein pARF propojuje 1. exon s exony 2 a 3 v odlišném čtecím rámci, než je tomu při sestřihu transkriptu pro protein p16. Výsledkem jsou proteiny se zcela odlišnou sekvencí aminokyselin a také odlišnou funkcí. Naproti tomu, proteiny p15 a p16 jsou homologické (u člověka 85 % shoda na úrovni AK) a rovněž mají podobnou funkci. Jsou to inhibitory cyklin dependentních kináz CDK4 a CDK6, společně s p18 (produkt INK4c) a p19 (produkt INK4d). Vazba p15 nebo p16 na tyto kinázy indukuje jejich alosterickou inhibici. Zabraňuje jejich aktivaci cyklinem D, následně tím stabilizuje Rb v aktivním, hypofosforylovaném stavu a oddálí vstup do S-fáze buněčného cyklu. (Kim, Sharpless 2006)

Protein ARF, působí jako antagonist Mdm2, E3 ubiquitin ligázy, která snižuje hladinu p53 v klidovém stavu. Protein ARF je aktivován při zvýšené proliferaci, kdy indukuje zvýšení hladiny p53. pARF u myši také snižuje biogenezi ribozomů a proliferaci negativní regulací RNA helikázy DDX5 (DEAD-box protein 5). Inhibicí DDX5 pARF navíc redukuje transkripční aktivitu onkoproteinu *c-myc*. (Tago *et al.* 2005) pARF indukuje i degradaci HIF1 α . (Pollice *et al.* 2008) Naopak, delece genu pro HIF1 α zvyšuje expresi INK4a. (Zhang *et al.* 2012)

Specifickým produktem lokusu INK4a/b u rypše lysého je pALT. Je aktivován za stejných stresových podmínek jako p15 nebo p16, ale dokáže inhibovat proliferaci u většího počtu buněk. Tvoří se v době ECI. Hladina proteinů p15, p16 a pALT se zvyšuje při ozařování buněk UV nebo gama zářením nebo při zvýšení hladiny onkoproteinů. Bylo zjištěno, že hyaluronidáza má negativní vliv na produkci p15 a pALT. (Tian *et al.* 2015) Sekvence pALT není známá. Posílení tumorsupresorových proteinů o pALT společně se specifickou funkcí p16 v ECI a produkce HMM-HA společně přispívají k velmi silné rezistenci vůči nádorové transformaci u rypše lysého.

U mutantních buněk NSF2, u kterých došlo k inhibici exprese genů lokusu INK4a/b, dochází při poškození DNA k apoptóze se zvýšenou intenzitou ve srovnání s nemutovanými buňkami. Pokud se u NSF2 buněk zajistí produkce proteinů p16 nebo pALT, intenzita apoptózy se sníží. (Tian *et al.* 2015)

Který gen z lokusu INK4a/ARF/INK4b nejúčinněji potlačuje vznik nádorů u člověka, je složité určit. Nádorová transformace je často spojena s delecí celého lokusu nebo s methylačním umlčením genů pro p15 i p16. U mnoha nádorů byla nalezena mutace poškozující funkci p16 (Forbes *et al.* 2006), nádory s inaktivací pouze p15 nebo pARF jsou mnohem vzácnější.



Obrázek 11 – Struktura INK4a/b lokusu rypše lysého a princip vzniku proteinů, p15, pARF, p16 a pALT.; převzato a upraveno z Tian *et al.* (2015)

S p53 interaguje tumorsupresorový protein BRCA1. Gen kódující tento protein u rypše lysého také vykazuje výraznou pozitivní selekci, zejména interakční doména s p53 (oblast 224-500). Její část (oblast 430-470) obsahuje nejvíce substitučních změn, hodnota poměru KA/Ks je mimořádně vysoká (KA/Ks =10). Fyziologický důsledek těchto změn nebyl dosud popsán.

Protein BRCA1 pomocí fyzické interakce s p53 6-8 x zvyšuje u myši transkripci genů *p21* a *BAX*. (Somasundaram *et al.* 1997; Zhang *et al.* 1998)

Navíc, p53 podporuje transport BRCA1 z jádra do cytoplazmy, kde BRCA1 při poškození DNA vyvolává apoptickou odpověď. (Jiang *et al.* 2011) Mutace v BRCA1 je přítomna v 50% dědičných tumorů prsu u člověka. (Zhang *et al.* 1998)

4.4 Proteiny ovlivňující odolnost proti nádorové transformaci

Jeden z nejvíce zastoupených proteinů v krvi je α -2-makroglobulin (A2M). Jeho hladina v krvi rypše lysého je 140x vyšší než v krvi myši. Hladina mRNA pro A2M v játrech rypše lysého byla až 14x vyšší než u myši. (Yu *et al.* 2011) U člověka klesá hladina A2M s věkem, čímž se redukuje jeho pozitivní vliv na homeostázi v krvi.

Strukturně se A2M rypše a člověka podobá, ale A2M rypše má navíc dvě N-glykosylovaná místa, která způsobují jeho vyšší molekulární hmotnost. A2M má schopnost vázat mnoho molekul (např. cytokininy, růstové faktory a hormony) a také navázat a inhibovat některé proteázy. Při navázání ligandu (např. methylaminu) na A2M a působením trypsinu nebo jiné proteinázy se změní jeho konformace a odhalí se vazebné místo pro receptor LRP-1, dříve zmíněný v souvislosti s receptorem CD44. Pomocí tohoto receptoru jsou komplexy s A2M z krve odstraňovány. Typickým příkladem je Vegf (vascular endothelial growth factor) a TGF- β 1 (Transforming growth factor beta 1), které jsou přítomny u tumorů ve zvýšeném množství. A2M schopný interakce s LRP1 se označuje jako transformovaný A2M. (Thieme *et al.* 2015)

V roce 2010 Lindner *et al.* prokázali, že A2M inhibuje signální dráhu Wnt/ β -katenin v nádorových buňkách. Signální dráha Wnt/ β -katenin podporuje některé děje nutné pro tumorigenezi. Aktivace Wnt signální dráhy vyžaduje tvorbu komplexů mezi ligandy Wnt a dalšími komponenty (receptory FZD, koreceptory LRP5/6, proteiny Dishevelled (Dvl) a Axin), což ve výsledku způsobí inaktivaci kinázy GSK3 (glycogen synthase kinase-3 β) a translokaci nefosforylovaného β -kateninu z cytoplazmy do jádra. V jádře se β -katenin váže na transkripční faktory TCF (T-cell factor)/LEF (lymphoid enhancer factor) a aktivuje transkripci genů *myc*, *cyclin D1*, *c-jun*, *Axin*, *MMPS* (Matrix metalloproteinases), které svými produkty stimulují růst nádoru. (Lindner *et al.* 2010)

