

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Strukturní a funkční charakterizace včelího
vitellogeninu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Petr Vodáček
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2021

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....
Petr Vodáček

Rád bych poděkoval svému vedoucímu práce panu doc. Mgr. Marku Petřivalskému, Dr. za ochotu, trpělivost a pomoc při vypracovávání této bakalářské práce. Také děkuji celému kolektivu na Katedře biochemie za poskytnuté rady při práci na experimentální části této práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Petr Vodáček
Název práce	Strukturní a funkční charakterizace včelího vitellogeninu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2021

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá proteinem vitellogeninem. V teoretické části popisuje jeho vlastnosti, strukturu, biosyntézu a přínosné funkce v imunitě, antioxidační ochraně či dlouhověkosti u včely medonosné. Pozornost je věnována také popisu metod, sloužících k analýze vitellogeninu. V praktické části byla pomocí Bradfordovy metody zjištěna celková koncentrace proteinů včelí hemolymfy, které byly následně separovány pomocí gelové elektroforézy. Metodou Western blot byl ve vzorku hemolymfy detekován vitellogenin. Také byla provedena bioinformatická analýza, pomocí níž se podařilo najít u jiných druhů včel podobné sekvence proteinů. Dále byla predikována místa, kde může v sekvenci tohoto proteinu docházet k posttranslačním modifikacím. S využitím homologního modelování byly vytvořeny modely domén vitellogeninu a jemu podobných proteinů vg-like-A, -B a -C.

Klíčová slova	vitellogenin, vg-like proteiny, lipoproteiny, oxidační stres, dlouhověkost, imunita, včela medonosná
Počet stran	65
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname Petr Vodáček

Title Structural and functional characterization of honey bee vitellogenin

Type of thesis Bachelor

Department Department of biochemistry

Supervisor doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.

The year of presentation 2021

Abstract

This bachelor thesis deals with the protein vitellogenin. In the theoretical part it describes its properties, structure, biosynthesis and beneficial functions in immunity, antioxidant protection or longevity in the honey bee. Attention is also paid to the description of methods used for vitellogenin analysis. In the practical part, the total concentration of honey bee hemolymph proteins was determined using the Bradford method and these proteins were subsequently separated by gel electrophoresis. The Western blot method was used to detect vitellogenin in the hemolymph sample. Bioinformatic analysis was also performed and similar protein sequences were found in other bee species. Furthermore, the sites where post-translational modifications may occur in the sequence of this protein were predicted. Finally, models of the domains of vitellogenin, vg-like-A, -B and -C proteins were generated using homology modelling.

Keywords vitellogenin, vg-like proteins, lipoproteins, oxidative stress, longevity, immunity, honey bee

Number of pages 65

Number of appendices 0

Language Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Molekulární vlastnosti včelího vitellogeninu	3
2.1.1	Gen <i>vitellogeninu</i>	3
2.1.2	Struktura vitellogeninu	3
2.1.3	Lokalizace a biosyntéza vitellogeninu	5
2.2	Biologické funkce včelího vitellogeninu	8
2.2.1	Funkce vitellogeninu ve vývoji	8
2.2.2	Funkce vitellogeninu v reprodukci	9
2.2.3	Funkce vitellogeninu v imunitě	9
2.2.4	Funkce vitellogeninu v dlouhověkosti a antioxidační ochraně včel	13
2.3	Vztah včelího vitellogeninu a hormonů	15
2.4	Rozdíly mezi kastami z pohledu včelího vitellogeninu	17
2.5	Metody studia vlastností vitellogeninu	19
2.5.1	Imunofluorescence	20
2.5.2	Purifikace proteinů	20
2.5.3	Western blot	21
2.5.4	HPLC	22
2.5.5	Hmotnostní spektrometrie	22
2.5.6	Syntéza cDNA	23
2.5.7	qPCR	23
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1	Materiál	24
3.1.1	Chemikálie	24
3.1.2	Použité roztoky	24
3.1.3	Přístroje a vybavení	26
3.1.4	Biologický materiál	27
3.2	Metody	27
3.2.1	Stanovení proteinů Bradfordovou metodou	27
3.2.2	Metoda SDS-PAGE	28
3.2.3	Metoda Western blot	30
3.2.4	Bioinformatická analýza	31
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	33
4.1	Vyhodnocení stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou	33
4.2	Vyhodnocení metody SDS-PAGE	35
4.2.1	Barvení pomocí roztoku s Coomassie Blue	35
4.2.2	Značení pomocí roztoku s kvercetinem a chloridem hlinitým	36
4.2.3	Barvení pomocí roztoku Sudánské černi B	38
4.3	Vyhodnocení metody Western blot	39
4.4	Vyhodnocení bioinformatické analýzy	41
4.4.1	Porovnání nukleotidových a aminokyselinových sekvencí	41
4.4.2	Předpokládaná místa fosforylace	45
4.4.3	Předpokládaná místa N-glykosylace	48
4.4.4	3D modely	50
5	ZÁVĚR	56
6	LITERATURA	57
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	64

CÍLE PRÁCE

- Vypracovat literární rešerši aktuálních znalostí o proteinu vitellogeninu (Vg) včely medonosné (*Apis mellifera* L.), se zaměřením na jeho sekvenci genu, strukturu a vlastnosti, jeho biosyntézu a biologické funkce
- Souhrn metod izolace, purifikace a detekce vitellogeninu ze vzorků tkání včely medonosné
- *In silico* analýza a porovnání genu *vitellogeninu* a *vg-like* genů u včely medonosné a hmyzu

1 ÚVOD

Vitellogenin (Vg) je prekurzorový protein vaječného žloutku, vyskytující se u vejcorodých živočichů včetně hmyzu (Spieth *et al.*, 1991; Tufail a Takeda, 2008). U obratlovců se syntetizuje a ukládá v játrech, načež je vyměšován do krve. U hmyzu k jeho tvorbě a následnému uložení dochází v tukových tělískách, odkud probíhá jeho sekrece do hemolymfy (Arrese a Soulages, 2010).

Vzhledem k tomu, že vitellogenin přenáší molekuly lipidů a jeho struktura obsahuje fosforylační a glykosylační místa, je označován jako fosfolipoglykoprotein (Tufail a Takeda, 2008; Havukainen *et al.*, 2012). U člověka lze nalézt podobné lipoproteiny, např. apolipoprotein B, který je dokonce evolučně příbuzný s vitellogeninem a dokáže se vázat na odumřelé buňky, čímž potlačuje vznik zánětů (Baker, 1988; Cho a Seong, 2009). Lipoproteiny jsou obecně spojovány s ovlivňováním zdraví a dlouhověkosti (Atzmon *et al.*, 2002; McKay *et al.*, 2011; Hausman *et al.*, 2012). U zvířat mají dvojí roli, což znamená, že jsou zapojeny do metabolismu lipidů, a zároveň se účastní imunitní obrany organismu proti patogenům (Seong a Matzinger, 2004; Cho a Seong, 2009).

U včely medonosné (*Apis mellifera* L.) má vitellogenin kromě tvorby vaječného žloutku i další funkce, např. ovlivňuje délku života a sociální chování v koloniích (Havukainen *et al.*, 2012). Díky svým antioxidačním vlastnostem může také odstraňovat volné radikály (Seehuus *et al.*, 2006; Havukainen *et al.*, 2013). Dále rozpoznává odumřelé buňky a dokáže se na ně navázat, díky jeho vazebné afinitě k povrchu lipidů (Havukainen *et al.*, 2013). Navíc má vliv na včelí imunitu, protože se váže nejen na některé bakterie, ale také interaguje s imunitními buňkami (Amdam *et al.*, 2004; Salmela *et al.*, 2015). Kromě toho bylo nedávno zjištěno, že vitellogenin dokáže u včel přenášet patogenní molekuly do vajíček ve vaječnicích matek, a takto předávat imunitní paměť z jedné generace na druhou (Salmela *et al.*, 2015).

Jeho hladina se u včel liší v závislosti na kastě. U matek (plodné samice) dochází k jeho značné tvorbě, zatímco u trubců (samci) se tvoří nepatrně. U dělnic (neplodné samice) se jeho množství liší v závislosti na sociální roli a délce života. Nejméně jej mají včely létavky, žijící krátkou dobu. O mnoho více se vitellogeninu tvoří u včel krmiček, avšak k největší syntéze dochází u zimní generace včel, které žijí z dělnic nejdéle (Amdam *et al.*, 2009).

Včelstva se v současnosti potýkají s několika negativními faktory, které mohou být příčinou jejich nemocí nebo syndromu zhroucení. Jedná se zejména o viry a mikrobiální parazity. Avšak částečný vliv na zdraví včelstev můžou mít i pesticidy, hlavně insekticidy (Sánchez-Bayo *et al.*, 2016). Zkoumání struktury a funkcí vitellogeninu by mohlo přinést odpovědi na otázky, jakým způsobem se metabolismus včel vypořádává s nepříznivými vlivy. Nové znalosti by poté mohly být využity například při šlechtění odolnějších plemen včel nebo v prevenci a léčbě včelích infekcí.

V teoretické části této práce budou především popsány jeho vlastnosti, struktura, biosyntéza a funkce v imunitě, antioxidační ochraně či dlouhověkosti u včely medonosné. Také budou shrnuty metody, používané k jeho analýze.