Při inaktivaci Wnt, např. prostřednictvím A2M, je β -katenin fosforylován, následně ubiquitylován a degradován. Cytoplazmatický β -katenin asociuje s kadheriny v plazmatické membráně a ovlivňuje buněčnou adhezi a migraci. Vázaný β -katenin nemůže vstoupit do jádra. (Linder *et al.* 2010)

Inhibicí Wnt dráhy A2M negativně ovlivňuje migraci, adhezi a invazivní růst nádorových buněk. (Linder *et al.* 2010)

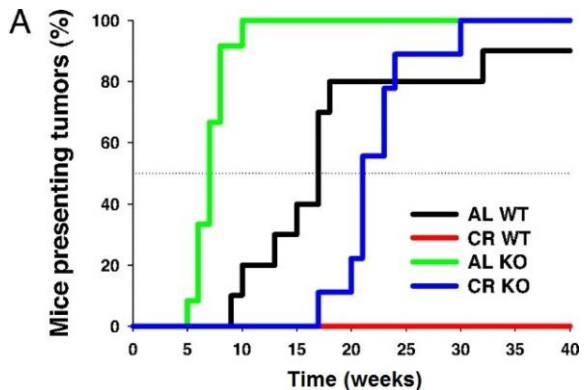
Transformovaný A2M spolu se svým receptorem LRP-1 zprostředkovává endocytózu. Volný A2M inhibuje proteázy (například plasmin, urokinase-type plasminogen activator, některé metalloproteázy), které stimulují invazivitu tumorů. Bylo zjištěno, že inhibice extracelulárních proteáz snižuje invazivitu rakovinných buněk až o 50% ve srovnání s kontrolou. Pravděpodobně kvůli vysoké koncentraci A2M má krevní plazma rypše nižší proteolytickou aktivitu než lidská plazma. (Thieme *et al.* 2015) A2M také snižuje aktivitu proteáz během zánětlivé reakce. Rypoš je ve svých podzemních

tunelech vystaven nejrůznějším bakteriálním infekcím. Je proto možné, že zvýšení hodnoty A2M již v raném věku slouží, mimo jiné, jako obrana proti tomuto ohrožení. (Thieme *et al.* 2015)

Kromě vlivu na degradaci proteinů je A2M výhradním transportérem zinku v krvi. (Thieme *et al.* 2015) Řada enzymů podílejících se na ochraně proti ROS je Zn dependentních (např. superoxid dismutáza). Některé geny spojené s oxido-redukčními ději byly u rypoše více exprimovány než u myši. (Yu *et al.* 2011)

K mimořádné odolnosti vůči nádorové transformaci u rypoše lysého i rypoše slepého může přispět i zvýšená hladina transkripčního faktoru Nrf2, o jehož funkci se podrobněji zmiňují v kapitole 3.2.

Analýzou vlivu Nrf2 na vznik nádorů u myši se zabývali Pearson *et al.* (2008). Zjistili, že funkční gen pro Nrf2 i kalorická restrikce výrazně přispěly k odolnosti myších buněk vůči dlouhodobému působení kancerogenních látek (obr. 12). (Pearson *et al.* 2008)



Obrázek 12 – Graf zobrazující rozvoj tumorů u myši s nepozměněným genotypem na běžné dietě (AL WT) a kalorické restrikci (CR WT) a u myši s vyřazeným genem pro Nrf2 na běžné dietě (AL KO) a kalorické restrikci (CR KO); převzato z Pearson *et al.* (2009)

5 Využití pro člověka

Je nutno podotknout, že rypoši jsou poměrně nový modelový organismus a funkce některých genů a jejich produktů je predikována podle jejich funkce u jiných savců. Je pravděpodobné, že jejich funkce je u rypošů přinejmenším podobná, přesto je možnost využití pro člověka pouze teoretická a bylo by potřebné velké množství dalších studií.

Rypoši jsou velmi odolní k nedostatku kyslíku a ve zvýšené míře je u nich exprimováno několik genů, které stimulují angiogenezi a účinnější zásobení tkání kyslíkem. (Malik *et al.* 2012; Avivi *et al.* 2006) U lidí v pokročilém věku často dochází k nedostatečnému prokrvení periferních tkání. Zvýšení exprese genů, které se u rypošů na toleranci hypoxie podílejí, by u člověka mohlo tento problém zmírnit.

Plaky amyloidu β způsobují degeneraci mozku a nacházejí se ve velkém množství v mozku pacientů s Alzheimerovou chorobou. U rypoše lysého k agregaci amyloidu β vůbec nedochází. Rypoš tvorby plaků pravděpodobně zabraňuje několika způsoby. Gen *CYP46A1* je u rypoše lysého exprimován se stejnou intenzitou i ve vysokém věku, zatímco u jiných savců míra jeho exprese klesá. Produkt tohoto genu redukuje tendenci amyloidu β ke shlukování. (Kim *et al.* 2011) V mozku starých jedinců rypoše lysého dochází ke zvýšení koncentrace dalšího proteinu, který se na metabolismu amyloidu β podílí, a to UCH. (Triplett *et al.* 2015a) Nízké množství tohoto proteinu je pozorováno u pacientů s Alzheimerovou i Parkinsonovou chorobou. Proteiny ALDO a ENO1 u rypoše lysého mají opačné posttranslační modifikace než u pacientů s Alzheimerovou poruchou. (Triplett *et al.* 2015b) V mozku

obou rypošů je zvýšené množství proteinu NRG-1, který pravděpodobně snižuje toxicitu amyloidu β .(Edrey *et al.* 2012) Zvýšení exprese genů pro tyto proteiny u lidí s degenerativními poruchami by mohlo zmírnit patologické procesy.

Rezistence rypošů k nádorové transformaci spočívá v mnoha změnách v jejich genomu a proteomu. Cílené modifikace těchto genů u člověka by byly příliš rizikové. Využitelný v praxi by mohl být vysokomolekulární hyaluronan, který je jedním z klíčových faktorů časně kontaktní inhibice u rypoše lysého.(Seluanov *et al.* 2009, Tian *et al.* 2013) Samotný HMM-HA ovšem časnou kontaktní inhibici neindukuje, nutná je také interakce s receptorem CD44 a zvýšená produkce proteinu p16. (Tian *et al.* 2013) Přesná podstata interakce není plně odhalena, ale další výzkum této dráhy a následná aplikace u člověka by mohla být velmi významná.