Cílem praktické části bude provedení metod SDS-PAGE a Western blot, zaměřujících se na detekci vitellogeninu v hemolymfě včely. Pozornost bude také věnována bioinformatické analýze sekvencí genu *vitellogeninu* a *vg-like* genů a jejich proteinů, která by měla ukázat, jak se tyto proteiny liší mezi včelou medonosnou a jinými druhy. Jaké rozdíly se nachází ve strukturních doménách těchto proteinů by měly naznačit homologní modely, které budou vytvořeny pomocí specializovaného serveru.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Molekulární vlastnosti včelího vitellogeninu

2.1.1 Gen *vitellogeninu*

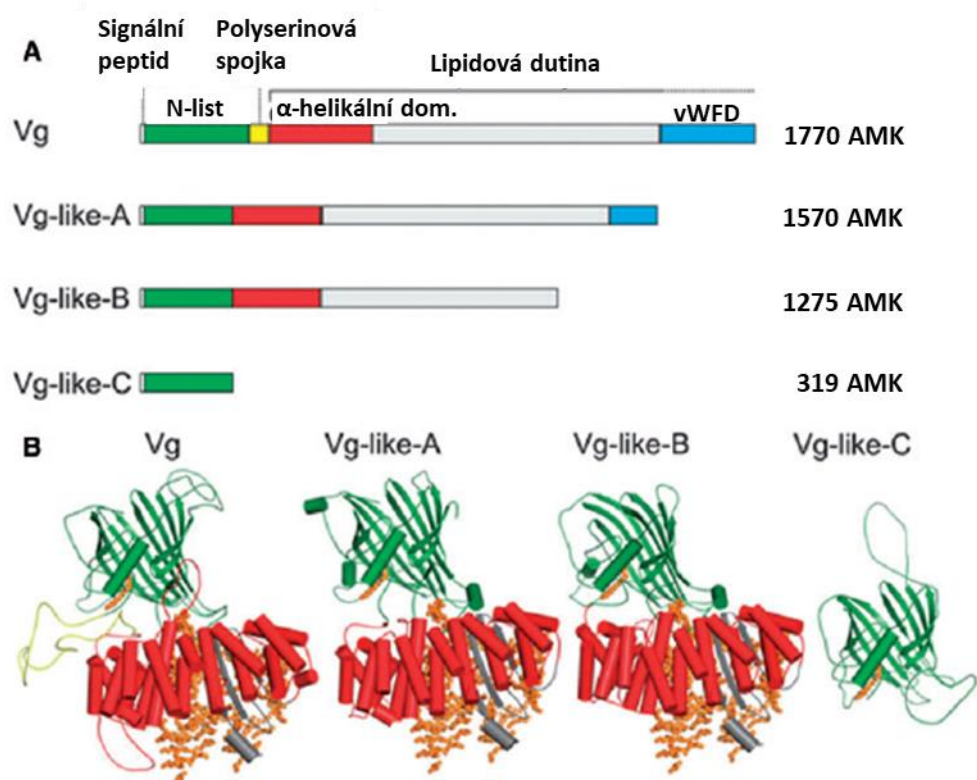
Vitellogenin je relativně větší protein (180 kDa) pocházející z jediného transkriptu, jehož velikost u včel je 5,8 kbp (Wheeler a Kawooya, 1990). Z něj vzniká polypeptidový produkt o velikosti 1770 aminokyselin včetně 16 reziduí aminokyselin signálního peptidu. U včel se nachází pouze jeden gen *vitellogeninu* (Piulachs *et al.*, 2003; Guidugli *et al.*, 2005; Tufail a Takeda, 2008). K regulaci jeho transkripce dochází u hmyzu pomocí hormonů, konkrétně u včel se jedná o juvenilní hormon (Piulachs *et al.*, 2003; Guidugli *et al.*, 2005).

Vědcům se podařilo najít u blanokřídlých tři geny homologní k genu *vitellogeninu*, které jsou označovány jako *vg-like-A*, *-B* a *-C* (Morandin *et al.*, 2014). Tyto geny pravděpodobně vznikly ve dvou oddělených duplikačních událostech. U původního genu *vitellogeninu* došlo k duplikaci v rané fázi vývoje hmyzu, načež z jedné kopie tohoto genu vznikly *vg-like-A* a *-B* geny a z druhé gen *vitellogeninu* a *vg-like-C* gen (Morandin *et al.*, 2014). Avšak *vg-like* geny se u včel od genu *vitellogeninu* značně liší svým umístěním, *vitellogenin* leží na chromosomu LG4, *vg-like-A* na chromosomu LG13 a *vg-like-B* a *-C* na stejném chromosomu LG2 (Salmela *et al.*, 2016). *Vg-like* geny jsou také více konzervovány než gen *vitellogeninu* (Morandin *et al.*, 2014). Ten totiž prochází u včel rychlým vývojem, přestože ovlivňuje více fenotypových projevů (tzv. pleiotropní efekt) (Kent *et al.*, 2011).

2.1.2 Struktura vitellogeninu

Včelí vitellogenin je monomerní fosfolipoglykoprotein (Wheeler a Kawooya, 1990), který se skládá z N-listu, polyserinové spojky a lipidové dutiny, ta je dále tvořena alfa-helikální doménou a vWFD (von Willebrandův faktor, typ D) doménou (Obr. 1) (Amdam *et al.*, 2012).

N-list obsahuje dvě smyčky, které jsou typické pro hmyz a obsahují mnoho nabitých reziduí aminokyselin. Tyto smyčky nepůsobí pouze jako spojky, ale mohou také zastávat důležitou funkci ve struktuře proteinu. Kromě nich se na beta-skládaných listech N-listu nachází i plocha s kladným nábojem, která obvykle může tvořit vazbu se záporně



Obr. 1 Struktura domén vitellogeninu a proteinů vg-like-A, -B a -C u včely medonosné. A) Lineární struktura aminokyselinových sekvencí. B) Částečně homologní modely jednotlivých proteinů. Lipidy (oranžově) jsou zaznamenány podle templatové struktury. Barvy v části A odpovídají barvám domén v části B. V modelech není vyobrazena většina lipidové dutiny a vWFD doména. (AMK – aminokyseliny) (upraveno podle Salmela *et al.*, 2016).

nabítenými ligandy (Amdam *et al.*, 2012). Uvnitř N-listu se ještě nachází kladně nabitá hydrofobní dutina, kde by teoreticky mohlo docházet k vazbě mastných kyselin (Havukainen *et al.*, 2011a).

Alfa-helikální doména může teoreticky vázat kovy (Amdam *et al.*, 2012). Součástí vWFD domény jsou sice cysteinová rezidua, nicméně se zatím nepodařilo určit její konkrétní funkci (Tufail a Takeda, 2008; Amdam *et al.*, 2012).

U vitellogeninu většiny hmyzích druhů dochází v buňkách tukových tělísek při posttranslačních modifikacích k rozdělení na dva či více fragmentů, většinou na menší N-terminální (N-list) a větší C-terminální (zbývající část molekuly), které jsou před rozštěpením propojeny polyserinovou spojkou (della-Cioppa a Engelmann, 1987; Tufail a Takeda, 2008; Amdam *et al.*, 2012). Samotné rozštěpení obvykle nastává v sekvenci RXXR (R-arginin, X-libovolná aminokyselina) v blízkosti polyserinové spojky pomocí endoproteas (EC 3.4) (Barr, 1991; Rouillé *et al.*, 1995). Avšak u včel taková sekvence

chybí, tudíž je zatím nejasné, jak k tomuto štěpení dochází (Seehuus *et al.*, 2007). Teoreticky by mohlo být řízeno fosforylací, což je známo u jiných proteinů (Cohen, 2000).

Nerozštěpený vitellogenin má velikost 180 kDa, jeho fragmenty mají 40 kDa (N-list) a 150 kDa (zbývající část molekuly). Bylo zjištěno, že celý protein i jeho fragmenty jsou fosforylovány, což se podařilo určit u tohoto proteinu v hemolymfě i tukových tělískách (Havukainen *et al.*, 2011a).

Také bylo objeveno, že vitellogenin je glykosylován, konkrétně jsou na něm navázány dvě sacharidové jednotky, po rozštěpení proteinu zůstává na každém fragmentu jedna. Úseky, kde by mohlo ke glykosylaci docházet, jsou tři sekvence aminokyselin v pořadí asparagin-X-serin/threonin (X – libovolná aminokyselina kromě prolinu), jedna se nachází v N-terminálním fragmentu (Asn296) a dvě v C-terminálním fragmentu (Asn1067 a Asn1153) (Havukainen *et al.*, 2011a).

Při porovnávání celkové sekvence aminokyselin vitellogeninu včely a dalších 16 hmyzích druhů byly některé sekvenční motivy nalezeny u všech zkoumaných druhů. Avšak celková podobnost se pohybovala v rozmezí od 32 do 58 %, kdy se nejvíce shodovaly sekvence druhů ze řádu blanokřídlých (*P. nipponica* – 58 %, *A. rosae* – 54 %), kam spadá i včela medonosná (Piulachs *et al.*, 2003).

Vývoj částí vitellogeninu se může značně lišit. V N-terminálním fragmentu nedochází k mutacím, je tedy značně konzervován. Naopak v C-terminálním fragmentu jsou změny sekvence běžné, což značí tzv. pozitivní selekci (Kent *et al.*, 2011; Havukainen *et al.*, 2011b).

Strukturou se ve větší či menší míře shoduje vitellogenin s Vg-like proteiny. Vg-like-A obsahuje kromě polyserinové spojky a cysteinových reziduí (nachází se za typickou sekvencí GL/ICG (G-glycin, L-leucin, I-isoleucin, C-cystein) a jsou součástí vWFD domény (Tufail a Takeda, 2008)) všechny strukturní části vitellogeninu. U Vg-like-B chybí vWFD doména, kdežto Vg-like-C je tvořen pouze N-listem, a je tedy znatelně menší (Salmela *et al.*, 2016).

2.1.3 Lokalizace a biosyntéza vitellogeninu

U hmyzu se vitellogenin tvoří hlavně v tukových tělískách. Ty se nachází v podobě jedné vrstvy buněk pod tělní stěnou převážně v části zadečku, některé buňky tukových tělísek je možné nalézt i v hlavové a hrudní části. Tuková tělíska jsou složena ze dvou typů

buněk – oenocytů a trofocytů. Výhradně v trofocytech dochází k syntéze vitellogeninu (Guidugli *et al.*, 2005; Corona *et al.*, 2007; Amdam *et al.*, 2012). V trofocytech matek je exprese genu *vitellogeninu* vyšší než u dělnic (Lu *et al.*, 2018).