Významný vliv v nádorové transformaci u rypoše má A2M, jehož množství v krvi rypoše je signifikantně zvýšené.(Yu *et al.* 2011) A2M inhibuje signální dráhu Wnt/ β -katenin, jejíž výsledné produkty stimulují adhezi, migraci a invazivní růst nádorových buněk.(Linder *et al.* 2010) Přímé podání vysokomolekulárního A2M ve vysokém množství by mohlo být účinnou terapií pro pacienty s různými typy nádorů.

6 Závěr

- Rypoši lysí a slepí sdílí mnoho unikátních vlastností, které získali v důsledku adaptace na podzemní prostředí. Mezi ně patří tolerance nízké koncentrace O₂ a vysoké koncentrace CO₂, ale i nezvykle dlouhý život spojený s minimálními projevy stárnutí a rezistencí k nádorové transformaci
- Porovnání genomu rypošů s dalšími savci (např. myš, potkan, morče, člověk) odhalilo mnohé odlišnosti, které souvisí s dlouhověkostí a odolností k onkogenezi. Některé z nich oba rypoši sdílí, většina je však pro druh rypoše unikátní.
- Rypoš lysý má pozitivně selektované nebo duplikované geny, které se podílí na aktivitě telomerázy (*TEP1*, *TERF*, *TINF2*) a opravách poškození DNA (*CEBPG*) a pravděpodobně přispívají k jeho dlouhověkosti. Geny exprimované u některých typů tumorů (*Mnda*, *Dap10*, *Serpinb10*) v genomu rypoše lysého naopak chybí.
- Aktivita proteazomu rypoše lysého je značně vyšší než u jiných hlodavců. Jejich UPS systém a odstraňování poškozených a špatně sbalených proteinů je vysoce efektivní, proteiny rypoše lysého jsou k poškození navíc velmi odolné.
- U rypoše lysého nedochází k agregaci amyloidu β a tvorbě amyloidních plaků. Hladina několika proteinů regulujících jeho metabolismus se u rypoše s věkem zvyšuje, jiné jsou přítomny ve vysokém množství již v nízkém věku.
- Rypoš lysý snáší velké oxidativní poškození, proteiny rypoše jsou k tomuto poškození méně náchylné. To může být následkem substitucí, které jsou u některých z proteinů přítomny, nebo zvýšená aktivita transkripčního faktoru Nrf2, který ovlivňuje expresi detoxifikačních genů. Zvýšená aktivita Nrf2 je pro oba rypoše společná.
- Oba druhy rypoše, rypoš slepý i lysý, mají stejnou záměnu v sodném kanálu Na(V)1.7, která má vliv na vysoký práh bolesti vyvolané CO₂. Mnoho genů, které se účastní odpovědi na hypoxii, jsou u rypoše slepého i lysého rozdílně exprimované nebo jsou mutované. U rypošů je redukována apoptóza způsobená hypoxií, podpořená angiogeneze a zásobené tkáně kyslíkem pomocí globinů.
- Oba dva rypoši mají velmi nízký bazální metabolismus i složení jejich potravy je obdobné. Kalorický příjem rypošů nebude vysoký a jejich dieta by mohla mít podobné efekty jako kalorická restrikce. Rypoš lysý má navíc pravděpodobně sníženou signalizaci IIS dráhy a hladina některých proteinů, které se na energetickém metabolismu podílejí, zůstává na rozdíl od jiných hlodavců stabilní i ve vysokém věku.
- Rypoš slepý má substituci v proteinu p53, která pravděpodobně způsobuje preferenci nekrotické smrti buněk před apoptickou. Nekróza by mohla být při obraně proti tumorogenezi efektivnější. U rypoše slepého se tato substituce nepochybně podílí na rezistenci k nádorové transformaci.

- Specifickým obranným systémem proti nádorové transformaci je u rypše lysého časná kontaktní inhibice. Je závislá na HMM-HA, proteinech p16 a p27 a signálních drahách p53 a Rb. Protein p16 je kódován lokusem INK4a/b. Jeden z produktů tohoto lokusu, protein pALT, je pro rypše lysého unikátní.
- Protein A2M je v krvi rypše lysého ve velmi vysokém množství. Tento protein redukuje růst a adhezivitu nádorových buněk a také váže a z krve odstraňuje množství různých molekul (růstové faktory, hormony, cytokininy, proteázy).

7 Reference

- Aihara, Yasushi, Masahiko Kurabayashi, Yuichiro Saito, Yoshio Ohyama, Toru Tanaka, Shin-ichi Takeda, Kouichi Tomaru, et al. 2000. „Cardiac Ankyrin Repeat Protein Is a Novel Marker of Cardiac Hypertrophy Role of M-CAT Element Within the Promoter". *Hypertension* 2000; 36: 48-53
- Andziak, Blazej, Timothy P. O'Connor, Wenbo Qi, Eric M. DeWaal, Anson Pierce, Asish R. Chaudhuri, Holly Van Remmen, a Rochelle Buffenstein. 2006. „High Oxidative Damage Levels in the Longest-Living Rodent, the Naked Mole-Rat". *Aging Cell* 5 (6): 463–71.
- Ashur-Fabian, Osnat, Aaron Avivi, Luba Trakhtenbrot, Konstantin Adamsky, Meytal Cohen, Gadi Kajakaro, Alma Joel, Ninette Amariglio, Eviatar Nevo, a Gideon Rechavi. 2004. „Evolution of p53 in hypoxia-stressed Spalax mimics human tumor mutation". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (33): 12236–41.
- Avivi, Aaron, Leonid Brodsky, Eviatar Nevo, a Mark R. Band. 2006. „Differential Expression Profiling of the Blind Subterranean Mole Rat Spalax Ehrenbergi Superspecies: Bioprospecting for Hypoxia Tolerance". *Physiological Genomics* 27 (1): 54–64.
- Avivi, A., F. Gerlach, A. Joel, S. Reuss, T. Burmester, E. Nevo, a T. Hankeln. 2010. „Neuroglobin, Cytoglobin, and Myoglobin Contribute to Hypoxia Adaptation of the Subterranean Mole Rat Spalax". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (50):
- Azpurua, Jorge, Jiang-Nan Yang, Michael Van Meter, Zhengshan Liu, Julie Kim, Aliny AB Lobo Ladd, Antonio Augusto Coppi, Vera Gorbunova, a Andrei Seluanov. 2013. „IGF1R levels in the brain negatively correlate with longevity in 16 rodent species". *Aging (Albany NY)* 5 (4): 304–14.
- Baek, Kwan-Hyuck, Alexander Zaslavsky, Ryan C. Lynch, Carmella Britt, Yoshiaki Okada, Richard J. Siarey, M. William Lensch, et al. 2009. „Down syndrome suppression of tumor growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1". *Nature* 459 (7250): 1126–30.
- Bernardes de Jesus, Bruno, Elsa Vera, Kerstin Schneeberger, Agueda M Tejera, Eduard Ayuso, Fatima Bosch, a Maria A Blasco. 2012. „Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer". *EMBO Molecular Medicine* 4 (8): 691–704.
- Blacker, D, M A Wilcox, N M Laird, L Rodes, S M Horvath, R C Go, R Perry, et al. 1998. „Alpha-2 macroglobulin is genetically associated with Alzheimer disease". *Nature Genetics* 19 (4): 357–60.
- Blackwell, Boon-Nam, Thomas J. Bucci, Ronald W. Hart, a Angelo Turturro. 1995. „Longevity, Body Weight, and Neoplasia in Ad Libitum-Fed and Diet-Restricted C57BL6 Mice Fed NIH-31 Open Formula Diet". *Toxicologic Pathology* 23 (5): 570–82.
- Brodsky, L. I., J. Jacob-Hirsch, A. Avivi, L. Trakhtenbrot, S. Zeligson, N. Amariglio, A. Paz, et al. 2005. „Evolutionary Regulation of the Blind Subterranean Mole Rat, Spalax, Revealed by Genome-Wide Gene Expression". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (47): 17047–52.
- Brohus, Malene, Vera Gorbunova, Chris G. Faulkes, Michael T. Overgaard, a Cheryl A. Conover. 2015. „The Insulin-Like Growth Factor System in the Long-Lived Naked Mole-Rat". *PLOS ONE* 10 (12): e0145587.

- Buffenstein, Rochelle. 2008. „Negligible Senescence in the Longest Living Rodent, the Naked Mole-Rat: Insights from a Successfully Aging Species". *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 178 (4): 439–45.
- Buffenstein, Rochelle, a Shlomo Yahav. 1991. „Is the Naked Mole-Rat *Hererocephalus Glaber* an Endothermic yet Poikilothermic Mammal?" *Journal of Thermal Biology* 16 (4): 227–32.
- Campisi, Judith. 2013. „Aging, Cellular Senescence, and Cancer". *Annual Review of Physiology* 75 (1): 685–705.
- Campisi, Judith, Julie Andersen, Pankaj Kapahi, a Simon Melov. 2011. „Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease?" *Seminars in cancer biology* 21 (6)
- Colman, Ricki J., T. Mark Beasley, Joseph W. Kemnitz, Sterling C. Johnson, Richard Weindruch, a Rozalyn M. Anderson. 2014. „Caloric restriction reduces age-related and all-cause mortality in rhesus monkeys". *Nature Communications* 5 (duben).
- Conover, Cheryl A., Laurie K. Bale, Jessica R. Mader, Megan A. Mason, Kevin P. Keenan, a Ronald J. Marler. 2010. „Longevity and Age-Related Pathology of Mice Deficient in Pregnancy-Associated Plasma Protein-A". *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 65A (6): 590–99.
- Consortium „A global reference for human genetic variation". 2015. *Nature* 526 (7571): 68-74
- Das, Sharmistha, Kay T Yeung, Muktar A Mahajan, a Herbert H Samuels. 2014. „Fas Activated Serine-Threonine Kinase Domains 2 (FASTKD2) mediates apoptosis of breast and prostate cancer cells through its novel FAST2 domain". *BMC Cancer* 14 (listopad).
- Derr, Michael A., Peng Fang, Sunil K. Sinha, Svetlana Ten, Vivian Hwa, a Ron G. Rosenfeld. 2011. „A Novel Y332C Missense Mutation in the Intracellular Domain of The Human Growth Hormone Receptor Does Not Alter STAT5b Signaling: Redundancy of GHR Intracellular Tyrosines Involved in STAT5b Signaling". *Hormone Research in Paediatrics* 75 (3): 187–99.
- De Waal, Eric M., Hanyu Liang, Anson Pierce, Ryan T. Hamilton, Rochelle Buffenstein, a Asish R. Chaudhuri. 2013. „Elevated Protein Carbonylation and Oxidative Stress Do Not Affect Protein Structure and Function in the Long-Living Naked-Mole Rat: A Proteomic Approach". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434 (4): 815–19.
- Du, Kang, Liandong Yang, a Shunping He. 2015. „Phylogenomic analyses reveal a molecular signature linked to subterranean adaptation in rodents". *BMC Evolutionary Biology* 15 (prosinec).
- Edrey, Yael H., Diana Casper, Dorothee Huchon, James Mele, Jonathan A. Gelfond, Deborah M. Kristan, Eviatar Nevo, a Rochelle Buffenstein. 2012. „Sustained High Levels of Neuregulin-1 in the Longest-Lived Rodents; a Key Determinant of Rodent Longevity". *Aging Cell* 11 (2)
- Edrey, Yael H., David X. Medina, Maria Gaczynska, Pawel A. Osmulski, Salvatore Oddo, Antonella Caccamo, a Rochelle Buffenstein. 2013. „Amyloid beta and the longest-lived rodent: the naked mole-rat as a model for natural protection from Alzheimer's disease". *Neurobiology of Aging* 34 (10)
- Edwards, Sara J, Lynne Hananeia, Michael R Eccles, You Fang Zhang, a Antony W Braithwaite. 2003. „The proline-rich region of mouse p53 influences transactivation and apoptosis but is largely dispensable for these functions". *Oncogene* 22 (29): 4517–23.