V buňkách tukových tělísek probíhá syntéza vitellogeninu na ribozomech, navázaných na drsné endoplasmatické retikulum. Z nich protein putuje do Golgiho aparátu, a poté se přes trans-Golgiho síť dostává do sekrečních granul, zatímco dochází k jeho posttranslačním modifikacím pomocí štěpení (Mazzini *et al.*, 1989; Snigirevskaya *et al.*, 1997; Giorgi *et al.*, 2005). Ačkoliv u včel nelze nalézt typickou sekvenci aminokyselin, kde u ostatních hmyzích druhů dochází k rozdělení molekuly vitellogeninu, v tukových tělískách včel byly pozorovány tři formy tohoto proteinu o velikostech 40, 150 a 180 kDa (Amdam *et al.*, 2003a). Přestože v hemolymfě převládá největší forma, u včel není znám mechanismus, vyskytující se u ostatních hmyzích druhů, kdy se podjednotky spojují a jejich vyměšování do hemolymfy probíhá ve formě jednoho velkého proteinu (della-Cioppa a Engelmann, 1987; Havukainen *et al.*, 2011a).

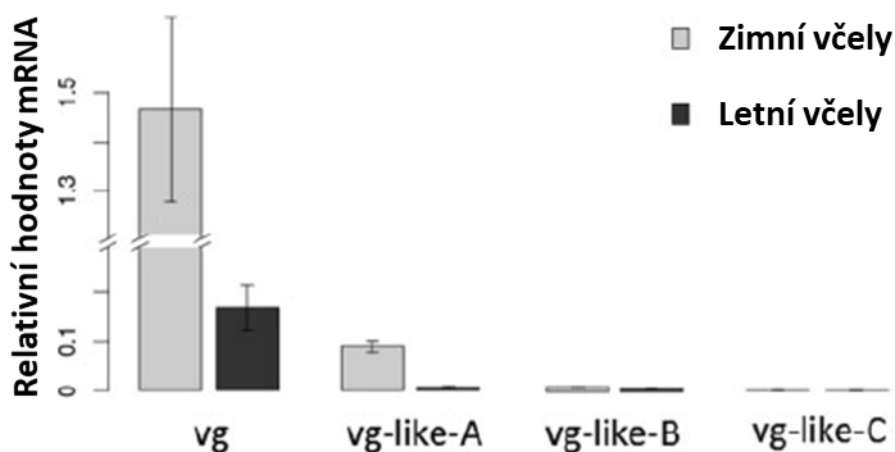
Z hemolymfy se následně vitellogenin dostává do oocytů, samičích pohlavních buněk, které se vyvíjejí ve vaječnicích. Do těchto buněk vstupuje pomocí receptorů (VgR), nacházejících se na jejich membráně, procesem nazývaným endocytosa. Vitellogenin navázaný na receptorech se pomocí transportních váčků přemísťuje do endosomu. V něm se okyselením oddělí od receptorů a následně putuje do zralých žloutkových tělísek, tam dojde k jeho přeměně na vitellin (Vn), který se zde ukládá pro další využití, zatímco receptory se vracejí na povrch membrány oocytů. (Raikhel a Dhadialla, 1992; Sappington a Raikhel, 1998; Snigirevskaya a Raikhel, 2005)

Vazebné vlastnosti vitellogeninu se liší v závislosti na doméně, účastníci se vazby. Pomocí alfa-helikální domény se váže na lipidové dvojvrstvy, pravděpodobně díky tomu je tedy možné nalézt vitellogenin v buněčných membránách některých tkání (Havukainen *et al.*, 2013). Pomocí N-listu se váže na receptory v membránách a proniká do cytosolu buněk. Tyto receptory se vyskytují na buňkách vaječníků matek, hypofaryngeálních žláz a tukových tělísek (Amdam *et al.*, 2003a; Guidugli-Lazzarini *et al.*, 2008; Münch *et al.*, 2015).

U včelích dělnic se vitellogenin ve vaječnicích obvykle nenachází, avšak může se dostávat do hypofaryngeálních žláz v hlavách dělnic krmiček, které vytváří mateří kašičku pro krmení larev, dalších dělnic a matky (Amdam *et al.*, 2003a). Vitellogenin by se podle prvních experimentů mohl nacházet také v mozku krmiček, konkrétně

v gliových buňkách, což jsou podpůrné buňky neuronů. V nich však nedochází k jeho tvorbě, tudíž je do nich pravděpodobně transportován (Münch *et al.*, 2015).

Expresí genu *vitellogeninu* se liší jak při porovnání mezi zimními a letními dělnicemi, tak oproti *vg-like* proteinům (Obr. 2). V zimních dělnicích bylo oproti letním dělnicím naměřeno 13x více *Vg-like-A* a 11x více vitellogeninu, kdežto hladiny *Vg-like-B* a -C byly zvýšeny jen 1,4x, respektive 0,4x. U zimních dělnic bylo změřeno 16x více vitellogeninu než *Vg-like-A*, u letních jej bylo 20x více. Dále jej bylo naměřeno 143x více než *Vg-like-B* u zimních dělnic a 18x více u letních dělnic. V zimních dělnicích jej bylo více než 10,000x více než *Vg-like-C* a u letních 358x více (Salmela *et al.*, 2016).



Obr. 2 Expresí genu *vitellogeninu* a *vg-like* genů u zimní generace včel a letních dělnic (průměr $\pm$ střední chyba průměru) (N = 30 včel zimní generace ze tří úlů a N = 49 letních dělnic z pěti úlů, 9-10 jedinců na úl). Expresí byla měřena pomocí qPCR a normalizována na referenční gen (*RP49* nebo *aktin*) (upraveno podle Salmela *et al.*, 2016).

2.2 Biologické funkce včelího vitellogeninu

2.2.1 Funkce vitellogeninu ve vývoji

Po dobu prvních třech dnů dospělého života se včely vylíhnuté z kukel stávají čistíčkami, které čistí buňky plástve. Následně přecházejí do fáze krmiček, starajících se o potomstvo. Hladina vitellogeninu se v tomto období může vyšplhat až na úroveň, kdy tvoří 40 % všech proteinů v hemolymfě (Engels *et al.*, 1990; Hagedorn a Moeller, 2015). Jejich vaječníky jsou malé a neaktivní. Následně u nich začínají probíhat změny v chování a fyziologii, jakmile dosáhnou věku 15 dnů. Zásadním rozdílem je růst hladiny juvenilního hormonu (Robinson, 1992a). Funkce slinných a hypofaryngeálních žláz se začíná zhoršovat. Jakmile se z krmiček stávají létavky, začínají sbírat pyl, nektar a vodu. Kromě toho se mění složení jejich potravy, místo pylu, bohatého na proteiny, konzumují med a nektar, bohaté na sacharidy (Bitondi *et al.*, 1994; Bitondi a Simões, 1996; Crailsheim a Stolberg, 1989).

Při uměle navozeném snížení exprese genu *vitellogeninu* dochází k přechodu z krmiček na létavky dříve, což může naznačovat, že vitellogenin zpomaluje tento děj (Guidugli *et al.*, 2005; Amdam a Omholt, 2003c; Nelson *et al.*, 2007). Zároveň při snížené transkripci genu pro vitellogenin létavky sbírají více nektaru, avšak i tato zvýšená množství jsou v mezích toho, kolik dokážou nasbírat při jeho neomezené funkci (až 60 mg nektaru a 30 mg pylu) (Page *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2007).

Krmičky získávají od létavek pyl, který využívají na tvorbu vitellogeninu a mateří kašičky. Tou poté krmí larvy, ostatní včely v úlu a dospělé létavky. Vzhledem k tomu, že jako jediné mají potřebné trávicí enzymy, jsou schopny využít aminokyseliny obsažené v pylu (Crailsheim, 1986). Zároveň se u nich nachází největší zásobárny proteinů ze všech letních včel v podobě hypertrofovaných tukových tělísek a hypofaryngeálních žláz, zajišťujících vyšší míru přežívání. Jedním z těchto proteinů je vitellogenin, obsahující aminokyseliny, ze kterých se v hypofaryngeálních žlázách tvoří mateří kašička. Jeho exprese pozitivně reaguje na úroveň hladiny aminokyselin v hemolymfě. Jakmile dojde k přechodu z krmiček na létavky, tvorba vitellogeninu klesá a zároveň atrofují tuková tělíska i hypofaryngeální žlázy. Kromě toho se značným způsobem snižují zásoby proteinů a lipidů. To vše má za následek oslabený fenotyp létavek (Crailsheim, 1990; Amdam *et al.*, 2003a; Amdam *et al.*, 2012). Naopak nejodolnějšími dělnicemi jsou včely tzv. zimní generace, u kterých se akumuluje velké množství vitellogeninu v tukových

tělískách a hemolymfě. Tyto včely se vyvíjejí v případě nepřítomnosti plodu (Amdam a Omholt, 2002; Seehuus *et al.*, 2006). Jejich dlouhověkost by mohla být zdůvodněna přežitím zimních nepříznivých podmínek až do jara, kdy se může vylíhnout nové potomstvo (Lee, 2003).

2.2.2 Funkce vitellogeninu v reprodukci

U sociálního hmyzu jsou jedinci v závislosti na schopnosti se rozmnožovat rozděleni do jednotlivých kast. Do těch u včel kromě trubců patří plodné matky a neplodné dělnice. Tyto dvě kasty se geneticky neliší. Jakákoliv samičí larva se tedy může stát matkou, avšak pouze v případě, že je adekvátně krmena, což znamená buďto větší přísun potravy, nebo specifický druh živin podávaný po delší časový úsek. Tímto rozdílným krmením vzniká následně specifická endokrinní odpověď, která zahájí vývoj určité kasty (Piulachs *et al.*, 2003).

Většinu včelí kolonie tvoří dělnice, jejichž matkou je jediná plodná samice. Ta sice klade velké množství vajíček, ale o potomstvo se už nestará. Tuto roli zastávají dělnice, a kromě toho také udržují teplotu a čistotu plodu (Münch a Amdam, 2010).

Vývoj matek je přirozeně spjatý s vývinem vaječníků. Díky vysokým hladinám juvenilního hormonu během larválního stádia je zachována až do dospělého života většina primordií ovariol, což jsou vaječné trubice, tvořící vaječníky. V důsledku toho má matka v každém vaječníku až 180 ovariol, díky čemuž může za den naklást více než 1000 vajíček, pro jejichž vývoj je důležitý vitellogenin. Naopak u dělnic po prodělání metamorfózy zůstane pouze 2-12 primordií ovariol (Rachinsky *et al.*, 1990; Hartfelder a Steinbrück, 1997; Capella a Hartfelder, 1998). To znamená, že jsou jejich reprodukční orgány značně zmenšené, další vývoj oocytů je pomocí feromonů zastaven a dělnice nejsou schopny reprodukce (Slessor *et al.*, 2005; Amdam *et al.*, 2012).

2.2.3 Funkce vitellogeninu v imunitě

Imunita hmyzu je založena na přirozené imunitní odpovědi, která je tvořena humorální a buněčnou složkou (Strand, 2008). Humorální složka představuje tvorbu antimikrobiálních peptidů v tukovém tělísku a jejich následné uvolňování do hemolymfy. Příkladem takového peptidu je lysozym, který hydrolýzou rozkládá buněčné stěny bakterií (Arrese a Soulages, 2010; Callewaert a Michiels, 2010). Buněčná složka imunity je reprezentována hemocyty, které kromě schopnosti fagocytózy a enkapsulace patogenu

vyměšují enzym phenoloxidasu (EC 1.14.18.1), který hraje roli při nodulaci, kdy je patogen zachycen několika vrstvami hemocytů. K obranyschopnosti hmyzu přispívají i fyzikální bariéry v podobě kutikuly, střev či vzdušnic (Strand, 2008; Marmaras a Lampropoulou, 2009; González-Santoyo a Córdoba-Aguilar, 2012).

V létě dochází u dělnic s přibývajícím věkem k poklesu počtu funkčních hemocytů, což je ve shodě nejen se zhoršenou schopností imunitních reakcí, ale také se snižujícím se množstvím vitellogeninu (Amdam *et al.*, 2004; Amdam *et al.*, 2005; Schmid *et al.*, 2008).

Dělnice létavky mají nejen méně vitellogeninu oproti ostatním dělnicím, ale i množství jejich hemocytů nebo imunocytů je nižší (Engels a Fahrenhorst, 1974; Bedick *et al.*, 2001; Amdam *et al.*, 2004). Navíc u jejich hemocytů dochází častěji k pyknóze, tedy zahuštění chromatinu v jádře, což nastává během apoptózy nebo nekrózy (Amdam *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2016). Takové imunitní buňky zřejmě nejsou schopny plnit své funkce při obraně organismu před infekcí (Strand a Pech, 1995). Pokud se však létavky přemění zpět na krmičky, imunitní buňky se obnovují (Amdam *et al.*, 2005; Münch a Amdam, 2010).

U savců je známo, že je v plazmě vázáno na proteiny více než 99 % zinku. Vitellogenin je považován za potenciální hlavní přenašeč zinku ve včelí hemolymfě. Bylo zjištěno, že rozdíly v množství zinku v hemolymfě včel lze vysvětlit hlavně změnami množství vitellogeninu. Zatímco u létavek bylo naměřeno nejméně zinku (0-4 ppm), u krmiček a zimních generace včel dosahovalo jeho množství vyšších hodnot (11-19 ppm, respektive 14-28 ppm). Také byl objeven pozitivní vztah mezi množstvím zinku v hemolymfě a celkovým množstvím funkčních hemocytů u dělnic. Zinek je důležitým katalytickým, strukturním a regulačním iontem. Jeho nedostatek může způsobovat oxidační stres, pyknózu hemocytů, apoptózu několika buněčných linií včetně hemocytů a zhoršenou imunitu. To by mohlo znamenat, že méně vitellogeninu u létavek může negativně ovlivňovat imunitu (Mocchegiani *et al.*, 2000; Amdam *et al.*, 2004; Amdam *et al.*, 2005; Münch a Amdam, 2010).

U hmyzu chybí buňky imunitní paměti a protilátky. Tudíž se myslelo, že hmyz nemá schopnost specifické imunity a jedinou obranou proti původcům nemocí je imunita nespecifická, zajišťovaná hemocyty. Avšak se zdá, že u hmyzu přece jenom lze nalézt vysokou specifitu imunitních reakcí, což znamená, že jejich imunitní buňky dokážou rozpoznat určitý patogen, dokonce bylo zjištěno, že jsou na něj schopny připravit

i potomstvo (Sadd *et al.*, 2005; Lemaitre a Hoffmann, 2007; Münch a Amdam, 2010; Freitak *et al.*, 2014).

Imunitní reakce jsou vyvolávány imunitními elicitory, pocházejícími z buněčné stěny patogenu, kterým jsou třeba bakterie či houby (Lemaitre a Hoffmann, 2007). Při tzv. trans-generační imunitní přípravě jsou fragmenty takového patogenu přenášeny z dutiny středního střeva (mesenteron) do hemocoelu (dutina, ve které proudí hemolymfa). Z něj putují do tukových tělísek, a nakonec se dostávají do vyvíjejících se vajíček (Freitak *et al.*, 2014).

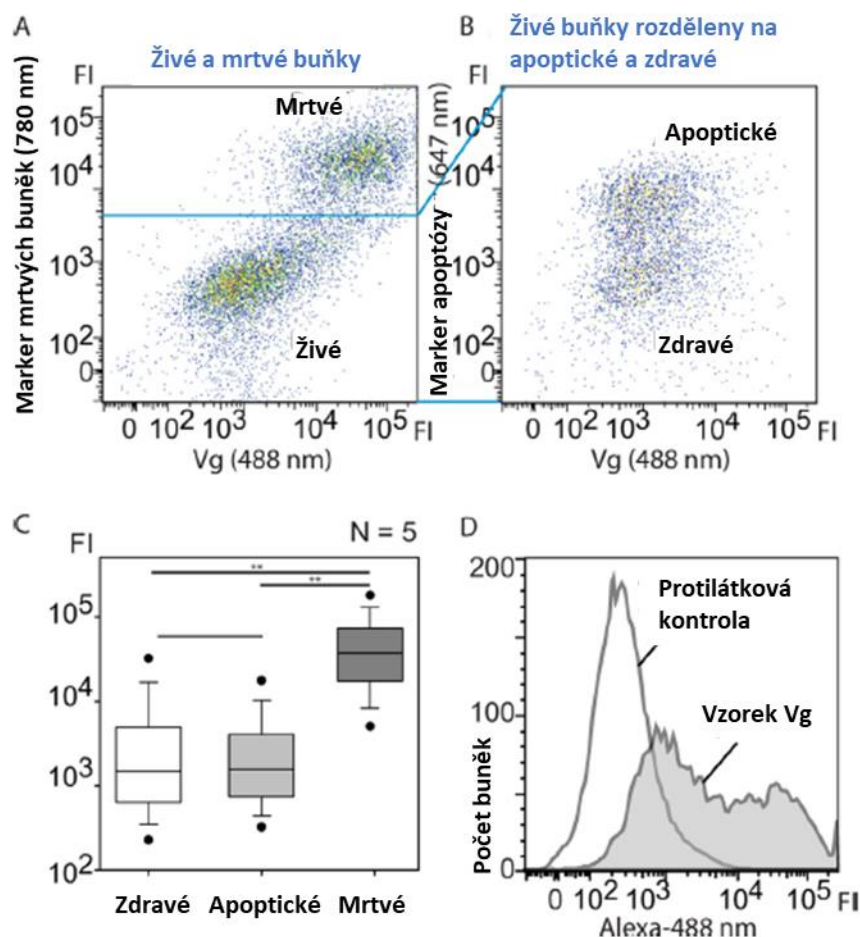
Hromadí se důkazy podporující hypotézu, že vystavení živým či mrtvým buňkám bakterií a imunitním elicitorům u mateřského organismu zvyšuje imunitní obranyschopnost u potomstva (Moret, 2006; Roth *et al.*, 2009; Freitak *et al.*, 2009; Hernández-Martínez *et al.*, 2010; Moreau *et al.*, 2012). Například bylo prokázáno, že pokud je včelí matce podán elicitor imunitní odpovědi v podobě usmrčené grampozitivní bakterie *Paenibacillus larvae*, způsobující mor včelího plodu, její potomek je vůči ní více odolný (Hernández López *et al.*, 2014). Na tuto a také na gramnegativní bakterii *Escherichia coli* se váže vitellogenin, přičemž vazba na *P. larvae* je silnější než na *E. coli*. Nicméně kromě toho se zjistilo, že vitellogenin přenáší části buněčné stěny *E. coli* do vyvíjejících se vajíček, což působí jako zmiňovaná imunitní příprava pro potomstvo (Salmela *et al.*, 2015).

Byla také naměřena vysoká vazebná afinita vitellogeninu na peptidoglykany (molekuly typické pro grampozitivní bakterie), a následně na lipopolysacharidy (typické pro gramnegativní bakterie). Naopak na zymosan (typický pro kvasinky) se vázal poměrně málo. Což by mohlo být vysvětleno adaptací na grampozitivní bakterie, ohrožující včelí larvy, *P. larvae* i *Melissococcus plutonius*, která způsobuje hnilobu včelího plodu (Salmela *et al.*, 2015).

Bylo zjištěno, že se vitellogenin váže na liposomy, obsahující fosfatidylserin, výběžky apoptických buněk nebo nekrotické buňky, bohaté na fosfatidylserin. Naopak jeho schopnost vázat se na zdravé buněčné membrány nebo liposomy s neutrálním fosfatidylcholinem je poměrně mírná. Vysvětlením by mohlo být, že alfa-helikální doména vitellogeninu má pravděpodobně vyšší afinitu k negativně nabitým poškozeným membránám, obsahujícím fosfatidylserin (Havukainen *et al.*, 2013; Salmela *et al.*, 2015).

Vitellogenin se také zhruba 25x více váže na mrtvé buňky než na živé, které byly při experimentu rozděleny na zdravé a apoptické buňky (Obr. 3). Mezi zdravými

a apoptickými buňkami nebyl zásadní rozdíl v četnosti vázání. Při podrobnějším zkoumání bylo vypořizováno, že se vitellogenin silně váže i na pozdní apoptické buňky. Kromě toho se dokáže navázat na buněčné výběžky, které jsou typické pro poškozené buňky, a také na nekrotické buňky (Havukainen *et al.*, 2013).