- Fang, Xiaodong, Eviatar Nevo, Lijuan Han, Erez Y. Levanon, Jing Zhao, Aaron Avivi, Denis Larkin, et al. 2014a. „Genome-Wide Adaptive Complexes to Underground Stresses in Blind Mole Rats *Spalax*”. *Nature Communications* 5 (červen): 3966.
- Fang, Xiaodong, Inge Seim, Zhiyong Huang, Maxim V. Gerashchenko, Zhiqiang Xiong, Anton A. Turanov, Yabing Zhu, et al. 2014b. „Adaptations to a Subterranean Environment and Longevity Revealed by the Analysis of Mole Rat Genomes”. *Cell Reports* 8 (5): 1354–64.
- Fisher, Stephanie A., Priya N. Anandakumaran, Shawn C. Owen, a Molly S. Shoichet. 2015. „Tuning the Microenvironment: Click-Crosslinked Hyaluronic Acid-Based Hydrogels Provide a Platform for Studying Breast Cancer Cell Invasion”. *Advanced Functional Materials* 25 (46): 7163–72.
- Forbes, S, J Clements, E Dawson, S Bamford, T Webb, A Dogan, A Flanagan, et al. 2006. „COSMIC 2005”. *British Journal of Cancer* 94 (2): 318–22.
- Gorbunova, Vera, Andrei Seluanov, Zhengdong Zhang, Vadim N. Gladyshev, a Jan Vijg. 2014. „Comparative Genetics of Longevity and Cancer: Insights from Long-Lived Rodents”. *Nature Reviews. Genetics* 15 (8): 531–40.
- Gorbunova, V., C. Hine, X. Tian, J. Ablueva, A. V. Gudkov, E. Nevo, a A. Seluanov. 2012. „Cancer Resistance in the Blind Mole Rat Is Mediated by Concerted Necrotic Cell Death Mechanism”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109 (47): 19392–96.
- Han, Xue-Ji, Jei-Keon Chae, Mi-Jin Lee, Kyung-Ran You, Byung-Ho Lee, a Dae-Ghon Kim. 2005. „Involvement of GADD153 and Cardiac Ankyrin Repeat Protein in Hypoxia-Induced Apoptosis of H9c2 Cells”. *Journal of Biological Chemistry* 280 (24): 23122–29.
- Harman, Denham. 2002. „Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry”. *Science’s SAGE KE* 2002 (37): 14.
- Chen, Delin, Muiyang Li, Jianyuan Luo, a Wei Gu. 2003. „Direct Interactions between HIF-1 α and Mdm2 Modulate p53 Function”. *Journal of Biological Chemistry* 278 (16): 13595–98.
- Chen, X., F. Bai, L. Sokol, J. Zhou, A. Ren, J. S. Painter, J. Liu, et al. 2009. „A Critical Role for DAP10 and DAP12 in CD8+ T Cell-Mediated Tissue Damage in Large Granular Lymphocyte Leukemia”. *Blood* 113 (14): 3226–34.
- Choi, Joungil, Allan I. Levey, Susan T. Weintraub, Howard D. Rees, Marla Gearing, Lih-Shen Chin, a Lian Li. 2004. „Oxidative Modifications and Down-Regulation of Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L1 Associated with Idiopathic Parkinson’s and Alzheimer’s Diseases”. *Journal of Biological Chemistry* 279 (13): 13256–64.
- Izquierdo, José M., a Juan Valcárcel. 2007. „Fas-Activated Serine/Threonine Kinase (FAST K) Synergizes with TIA-1/TIAR Proteins to Regulate Fas Alternative Splicing”. *Journal of Biological Chemistry* 282 (3): 1539–43.
- Jaskelioff, Mariela, Florian L. Muller, Ji-Hye Paik, Emily Thomas, Shan Jiang, Andrew C. Adams, Ergun Sahin, et al. 2011. „Telomerase Reactivation Reverses Tissue Degeneration in Aged Telomerase-Deficient Mice”. *Nature* 469 (7328): 102–6.
- Jiang, J., E. S. Yang, G. Jiang, S. Nowsheen, H. Wang, T. Wang, Y. Wang, et al. 2011. „p53-Dependent BRCA1 Nuclear Export Controls Cellular Susceptibility to DNA Damage”. *Cancer Research* 71 (16): 5546–57.

- John Larson, Thomas J. Park. 2009. „Extreme hypoxia tolerance of naked mole-rat brain". *Neuroreport* 20 (18): 1634–37.
- Kappeler, Laurent, Carlos De Magalhaes Filho, Joëlle Dupont, Patricia Leneuve, Pascale Cervera, Laurence Périn, Catherine Loudes, et al. 2008. „Brain IGF-1 Receptors Control Mammalian Growth and Lifespan through a Neuroendocrine Mechanism". *PLOS Biol* 6 (10): e254.
- Keane, M., T. Craig, J. Alfoldi, A. M. Berlin, J. Johnson, A. Seluanov, V. Gorbunova, et al. 2014. „The Naked Mole Rat Genome Resource: Facilitating Analyses of Cancer and Longevity-Related Adaptations". *Bioinformatics* 30 (24): 3558–60.
- Keane, Thomas M., Leo Goodstadt, Petr Danecek, Michael A. White, Kim Wong, Binnaz Yalcin, Andreas Heger, et al. 2011. „Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation". *Nature* 477 (7364): 289–94.
- Kim, Eun Bae, Xiaodong Fang, Alexey A. Fushan, Zhiyong Huang, Alexei V. Lobanov, Lijuan Han, Stefano M. Marino, et al. 2011. „Genome Sequencing Reveals Insights into Physiology and Longevity of the Naked Mole Rat". *Nature* 479 (7372): 223–27.
- Kimura, Koutarou D., Heidi A. Tissenbaum, Yanxia Liu, a Gary Ruvkun. 1997. „Daf-2, an Insulin Receptor-like Gene That Regulates Longevity and Diapause in *Caenorhabditis Elegans*". *Science* 277 (5328): 942–46.
- Kim, William Y., a Norman E. Sharpless. 2006. „The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging". *Cell* 127 (2): 265–75.
- Klimova, T. A., E. L. Bell, E. H. Shroff, F. D. Weinberg, C. M. Snyder, G. P. Dimri, P. T. Schumacker, G. R. S. Budinger, a N. S. Chandel. 2009. „Hyperoxia-Induced Premature Senescence Requires p53 and pRb, but Not Mitochondrial Matrix ROS". *The FASEB Journal* 23 (3): 783–94.
- Kramer, Beverley, a Rochelle Buffenstein. 2004. „The pancreas of the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*): an ultrastructural and immunocytochemical study of the endocrine component of thermoneutral and cold acclimated animals". *General and Comparative Endocrinology* 139 (3): 206–14.
- Lee, Jong-Min, Marcus J. Calkins, Kaimin Chan, Yuet Wai Kan, a Jeffrey A. Johnson. 2003. „Identification of the NF-E2-Related Factor-2-Dependent Genes Conferring Protection against Oxidative Stress in Primary Cortical Astrocytes Using Oligonucleotide Microarray Analysis". *Journal of Biological Chemistry* 278 (14): 12029–38.
- Lee, Seung-min, So Hee Dho, Sung-kyu Ju, Jin-soo Maeng, Jeong-yoon Kim, a Ki-sun Kwon. 2012. „Cytosolic Malate Dehydrogenase Regulates Senescence in Human Fibroblasts". *Biogerontology* 13 (5): 525–36.
- Leidecker, Orsolya, Ivan Matic, Bidesh Mahata, Emmanuelle Pion, a Dimitris P. Xirodimas. 2012. „The Ubiquitin E1 Enzyme Ube1 Mediates NEDD8 Activation under Diverse Stress Conditions". *Cell Cycle* 11 (6): 1142–50.
- Lendahl, Urban, Kian Leong Lee, Henry Yang, a Lorenz Poellinger. 2009. „Generating Specificity and Diversity in the Transcriptional Response to Hypoxia". *Nature Reviews. Genetics* 10 (12): 821–32.
- Lewis, Kaitlyn N., Blazej Andziak, Ting Yang, a Rochelle Buffenstein. 2013. „The Naked Mole-Rat Response to Oxidative Stress: Just Deal with It". *Antioxidants & Redox Signaling* 19 (12): 1388–99.

- Lewis, Kaitlyn N., Emily Wason, Yael H. Edrey, Deborah M. Kristan, Eviatar Nevo, a Rochelle Buffenstein. 2015. „Regulation of Nrf2 Signaling and Longevity in Naturally Long-Lived Rodents". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (12): 3722–27.
- Lindner, Inge, Nasr Y. A. Hemdan, Martin Buchold, Klaus Huse, Marina Bigl, Ilka Oerlecke, Albert Ricken, et al. 2010. „ α 2-Macroglobulin Inhibits the Malignant Properties of Astrocytoma Cells by Impeding β -Catenin Signaling". *Cancer Research* 70 (1): 277–87.
- Liu, T., C. Laurell, G. Selivanova, J. Lundeberg, P. Nilsson, a K. G. Wiman. 2006. „Hypoxia Induces p53-Dependent Transactivation and Fas/CD95-Dependent Apoptosis". *Cell Death & Differentiation* 14 (3): 411–21.
- MacRae, Sheila L, Quanwei Zhang, Christophe Lemetre, Inge Seim, Robert B Calder, Jan Hoeijmakers, Younsin Suh, et al. 2015. „Comparative analysis of genome maintenance genes in naked mole rat, mouse, and human". *Aging Cell* 14 (2): 288–91.
- Magalhães, João Pedro de, João Curado, a George M. Church. 2009. „Meta-Analysis of Age-Related Gene Expression Profiles Identifies Common Signatures of Aging". *Bioinformatics* 25 (7): 875–81.
- Malik, Assaf, Abraham Korol, Mathias Weber, Thomas Hankeln, Aaron Avivi, a Mark Band. 2012. „Transcriptome analysis of the spalax hypoxia survival response includes suppression of apoptosis and tight control of angiogenesis". *BMC Genomics* 13 (listopad): 615.
- Matheu, Ander, Cristina Pantoja, Alejo Efeyan, Luis M. Criado, Juan Martín-Caballero, Juana M. Flores, Peter Klatt, a Manuel Serrano. 2004. „Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging". *Genes & Development* 18 (22): 2736–46.
- Min, L.-J., M. Mogi, J. Iwanami, J.-M. Li, A. Sakata, T. Fujita, K. Tsukuda, M. Iwai, a M. Horiuchi. 2008. „Angiotensin II Type 2 Receptor Deletion Enhances Vascular Senescence by Methyl Methanesulfonate Sensitive 2 Inhibition". *Hypertension* 51 (5): 1339–44.
- Mogi, M., J.-M. Li, J. Iwanami, L.-J. Min, K. Tsukuda, M. Iwai, a M. Horiuchi. 2006. „Angiotensin II Type-2 Receptor Stimulation Prevents Neural Damage by Transcriptional Activation of Methyl Methanesulfonate Sensitive 2". *Hypertension* 48 (1): 141–48.
- Moudry, Pavel, Claudia Lukas, Libor Macurek, Hana Hanzlikova, Zdenek Hodny, Jiri Lukas, a Jiri Bartek. 2012. „Ubiquitin-activating enzyme UBA1 is required for cellular response to DNA damage". *Cell Cycle* 11 (8): 1573–82.
- Nevo, Eviatar. 2013. „Stress, adaptation, and speciation in the evolution of the blind mole rat, Spalax, in Israel". *Molecular Phylogenetics and Evolution*, Morris Goodman Memorial Symposium, 66 (2): 515–25.
- Orr, Miranda E., Valentina R. Garbarino, Angelica Salinas, a Rochelle Buffenstein. 2015. „Sustained High Levels of Neuroprotective, High Molecular Weight, Phosphorylated Tau in the Longest-Lived Rodent". *Neurobiology of Aging* 36 (3): 1496–1504.
- Pagano, Bruno, Abdullah Jama, Pierre Martinez, Ester Akanho, Tam T. T. Bui, Alex F. Drake, Franca Fraternali, a Penka V. Nikolova. 2013. „Structure and Stability Insights into Tumour Suppressor p53 Evolutionary Related Proteins". Editoval Klaus Roemer. *PLoS ONE* 8 (10): e76014.
- Pearson, Kevin J., Kaitlyn N. Lewis, Nathan L. Price, Joy W. Chang, Evelyn Perez, Maria Victoria Cascajo, Kellie L. Tamashiro, et al. 2008. „Nrf2 Mediates Cancer Protection but Not Prolongevity Induced by Caloric Restriction". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (7): 2325–30.