Obr. 3 Hmyzí buňky High Five (rodičovská linie buněk kovolesskele cizokrajného (*Trichoplusia ni*)) inkubovány s vitellogeninem. Metoda FACS (fluorescenčně-aktivované třídění buněk) detekovala vysokou afinitu vitellogeninu k mrtvým buňkám. A) a B) Bodový graf zobrazující vitellogenin, značený pomocí Alexa-488, dále marker mrtvých buněk (A, Viability Dye) a marker apoptických buněk (B, „marker apoptózy“, annexin V Alexa-647). Emisní vlnové délky fluorescentních značek jsou vyobrazeny. Každý bod představuje jednu buňku a barevný gradient znázorňuje hustotu buněk. FI: intenzita fluorescence. A) Silný signál značeného vitellogeninu kolokalizován s markerem mrtvých buněk, což značí jeho vysokou afinitu k těmto buňkám. B) Graf v této části je zvětšením oblasti živých buněk v části A. Živé buňky byly rozdělány na brzké apoptické (vysoká intenzita fluorescence annexinu V) a zdravé buňky, na oba typy buněk se vázal vitellogenin. C) Statistické vyjádření intenzity fluorescence pěti měření ($n = 5$). Vitellogenin se signifikantně více (25x) vázal na mrtvé buňky než na zdravé či brzké apoptické. (Odchylka – S. E.) D) Vzorek buněk inkubovaných s vitellogeninem oproti kontrole pozadí. Kontrolní buňky inkubovány pouze s protilátkami značenými Alexa-488 (upraveno podle Havukainen *et al.*, 2013).

Funkce vitellogeninu v trans-generační imunitní přípravě tvoří jednu část z jeho dvojí role, kde druhou částí je jeho fungování v reprodukci. Při imunitní přípravě je potřeba, aby byla matka vystavena fragmentům buněčné stěny těsně před rozmnožováním nebo během něj (Havukainen *et al.*, 2011b; Salmela *et al.*, 2015).

2.2.4 Funkce vitellogeninu v dlouhověkosti a antioxidační ochraně včel

U živočichů se vyvinula široká škála protizánětlivých a antioxidačních procesů, která slouží ke zpomalování oxidačního poškození buněčných součástí a stárnutí buněk, tkání a celých organismů. Zahrnuje proteiny, např. lipoproteiny, které mohou překrývat hydrofobní povrchy, způsobené záněty. Ty mohou být důsledkem poranění či oxidačního poškození. Lipoproteiny plní mnoho různých funkcí, např. přenášejí lipidy z jater do periférních tkání, a naopak. Také transportují jedovaté cizorodé sloučeniny z míst infekce, a u lidí mají velký vliv na zdraví a délku života (Atzmon *et al.*, 2002; Seong a Matzinger, 2004; Cho a Seong, 2009; McKay *et al.*, 2011; Hausman *et al.*, 2012; Feingold a Grunfeld, 2012).

Hladina vitellogeninu, patřícího mezi lipoproteiny, v hemolymfě dělnic pozitivně koreluje s mírou přežití včel po injekčním podání paraquatu (N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid – organická sloučenina, běžně používaná jako herbicid, indukující tvorbu reaktivních forem kyslíku). Proto byl proveden experiment, kde při podání paraquatu dělnicím se sníženým množstvím mRNA vitellogeninu (vg^-) pomocí metody RNAi a normálním dělnicím (vg^+), došlo ke snížení míry přežití u vg^- . Kontrolní skupiny vg^- a vg^+ , kterým byla podána voda bez nukleas (EC 3.1), přežívaly ve stejné míře. Jedná se tedy patrně o kauzální vztah mezi aktivitou vitellogeninu a rezistencí včel vůči oxidačnímu stresu (Amdam *et al.*, 2003b; Seehuus *et al.*, 2006; Tufail a Takeda, 2008).

V navazujícím experimentu bylo testováno, zdali může mít vitellogenin vlastnosti, které by plnily antioxidační funkci. Proto bylo měřeno, v jaké míře způsobuje paraquat oxidační poškození přednostně tohoto proteinu. Načež se zjistilo, že vitellogenin byl více karbonylován než apolipoprotein 1 a hexamerin, což je v souladu s hypotézou, že vitellogenin může fungovat jako antioxidant (Seehuus *et al.*, 2006).

Při zkoumání fyziologických markerů v hemolymfě po podání paraquatu bylo zjištěno, že imunitní buňky u skupiny vg^- vytvářejí vysoce reaktivní formy kyslíku (hROS). Jejich hodnoty byly podobné jako u buněk vystavených 30% H_2O_2 a znatelně se lišily od těch

u kontrolní skupiny. Navíc se v hemolymfě skupiny *vg*⁻ nacházelo vyšší množství imunitních buněk, které byly ve fázi pyknózy. Vyskytovaly se zde i volně plující buňky tukových tělísek. Důležitý byl také nález rozpadnutého aktinového cytoskeletu tukových tělísek. Tyto poznatky naznačují spojitost mezi zvýšenou úmrtností u skupiny *vg*⁻ a buněčným poškozením včetně toho oxidačního u tukových tělísek (Seehuus *et al.*, 2006).

U letních dělnic byl proveden experiment, který se zaměřil na změny exprese genu *vitellogeninu* a *vg-like* genů po podání injekce paraquatu, způsobující oxidační stres a zároveň zánět po vpichu jehly, nebo po podání injekce fyziologického roztoku, způsobující pouze vznik zánětu po vpichu jehly. Byla naměřena značně zvýšená exprese genu *vitellogeninu* i *vg-like-A* genu v obou skupinách v porovnání s kontrolní skupinou, která nedostala žádnou injekci. U *vg-like-A* genu se jednalo dokonce o vyšší nárůst exprese než u genu *vitellogeninu*. Avšak ani u jednoho genu nebyl zjištěn významný rozdíl v expresi mezi skupinami s injekcí paraquatu a fyziologického roztoku. Je tedy pravděpodobné, že nárůst byl způsoben samotným zánětem po vpichu jehly u obou skupin. Injekce paraquatu také zapříčinila výrazně zvýšenou expresi *vg-like-B* genu oproti kontrole, nicméně ani rozdíl mezi skupinou s paraquatem a fyziologickým roztokem, ani mezi skupinou s fyz. roztokem a kontrolou nebyl významný. Exprese *vg-like-C* genu se nijak signifikantně nelišila ani u jedné ze tří skupin (Salmela *et al.*, 2016).

Paraquat, podaný ve formě injekce, má rozdílný vliv na dělnice a matky. Matky mají po jeho podání znatelně vyšší míru přežití. Je tedy pravděpodobné, že jsou více odolné vůči oxidačnímu stresu (Corona *et al.*, 2007).

Hladina vitellogeninu pozitivně koreluje se schopností tolerovat oxidační stres, jelikož vitellogenin díky svým antioxidačním vlastnostem chrání ostatní molekuly, nacházející se v hemolymfě. Radikálová teorie stárnutí říká, že rovnováha mezi množstvím reaktivních forem kyslíku a antioxidantů je zásadní pro inhibici chronických zánětů a nemocí spojených se stárnutím (Harman, 1956; Seehuus *et al.*, 2006).

Délka života je ovlivňována množstvím vitellogeninu. Při experimentu, kdy byla hladina tohoto proteinu redukována pomocí RNAi metody, žily dělnice kratší dobu. Což je částečně způsobeno rychlejším přechodem do stádia létavek, které rychle hynou. Nicméně takové včely jsou méně odolné vůči oxidačnímu stresu, který může podle zmiňované radikálové teorie stárnutí být příčinou poškození lipidů, proteinů, DNA a mitochondrií. To vede ke zhoršení buněčné integrity a funkčnosti. Takové škody mohou

být důvodem stárnutí (Sohal a Weindruch, 1996; Finkel a Holbrook, 2000; Sohal, 2002; Seehuus *et al.*, 2006; Terman a Brunk, 2006; Nelson *et al.*, 2007).

U starých dělnic lze pozorovat několik projevů stárnutí. Prvním z nich je změněný stav trofocytů. Ty mají tmavou cytoplazmu a hrubou a nejasnou morfologii organel, které jsou rozmístěné blízko sebe. Naopak u mladých dělnic je cytoplazma homogenní a jasná, a také mají zřetelnou morfologii organel. Dalším znakem je zvýšená tvorba SA- β -Gal (EC 3.2.1.23, beta-galaktosidasa spojená se stárnutím, nachází se v lysosomu) a lipofuscinu (intralysosomální polymerní materiál) v trofocytech a dalších buňkách tukového tělíska. Jejich hromadění je považováno za spolehlivý ukazatel stárnutí. V těchto buňkách také dochází s rostoucím věkem k peroxidaci lipidů a oxidaci proteinů. U stejných buněk nebyla zaznamenána změna v aktivitě telomeras (EC 2.7.7.49), ani nedošlo ke zkrácení délky telomer, což by mohlo znamenat, že se tyto buňky po vylíhnutí dělnic již nedělí (Hsieh a Hsu, 2011).

Vzhledem k tomu, že se s rostoucím věkem snižuje u dělnic exprese vitellogeninu, jsou staré dělnice ochuzeny o ochranu před oxidačním stresem. Tím pádem jsou zranitelnější při tvorbě reaktivních forem kyslíku, což vede k jejich rychlejšímu stárnutí. Takové včely jsou navíc náchylnější při hladovění nebo teplotním stresu. Z dělnic jsou vůči oxidačnímu stresu nejvíce odolné včely zimní generace, které mají nejvyšší hladinu vitellogeninu (Fluri *et al.*, 1977; Hartfelder a Engels, 1998; Seehuus *et al.*, 2006; Remolina *et al.*, 2007; Münch a Amdam, 2010; Münch *et al.*, 2013; Aurori *et al.*, 2014).

V trofocytech a oenocytech matek je v porovnání s dělnicemi zvýšená syntéza nejen vitellogeninu, ale i ekdysteroidu. Navíc jsou u nich aktivnější buněčné funkce a cholesterol-hydroxyekdyson-vitellogeninová dráha, což je hypotetická metabolická dráha, jejímž regulátorem má být cholesterol a výsledným produktem vitellogenin. Z toho lze předpokládat, že tato dráha může ovlivňovat délku života těchto buněk, a tudíž může mít spojitost s dlouhověkostí matek (Lu *et al.*, 2018).

2.3 Vztah včeliho vitellogeninu a hormonů

Hormony, které se u hmyzu zapojují do regulace transkripce *vitellogeninu*, jsou juvenilní hormon, ekdyson a neuropeptidy. Juvenilní hormon ovlivňuje transkripci *vitellogeninu* u mnoha hmyzích druhů a u včel je pravděpodobně jediným hormonem s touto funkcí. Jedná se o seskviterpenoid, k jehož tvorbě a sekreci dochází v *corpus allatum*. Je známo, že působí jako negativní regulátor metamorfózy. Kromě toho ovšem má důležitou funkci

jakožto gonadotropin u dospělých jedinců mnoha druhů hmyzu. Avšak u vysoce eusociálního hmyzu, kam spadají včely a některé druhy termitů či mravenců, již nemá tuto roli, ale spíše reguluje dospívání a dělbu práce u kasty dělnic (Tufail *et al.*, 2014; Amsalem *et al.*, 2014).

Transkripce *vitellogeninu* je závislá na napojení komplexu hormon-receptor na elementy reagující na hormon (HRE), které se obvykle nacházejí v horní („upstream“) regulační oblasti genů. Jedná se o krátké sekvence (~15 bp), obsahující prvky palindromické symetrie, přímé repetice nebo invertované repetice v mnoha kopiích. Co se týče receptorů pro juvenilní hormon, dvěma potenciálními jsou jaderný receptor „ultraspiracle“ (USP) a protein „methoprene-tolerant“ (MET), patřící do proteinové rodiny bHLH-PAS (Segraves, 1994; Tufail *et al.*, 2014).

Na rozdíl od většiny hmyzích druhů u včel nedochází k pozitivní korelaci mezi hladinami juvenilního hormonu a vitellogeninu. U dělnic je v prvních dvou až třech týdnech dospělého života, tedy ve fázi krmiček starajících se o potomstvo, hladina juvenilního hormonu nízká, avšak u létavek se zvyšuje. Opačným způsobem se mění hladina vitellogeninu. Zatímco u vylíhlých matek jsou vitellogenin i juvenilní hormon na vysoké úrovni, následně hladina juvenilního hormonu klesá, ale množství vitellogeninu se nemění (Raikhel a Dhadialla, 1992; Fahrbach *et al.*, 1995; Hartfelder a Engels, 1998; Bloch *et al.*, 2002; Fluri *et al.*, 2015).

Přechod ze stádia krmiček do stádia létavek se snaží popsat tzv. model dvou represorů, zpomalujících tento proces, kde prvním vnitřním represorem je samotný vitellogenin. Druhý, vnější represor obsahuje kontaktní feromon ethyloléat a je produkován létavkami. Jakmile dojde k poklesu množství vitellogeninu, vzroste hladina juvenilního hormonu, který tím, že potlačuje vitellogenin, udrží včely ve stádiu létavek (Amdam a Omholt, 2003c; Leoncini *et al.*, 2004).

Vysoká hladina juvenilního hormonu u dělnic značně snižuje jak transkripci, tak i množství vitellogeninu. Ten působí spolu s juvenilním hormonem v negativní zpětnovazební smyčce, kdy ve stádiu krmiček potlačováním hladiny tohoto hormonu zpomaluje přechod do stádia létavek (Pinto *et al.*, 2000; Amdam a Omholt, 2002; Amdam *et al.*, 2003a; Corona *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012).

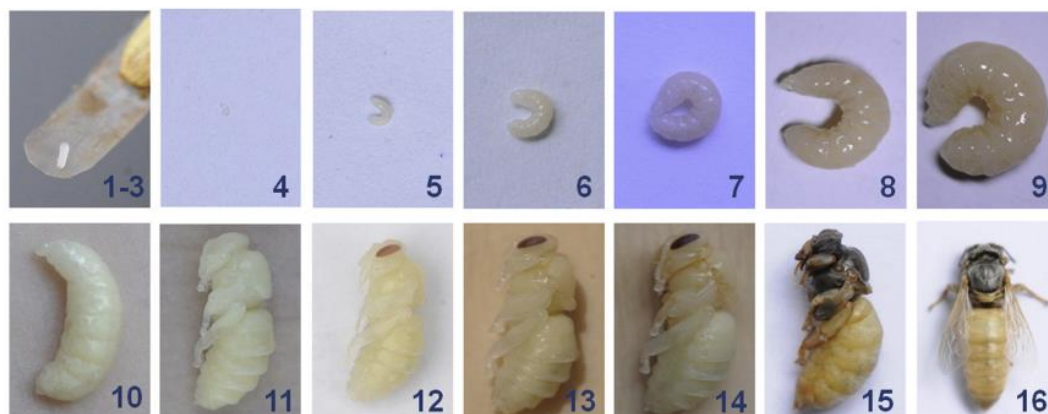
Změny v podobě zhoršení imunity a zvýšení náchylnosti na oxidační stres při přechodu krmiček na létavky mohou být paradoxně prospěšné pro kolonii. Létavky jsou vystavovány mnoha patogenům při sbírání pylu či nektaru, které by mohly ohrozit

kolonii. Avšak vzhledem k jejich chatrné obranyschopnosti často umírají dříve, než nákazu přinesou do hnízda. Stres, poranění či nemoci u krmiček zvyšují hladinu juvenilního hormonu, tím pádem zajišťují přechod do stádia létavek a urychlují tak jejich případnou smrt mimo kolonii v případě infekce (Amdam a Seehuus, 2006; Seehuus *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2007; Amdam, 2011).

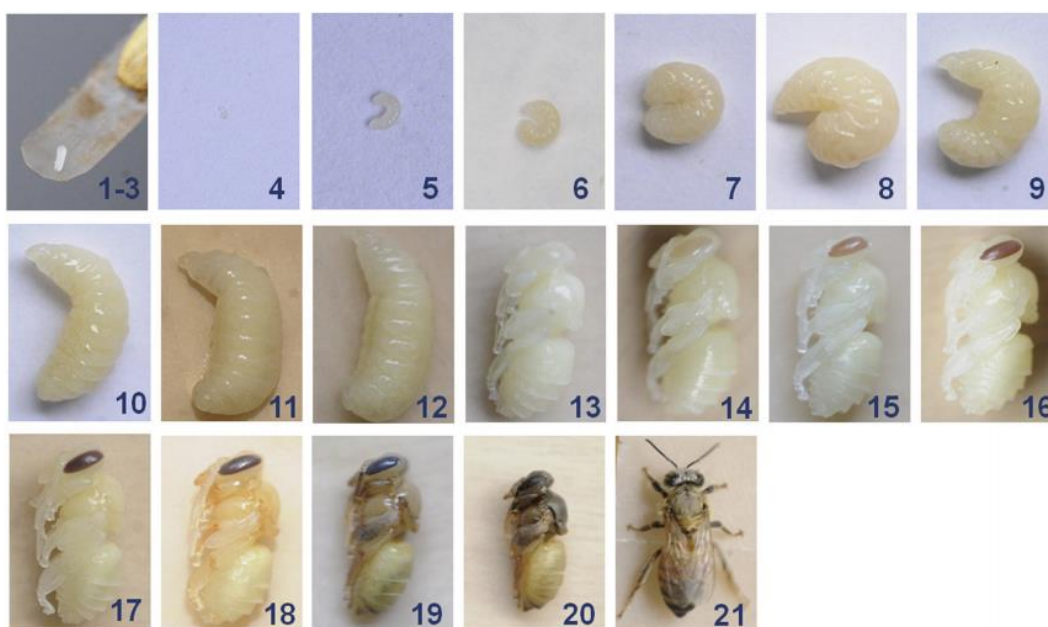
2.4 Rozdíly mezi kastami z pohledu včelího vitellogeninu

Rozdíl mezi kastami je zřetelný při porovnání tvorby vitellogeninu. U matky nastává jeho syntéza ve stádiu kukly ve fázi Pbm, při které má kukla hnědé oči a středně zbarvenou kutikulu, tedy 60 hodin před tím, než se stane dospělou (Obr. 4). S vývojem kukly jeho množství dále stoupá. Jakmile dojde k vylíhnutí matky, vitellogenin dosáhne nejvyšší hodnoty a začne se ukládat v hemolymfě. Již v prvních třech dnech dospělosti tvoří 70 % všech proteinů hemolymfy a po zbytek jejich života se to nezmění. U dělnic je tomu trochu jinak. Vitellogenin se u nich začíná tvořit 10 hodin před vylíhnutím ve fázi Pha, kdy je jedinec už kompletně vyvinutý, avšak se ještě nevylíhnul z kukly (Obr. 5). Během jejich dospělého života je nadále možné tento protein detekovat, přestože nedochází k takové syntéze jako u matek. U trubců probíhá jeho syntéza výhradně v prvních dnech života dospělců (Trenczek a Engels, 1986; Trenczek *et al.*, 1989; Engels *et al.*, 1990; Barchuk *et al.*, 2002).

Množství vitellogeninu v hemolymfě i v tukových tělískách je nejvyšší u dlouhověké zimní generace včel (60-90 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ hemolymfy). Naopak nejméně jej lze detekovat u létavek (0-5 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ hemolymfy), žijících z dělnic nejkratší dobu (Seehuus *et al.*, 2006).



Obr. 4 Ontogenetický vývoj včelích matek. Číslo značí počet dnů od nakladení vajíček (Wang *et al.*, 2015).



Obr. 5 Ontogenetický vývoj včelích dělnic. Číslo značí počet dnů od nakladení vajíček (Wang *et al.*, 2015).

Vývoj je u včel přizpůsobivý. Létavky se mohou navrátit do stádia krmiček, při jejich nepřítomnosti v kolonii. A také naopak mohou krmičky v případě potřeby urychleně přejít do stádia létavek. Nicméně za nepřítomnosti plodu, který by potřeboval péči, se zhoršuje schopnost létavek shánět potravu. Při takové situaci se obvykle vyvíjí již zmiňovaná odolná zimní generace včel (Robinson *et al.*, 1992b; Huang a Robinson, 1996; Amdam a Omholt, 2003c; Münch a Amdam, 2010).