- Pérez, Viviana I., Rochelle Buffenstein, Venkata Masamsetti, Shanique Leonard, Adam B. Salmon, James Mele, Blazej Andziak, et al. 2009. „Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (9): 3059–64.
- Perrot, Gwenn, Benoit Langlois, Jérôme Devy, Albin Jeanne, Laurie Verzeaux, Sébastien Almagro, Hervé Sartelet, et al. 2012. „LRP-1–CD44, a New Cell Surface Complex Regulating Tumor Cell Adhesion". *Molecular and Cellular Biology* 32 (16): 3293–3307.
- Pickering, A. M., M. Lehr, W. J. Kohler, M. L. Han, a R. A. Miller. 2015. „Fibroblasts From Longer-Lived Species of Primates, Rodents, Bats, Carnivores, and Birds Resist Protein Damage". *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 70 (7): 791–99.
- Pollice, Alessandra, Maria Vivo, a Girolama La Mantia. 2008. „The Promiscuity of ARF Interactions with the Proteasome". *FEBS Letters* 582 (23-24): 3257–62.
- Poon, H. Fai, Holly M. Shepherd, Tanea T. Reed, Vittorio Calabrese, Anna-Maria Giuffrida Stella, Giovanni Pennisi, Jian Cai, William M. Pierce, Jon B. Klein, a D. Allan Butterfield. 2006. „Proteomics analysis provides insight into caloric restriction mediated oxidation and expression of brain proteins associated with age-related impaired cellular processes: Mitochondrial dysfunction, glutamate dysregulation and impaired protein synthesis". *Neurobiology of Aging* 27 (7): 1020–34.
- Pride, Harrison, Zhen Yu, Bharath Sunchu, Jillian Mochnick, Alexander Coles, Yiqiang Zhang, Rochelle Buffenstein, Peter J. Hornsby, Steven N. Austad, a Viviana I. Pérez. 2015. „Long-Lived Species Have Improved Proteostasis Compared to Phylogenetically-Related Shorter-Lived Species". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 457 (4): 669–75.
- Rodriguez, Karl A., Pawel A. Osmulski, Anson Pierce, Susan T. Weintraub, Maria Gaczynska, a Rochelle Buffenstein. 2014. „A cytosolic protein factor from the naked mole-rat activates proteasomes of other species and protects these from inhibition". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1842 (11): 2060–72.
- Russell, Steven J., a C. Ronald Kahn. 2007. „Endocrine Regulation of Ageing". *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (9): 681–91.
- Salminen, Antero, Kai Kaarniranta, a Anu Kauppinen. 2013. „Crosstalk between Oxidative Stress and SIRT1: Impact on the Aging Process". *International Journal of Molecular Sciences* 14 (2): 3834–59.
- Sanchez, Jamila R., Sarah L. Milton, Kevin C. Corbit, a Rochelle Buffenstein. 2015. „Multifactorial processes to slowing the biological clock: Insights from a comparative approach". *Experimental Gerontology, Aging in the Wild: Insights from Free-Living and Non-Model organisms*, 71: 27–37.
- Sekar, Shobana, Jacquelyn McDonald, Lori Cuyugan, Jessica Aldrich, Ahmet Kurdoglu, Jonathan Adkins, Geidy Serrano, et al. 2015. „Alzheimer’s disease is associated with altered expression of genes involved in immune response and mitochondrial processes in astrocytes". *Neurobiology of Aging* 36 (2): 583–91.
- Seluanov, Andrei, Christopher Hine, Jorge Azpurua, Marina Feigenson, Michael Bozzella, Zhiyong Mao, Kenneth C. Catania, a Vera Gorbunova. 2009. „Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (46): 19352–57.
- Shattuck, Milena R., a Scott A. Williams. 2010. „Arboreality has allowed for the evolution of increased longevity in mammals". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (10): 4635–39.

- Shen, Liang, Ci Chen, Xuan Wei, Xixian Li, Guangjin Luo, Jingwen Zhang, Jianping Bin, et al. 2015. „Overexpression of Ankyrin Repeat Domain 1 Enhances Cardiomyocyte Apoptosis by Promoting p53 Activation and Mitochondrial Dysfunction in Rodents". *Clinical Science* 128 (10): 665–78.
- Sherr, Charles J. 2012. „Ink4-Arf Locus in Cancer and Aging". *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 1 (5): 731–41.
- Shi, Y., R. Buffenstein, D. A. Pulliam, a H. Van Remmen. 2010. „Comparative Studies of Oxidative Stress and Mitochondrial Function in Aging". *Integrative and Comparative Biology* 50 (5): 869–79.
- Shi, Yubin, Birgit Reitmaier, Johannes Regenbogen, R. Michael Slowey, Susan R. Opalenik, Eckhard Wolf, Andreas Goppelt, a Jeffrey M. Davidson. 2005. „CARP, a Cardiac Ankyrin Repeat Protein, Is Up-Regulated during Wound Healing and Induces Angiogenesis in Experimental Granulation Tissue". *The American Journal of Pathology* 166 (1): 303–12.
- Schelshorn, Dominik W., Armin Schneider, Wolfgang Kuschinsky, Daniela Weber, Carola Krüger, Tanjew Dittgen, Heinrich F. Bürgers, et al. 2009. „Expression of Hemoglobin in Rodent Neurons". *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29 (3): 585–95.
- Smith, Ewan St John, Damir Omerbašić, Stefan G. Lechner, Gireesh Anirudhan, Liudmila Lapatsina, a Gary R. Lewin. 2011. „The Molecular Basis of Acid Insensitivity in the African Naked Mole-Rat". *Science* 334 (6062): 1557–60.
- Somasundaram, Kumaravel, Hongbing Zhang, Yi-Xin Zeng, Yariv Houvras, Yi Peng, Hongxiang Zhang, Gen Sheng Wu, Jonathan D. Licht, Barbara L. Weber, a Wafik S. El-Deiry. 1997. „Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/CIP1". *Nature* 389 (6647): 187–90.
- Speakman, John R. 2005. „Body Size, Energy Metabolism and Lifespan". *Journal of Experimental Biology* 208 (9): 1717–30.
- Suh, Yousin, Gil Atzmon, Mi-Ook Cho, David Hwang, Bingrong Liu, Daniel J. Leahy, Nir Barzilai, a Pinchas Cohen. 2008. „Functionally significant insulin-like growth factor I receptor mutations in centenarians". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (9): 3438–42.
- Szklarczyk, Radek, Jaap Heringa, Sergei Kosakovsky Pond, a Anton Nekrutenko. 2007. „Rapid Asymmetric Evolution of a Dual-Coding Tumor Suppressor INK4a/ARF Locus Contradicts Its Function". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (31): 12807–12.
- Tago, Kenji, Susanna Chiocca, a Charles J. Sherr. 2005. „Sumoylation Induced by the Arf Tumor Suppressor: A p53-Independent Function". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (21): 7689–94.
- Takai, Kaori K., Tatsuya Kibe, Jill R. Donigian, David Frescas, a Titia de Lange. 2011. „Telomere protection by TPP1/POT1 requires tethering to TIN2". *Molecular cell* 44 (4): 647–59.
- Tatar, M., A. Kopelman, D. Epstein, Tu M-P, a et al. 2001. „A Mutant Drosophila Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function". *Science* 292 (5514): 107–10.
- Thieme, René, Susanne Kurz, Marlen Kolb, Tewodros Debebe, Susanne Holtze, Michaela Morhart, Klaus Huse, et al. 2015. „Analysis of Alpha-2 Macroglobulin from the Long-Lived and Cancer-Resistant Naked Mole-Rat and Human Plasma". *PLoS ONE* 10 (6).