Matky a dělnice se znatelně liší složením jejich potravy. To navíc může hrát roli v rozdílné délce jejich životů. Dospělé matky jsou krmeny zejména mateří kašičkou, bohatou na lipidy, sacharidy a proteiny, kdežto dělnice se v dospělosti živí zejména uloženým medem a pylem, v menší míře pak mohou konzumovat žlázné sekrety jiných dělnic. V případě, kdy byly uměle krmeny malým množstvím mateří kašičky, se jejich fenotyp začal podobat matkám, například byly aktivovány jejich vaječníky nebo se jim prodloužila doba dožití. Účinek mateří kašičky v potravě může tedy být teoreticky spjat s geny, které ovlivňují rozmnožování a délku života (Rembold a Dietz, 1966; Crailsheim, 1991; Lin a Winston, 1998; Wang *et al.*, 2014a; Yang *et al.*, 2017; Cardoso-Júnior *et al.*, 2021).

Délka života se mezi jednotlivými kastami zásadně liší. U krmiček se začíná projevovat proces stárnutí po 30-50 dnech, zatímco u včel zimní generace k tomu dochází až po zhruba 8 měsících (Smedal *et al.*, 2009). Oproti tomu létavky hynou během 7-10 dní. (Remolina *et al.*, 2007; Münch a Amdam, 2010). Trubci se dožívají v průměru zhruba 30 dnů (Rueppell *et al.*, 2005).

2.5 Metody studia vlastností vitellogeninu

Metody, které jsou využívány ke studování různých proteinů včetně vitellogeninu, lze rozdělit do tří kategorií. Za prvé se jedná o kvantitativní metody, které měří množství jednotlivých složek ve vzorku a dále se dělí na *in vitro* analýzy obsahu proteinu ve vzorcích a mikroskopické metody. Mezi *in vitro* analýzy patří metody elektroforetické (SDS-PAGE), imunochemické (Western blot), spektrofotometrické a kombinace chromatografie a hmotnostní spektrometrie (LC-MS). Příkladem mikroskopických metod je imunofluorescence. Druhým typem metod je stanovování exprese genů, kdy se využívá metody qPCR nebo syntézy cDNA. Za třetí se jedná o kvalitativní metody, které zkoumají, jaké složky jsou obsaženy ve vzorku a jaká je jejich struktura, k čemuž se využívá například hmotnostní spektrometrie, případně i ve spojení s MALDI-TOF metodou (Berg *et al.*, 2002; Pelley, 2012; Hnasko a Hnasko, 2015; Joshi a Yu, 2017; Petrova a Sauer, 2017; Kuang *et al.*, 2018; Sengupta *et al.*, 2019).

2.5.1 Imunofluorescence

Imunofluorescence je jedna z imunohistochemických technik, která slouží k vizualizaci různých buněčných antigenů, např. proteinů. Může být také využita k lokalizaci takových molekul v tkáních. Aby mohla být syntéza proteinu detekována, vybraný biologický vzorek je inkubován spolu s protilátkou, specifickou pro tento konkrétní protein. Protilátka může být rovnou navázána na fluorofor (přímá fluorescence) nebo může být detekována sekundární protilátkou s navázaným fluoroforem (nepřímá fluorescence). Fluorofor je sloučenina, která po ozáření světlem o určité vlnové délce emituje světlo o jiné vlnové délce. K vizualizaci se následně používá fluorescenční nebo konfokální mikroskop (Joshi a Yu, 2017).

Imunofluorescenci pro analýzu vitellogeninu využili například Havukainen *et al.* (2011a), kteří za použití králičích primárních a anti-králičích sekundárních protilátek s navázaným fluorochromem Cy3 tento protein identifikovali na řezech tukových tělísek včel medonosných.

2.5.2 Purifikace proteinů

Purifikace proteinů slouží k získání určitého proteinu z komplexního vzorku. Jeho přítomnost je potřebné kontrolovat pomocí analýz, které rozpoznávají jeho specifické vlastnosti. Čím specifitější je taková analýza, tím efektivněji probíhá celá purifikace. Prvním krokem purifikace je homogenizace, tedy narušení buněčné membrány. Následuje opakovaná centrifugace, kdy vznikají frakce o různé hustotě. Jednotlivé frakce stále většinou obsahují stovky různých proteinů. Na základě analýzy vlastností proteinů je určitá frakce vybrána k dalším podrobnějším purifikačním technikám, jako jsou např. vysolování, dialýza, gelová chromatografie, ionexová chromatografie, afinitní chromatografie či vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Každý krok purifikace bývá kontrolován pomocí elektroforézy. Nakonec lze stanovit molekulovou hmotnost proteinů pomocí ultracentrifugace nebo hmotnostní spektrometrie (Berg *et al.*, 2002).

Havukaninen *et al.* (2011a) popsali, jakým způsobem lze purifikovat vitellogenin z hemolymfy nebo z tukových tělísek.

Hemolymfa byla nejprve odebrána z uspaných včel skrze malý zářez v tělní stěně zadečku. Následně byla rozpuštěna ve 100 μ l PBS (fosfátem pufovaný solný roztok) s inhibitorem proteas a 1 mmol.l^{-1} disodné soli EDTA (ethylendiamintetraoctové kyseliny). Poté byla zmrazena pro pozdější použití. Po jejím rozmrazení byl centrifugací

při 20800 *g* a 4 °C po dobu 20 min. odstraněn debris (zbytky odumřelých buněk) a poté byl supernatant přefiltrován přes stříkačkový filtr. Následovala ionexová chromatografie za použití 50 mmol.l⁻¹ NaPO₄ pufru a 0-0,45 mol.l⁻¹ NaCl gradientu, sloužící k odstranění hlavních proteinů v hemolymfě (apolipoforinů a hexamerinů). Poté byla provedena afinitní chromatografie za použití konkavalinu A, ConA (konkavalin A) pufru, inhibiční směsi bez EDTA a odsolovací kolony PD-10. Purifikační postup byl kontrolován prováděním SDS-PAGE se 4-20% gradientem, při níž byly gely barveny barvivem Coomassie Brilliant Blue.

Tuková tělíska byla izolována tak, že nejprve byla z těla včel odstraněna většina tkání zadečku. Načež byla od těla oddělena zbývající část zadečku, obsahující tělní stěnu s tukovými tělísky, a zamražena při -80 °C. Později byla část zadečku s tukovými tělísky rozmělněna a vložena do 20 mmol.l⁻¹ HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina) pufru (pH 7) s 0,2 mol.l⁻¹ NaCl a inhibitory proteas. Vzorky poté byly promíchány na vortexu a sonikovány. Následně byly centrifugovány 20 min. při 4 °C, 20800 *g* a supernatant byl přefiltrován jako u vzorku hemolymfy. Poté došlo k opětovnému zamražení, rozmražení a centrifugování. Vzorek byl umístěn na kolonu pro vylučovací chromatografii, kde byly proteiny rozděleny podle velikosti. Frakce tvořená hlavně vitellogeninem byla sesbírána. Následně byla provedena ionexová chromatografie a afinitní purifikace s konkavalinem A. Kontrola purifikace opět proběhla pomocí SDS-PAGE.

2.5.3 Western blot

Western blot je technika složená z několika kroků. Prvním je separace proteinů pomocí gelové elektroforézy. Následuje jejich přenos na membránu a poté selektivní detekce antigenu za použití protilátek. Jedná se o důležitou a běžnou metodu pro analýzu proteinů. Závisí zejména na specifitě vazby protilátky na antigen. Je vhodná pro kvalitativní či semikvantitativní identifikaci určitého proteinu a jeho molekulové hmotnosti ve složité směsi (Hnasko a Hnasko, 2015).

Havukainen *et al.* (2011a) použili techniku Western blot pro identifikaci vitellogeninu po provedené SDS-PAGE se 4-20% gradientem, která sloužila k separaci proteinů. Ty byly poté z gelu přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Při Western blotu byly použity primární a sekundární protilátky. Sekundární protilátky nesly křenovou peroxidasu (EC 1.11.1.7) umožňující detekci vitellogeninu na nitrocelulosové membráně.

2.5.4 HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je formou sloupcové chromatografie, u které pod vysokým tlakem prochází vzorek (analyt) rozpuštěný v rozpouštědle (mobilní fáze) skrze sloupec (kolonu), ve kterém je obsažena stacionární fáze. Na základě vlastností vzorku, rozpouštědla a stacionární fáze se liší retenční čas analytů, tedy doba, po kterou prochází kolonou. Analyty, které se nejsilněji vážou na stacionární fázi, opouštějí kolonu nejpozději, mají tedy nejdelší retenční čas. Naopak vzorky, které měly nejslabší interakci se stacionární fází, vychází z kolony nejrychleji s nejkratším retenčním časem. Mobilní fáze následně prochází skrze detekční zařízení, což může být fluorimetr či detektor absorpance v UV záření. Vzniká zde signál, odpovídající množství analytu, které opustilo kolonu. Takový signál je poté zaznamenán v kontrolním počítačovém programu a může být využit při dalších analýzách (Petrova a Sauer, 2017).

Havukainen *et al.* (2011a) použili nano-HPLC k separaci peptidů, vzniklých naštěpením vitellogeninu pomocí trypsinu (EC 3.4.21.4), přičemž byla využita kolona s reverzní fází (nC18), propojená s hmotnostním spektrometrem.

2.5.5 Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie je metoda používaná k identifikování neznámé sloučeniny ve vzorku. Případně může sloužit ke kvantifikaci známé sloučeniny. Funguje na principu ionizace molekul a jejich třídění na základě poměru mezi hmotností a nábojem (m/z). Hmotnostní spektrometrie se využívá k analýze širokého spektra vzorků. Spektrometr je složen ze tří částí: ionizátoru, analyzátoru a detektoru. Ionizátor tvoří ionty v plynné fázi. Analyzátor třídí ionty na základě poměru hmotnosti a náboje. Detektor rozpoznává ionty v závislosti na jejich množství. Výhodou této metody je její velká sensitivita, vysoká přesnost a možnost využití k charakterizaci různých biomolekul. Nevýhodou je naopak omezená možnost rozeznání izomerů určité sloučeniny (Sengupta *et al.*, 2019).