- Thomas, Gregg W. C., a Matthew W. Hahn. 2015. „Determining the Null Model for Detecting Adaptive Convergence from Genomic Data: A Case Study Using Echolocating Mammals". *Molecular Biology and Evolution* 32 (5): 1232–36.
- Tian, Xiao, Jorge Azpurua, Christopher Hine, Amita Vaidya, Max Myakishev-Rempel, Julia Ablaeva, Zhiyong Mao, Eviatar Nevo, Vera Gorbunova, a Andrei Seluanov. 2013. „High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat". *Nature* 499 (7458): 346–49.
- Tian, Xiao, Jorge Azpurua, Zhonghe Ke, Adeline Augereau, Zhengdong D. Zhang, Jan Vijg, Vadim N. Gladyshev, Vera Gorbunova, a Andrei Seluanov. 2015. „INK4 Locus of the Tumor-Resistant Rodent, the Naked Mole Rat, Expresses a Functional p15/p16 Hybrid Isoform". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (4): 1053–58.
- Toledo, Franck, Crystal J. Lee, Kurt A. Krummel, Luo-Wei Rodewald, Chung-Wen Liu, a Geoffrey M. Wahl. 2007. „Mouse Mutants Reveal that Putative Protein Interaction Sites in the p53 Proline-Rich Domain Are Dispensable for Tumor Suppression". *Molecular and Cellular Biology* 27 (4): 1425–32.
- Triplett, Judy C., Antonella Tramutola, Aaron Swomley, Jessime Kirk, Kelly Grimes, Kaitilyn Lewis, Miranda Orr, et al. 2015a. „Age-Related Changes in the Proteostasis Network in the Brain of the Naked Mole-Rat: Implications Promoting Healthy Longevity". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1852 (10): 2213–24.
- Triplett, Judy C., Aaron Swomley, Jessime Kirk, Katilyn Lewis, Miranda Orr, Karl Rodriguez, Jian Cai, Jon B. Klein, Rochelle Buffenstein, a D. Allan Butterfield. 2015b. „Metabolic Clues to Salubrious Longevity in the Brain of the Longest-Lived Rodent: The Naked Mole-Rat". *Journal of Neurochemistry* 134 (3): 538–50.
- Tümpel, Stefan, a K Lenhard Rudolph. 2012. „The role of telomere shortening in somatic stem cells and tissue aging: lessons from telomerase model systems". *Annals Of The New York Academy Of Sciences* 1266: 28–39.
- van Gent, Diana, Paul Sharp, Kevin Morgan, a Noor Kalsheker. 2003. „Serpins: structure, function and molecular evolution". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 (11): 1536–47.
- van Wijk, S. J. L., a H. T. M. Timmers. 2010. „The Family of Ubiquitin-Conjugating Enzymes (E2s): Deciding between Life and Death of Proteins". *The FASEB Journal* 24 (4): 981–93.
- Venot, Corinne, Michel Maratrat, Christine Dureuil, Emmanuel Conseiller, Laurent Bracco, a Laurent Debussche. 1998. „The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression". *The EMBO journal* 17 (16): 4668–79.
- Welford, Scott M., Barbara Bedogni, Katarina Gradin, Lorenz Poellinger, Marianne Broome Powell, a Amato J. Giaccia. 2006. „HIF1 α delays premature senescence through the activation of MIF". *Genes & Development* 20 (24): 3366–71.
- Welford, Scott M., a Amato J. Giaccia. 2011. „Hypoxia and Senescence: The impact of oxygenation on tumor suppression". *Molecular cancer research : MCR* 9 (5): 538–44.
- Yang, Wen, a Siegfried Hekimi. 2010. „A Mitochondrial Superoxide Signal Triggers Increased Longevity in *Caenorhabditis elegans*". *PLoS Biology* 8 (12).
- Yang, Zhiyuan, Yan Zhang, a Luonan Chen. 2013. „Investigation of anti-cancer mechanisms by comparative analysis of naked mole rat and rat". *BMC systems biology* 7 (2): 1.

Yang, Z., Yan Zhang, Luonan Chen 2015. „Single amino acid changes in naked mole rat may reveal new anti-cancer mechanisms in mammals”. *iGene* 572 (1): 101–7.

Yu, Chuanfei, Yang Li, Andrew Holmes, Karol Szafranski, Chris G. Faulkes, Clive W. Coen, Rochelle Buffenstein, Matthias Platzer, João Pedro de Magalhães, a George M. Church. 2011. „RNA Sequencing Reveals Differential Expression of Mitochondrial and Oxidation Reduction Genes in the Long-Lived Naked Mole-Rat When Compared to Mice”. *PLOS ONE* 6 (11): e26729.

Zhang, Haojian, Huawei Li, Hualin S. Xi, a Shaoguang Li. 2012. „HIF1 α is required for survival maintenance of chronic myeloid leukemia stem cells”. *Blood* 119 (11): 2595–2607.

Zhang, H, K Somasundaram, Y Peng, H Tian, H Zhang, D Bi, B L Weber, a W S El-Deiry. 1998. „BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity”. *Oncogene* 16 (13): 1713–21.

Zhao, Shanmin, Lifang Lin, Guanghan Kan, Chang Xu, Qiu Tang, Chenlin Yu, Wei Sun, Liping Cai, Chen Xu, a Shufang Cui. 2014. „High Autophagy in the Naked Mole Rat May Play a Significant Role in Maintaining Good Health”. *Cellular Physiology and Biochemistry* 33 (2): 321–32.

Zhi, Feng, Guangxin Zhou, Naiyuan Shao, Xiwei Xia, Yimin Shi, Qiang Wang, Yi Zhang, et al. 2013. „miR-106a-5p Inhibits the Proliferation and Migration of Astrocytoma Cells and Promotes Apoptosis by Targeting FASTK: e72390”. *PLoS One* 8 (8): n/a.

Zimniak, Piotr. 2008. „Detoxification Reactions: Relevance to Aging”. *Ageing Research Reviews* 7 (4): 281–300.