Erban *et al.* (2013) využili metodu hmotnostní spektrometrie pro identifikaci proteinů včetně vitellogeninu v hemolymfě včely medonosné. Proteiny byly nejprve vyřezány z gelu po provedené elektroforéze s barvením pomocí Coomassie Blue. Následně byly proteiny ve vyřezaných kouscích gelu odbarveny a naštěpeny pomocí trypsinu. Hmotnostní spektrometrií byla analyzována spektra získaných tryptických peptidů v rozmezí od 700 do 4000 m/z .

2.5.6 Syntéza cDNA

Komplementární DNA (cDNA) je molekula, k jejíž syntéze dochází laboratorně z mediátorové RNA (mRNA), nejedná se tedy o genomovou DNA, protože mRNA již byla po transkripci modifikována. Používá se enzym reverzní transkriptasa (EC 2.7.7.49), která vytváří dvoušroubovici DNA komplementární k mRNA. Syntéza cDNA slouží ke zjištění, které geny byly aktivně přepisovány v buňce, orgánu či celém organismu v momentě odebrání mRNA. Mohou tak vznikat celé knihovny, obsahující různé molekuly cDNA (Pelley, 2012).

Piulachs *et al.* (2003) nasyntetizovali cDNA z mRNA vitellogeninu, pocházející z tukových tělísek mladých včelích královen. cDNA byla následně amplifikována pomocí metody PCR ve 30 cyklech.

2.5.7 qPCR

Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR) je metoda, která v reálném čase zaznamenává proces amplifikace DNA. Při klasické PCR je použita termostabilní DNA polymerasa (EC 2.7.7.7) k syntéze nových vláken DNA, která jsou komplementární k cílové sekvenci DNA. Při samotné reakci je tento enzym smíchán spolu s templátovou DNA, primery a nukleotidy v přístroji termocykleru. Reakce probíhá ve třech krocích, které se cyklicky opakují: denaturace (oddělení vláken DNA od sebe), navázání primerů a syntéza DNA. Výsledkem je vytvoření až miliard kopií původní sekvence DNA. Na rozdíl od výše popsané reakce qPCR navíc slouží k zaznamenávání množení kopií po každém cyklu, k čemuž se využívá fluorescenčních značek a termocykleru, který fluorescenci dokáže detekovat (Kuang *et al.*, 2018).

Lu *et al.* (2018) pomocí qPCR metody zmnožili cDNA, která byla připravena z RNA, pocházející z trofocytů a oenocytů včelích dělnic a královen. Při qPCR byla použita zelená fluorescenční značka SYBR Green a gen *aktinu* jako referenční gen.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Bio-Rad (USA): Coomassie Brilliant Blue R-250 ($C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$), Coomassie Brilliant Blue G-250 ($C_{47}H_{50}N_3NaO_7S_2$)

Lachema (Česká republika): methanol (CH_3OH)

Lach-Ner (Česká republika): chlorid sodný ($NaCl$)

Merck (Německo): Ponceau S ($C_{22}H_{16}N_4O_{13}S_4$)

MP Biomedicals (Francie): tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris ($C_4H_{11}NO_3$))

Sigma-Aldrich (Německo): ethanol (EtOH (C_2H_5OH)), kyselina fosforečná (H_3PO_4), akrylamid (C_3H_5NO), N,N'-metylen-bis-akrylamid (bisakrylamid ($C_7H_{10}N_2O_2$)), kyselina chlorovodíková (HCl), dodecylsírán sodný (SDS ($NaC_{12}H_{25}SO_4$)), N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED ($C_6H_{16}N_2$)), peroxodisíran amonný (APS ($(NH_4)_2S_2O_8$)), *n*-butanol (C_4H_9OH), glycin ($C_2H_5NO_2$), glycerol ($C_3H_8O_3$), dithiotreitol (DTT ($C_4H_{10}O_2S_2$)), bromfenolová modř (3,3',5,5'-tetrabromfenolsulfonftalein ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)), kyselina octová (CH_3COOH), kvercetin ($C_{15}H_{10}O_7$), dimethylsulfoxid (DMSO (C_2H_6OS)), chlorid hlinitý ($AlCl_3$), ethylenglykol ($C_2H_6O_2$), Tween-20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$), chlorid hořečnatý ($MgCl_2$), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP ($C_8H_6BrClNO_4P$)), nitrotetrazoliová modř (NBT ($C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$)), dimethylformamid (DMF, C_3H_7NO), Súdánská čern B ($C_{29}H_{24}N_6$), aceton (C_3H_6O), hovězí sérový albumin (BSA), sušené mléko, primární protilátka (polyklonální králičí protilátka proti vitellogeninu), sekundární protilátka (kozí anti-králičí protilátka s navázanou alkalickou fosfatou (EC 3.1.3.1)), marker molekulové hmotnosti (SigmaMarker wide range 6500-200000 Da)

3.1.2 Použité roztoky

- Zásobní roztok Coomassie Blue: 50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 v 25 ml EtOH a 50 ml 85 % kys. fosforečné, doplněno ddH₂O na 100 ml
- Akrylamid/N,N'-mehylenbisakrylamid (AA/BIS): 30 % (w/v) akrylamidu, 0,8 % bisakrylamidu (w/v) v ddH₂O (30 g akrylamidu + 0,8 g bisakrylamidu rozpustit v 60 ml ddH₂O a doplnit ddH₂O do 100 ml)

- Pufr do zaostřovacího gelu: 0,5 mol.l⁻¹ Tris/HCl, pH 6,8 (3 g Tris rozpustit ve 40 ml ddH₂O, upravit pH na 6,8 s HCl a doplnit ddH₂O na 50 ml)
- Pufr do dělicího gelu: 1,5 mol.l⁻¹ Tris/HCl, pH 8,8 (36,3 g Tris rozpustit ve 150 ml ddH₂O, upravit pH na 8,8 s HCl a doplnit ddH₂O na 200 ml)
- 10% (w/v) SDS (10 g SDS rozpustit v ddH₂O a doplnit ddH₂O do 100 ml)
- 10% (w/v) peroxosíran amonný (APS) (0,1 g peroxosíranu amonného rozpustit v 1 ml ddH₂O)
- Vodou nasycený *n*-butanol (k 50 ml *n*-butanolu přidat 5 ml ddH₂O, protřepat)
- Elektrodotový pufr: 0,025 mol.l⁻¹ Tris, 0,192 mol.l⁻¹ glycín, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3 (6,05 g Tris, 28,82 g glycínu a 2 g SDS rozpustit v 1 l ddH₂O, zkontrolovat pH, doplnit ddH₂O do 2 l)
- Vzorkovací pufr (2x Laemmli): 0,125 mol.l⁻¹ Tris/HCl, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) glycerol, 0,2 mol.l⁻¹ DTT, 0,02 % (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8 (2,5 ml pufru do zaostřovacího gelu, 4 ml 10% SDS, 2 ml glycerolu, 2 mg bromfenolové modři, 0,31 g DTT, doplnit ddH₂O do 10 ml)
- Barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue (CBB): 0,1 % (w/v) CBB R-250 v 15% (v/v) kys. octové a 45% (v/v) methanolu (0,1 g CBB R-250 rozpustit v roztoku 15 ml kys. octové, 45 ml methanolu a 40 ml ddH₂O)
- Odbarvovací roztok po barvení gelu CBB R-250: 40 % (v/v) methanol, 10 % kys. octová (40 ml methanolu, 10 ml kys. octové a 50 ml ddH₂O)
- Barvicí roztok s Ponceau S: 0,2 % Ponceau S v 10% (v/v) kys. octové (0,2 g Ponceau S rozpustit v roztoku 10 ml kys. octové a 90 ml ddH₂O)
- Detekční roztok s kvercetinem a AlCl₃: 15 mmol.l⁻¹ kvercetinu v DMSO, 50 mmol.l⁻¹ AlCl₃ (2,5 ml ethylenglykolu, 5 ml methanolu, 12,5 ml ddH₂O, 50 µl roztoku kvercetinu v DMSO (4,53 mg kvercetinu doplněno DMSO do 1 ml), 20 µl roztoku AlCl₃ (6,67 mg AlCl₃ doplněno ddH₂O do 1 ml)
- Fixační roztok: 10 % (v/v) kys. octová, 50 % (v/v) methanol (10 ml kys. octové, 50 ml methanolu, 40 ml ddH₂O)
- Barvicí roztok Súdanské černi B: 0,45 % (w/v) Súdanská čern B, 16,7 % (v/v) aceton, 10 % (v/v) kys. octová (0,45 g Súdanské černi B rozpustit v 16,7 ml acetonu, přidat 10 ml kys. octové, doplnit ddH₂O do 100 ml)

- Odbarvovací roztok Súdanské černi B: 15 % (v/v) kys. octová, 20 % (v/v) aceton (15 ml kys. octové, 20 ml acetonu, 65 ml ddH₂O)
- Blotovací pufr: 0,025 mol.l⁻¹ Tris, 0,192 mol.l⁻¹ glycinu, 20 % (v/v) methanol, pH 8,3 (3,025 g Tris a 14,41 g glycinu rozpustit ve 200 ml ddH₂O, přidat 200 ml methanolu, zkontrolovat pH, doplnit ddH₂O do 1 l)
- 5x TBS (solný roztok pufrovaný Tris) pracovní pufr pro imunodetekci (5x TBS): 100 mmol.l⁻¹ Tris, 2,5 mol.l⁻¹ NaCl, pH 7,5 (24,2 g Tris a 292,2 g NaCl rozpustit v 1 l ddH₂O, upravit pH na 7,5 s HCl, doplnit ddH₂O do 2 l)
- Roztok 5% sušeného mléka v TBS (rozpustit 1 g sušeného mléka v 20 ml TBS (4 ml 5x TBS a 16 ml ddH₂O))
- Roztok 1% sušeného mléka v TBS (rozpustit 0,2 g sušeného mléka v 20 ml TBS (4 ml 5x TBS a 16 ml ddH₂O))
- Tween TBS (TBS-T) (0,15 ml Tween-20 a 300 ml TBS (60 ml 5x TBS a 240 ml ddH₂O))
- Roztok primární protilátky (10 µl primární protilátky a 10 ml roztoku 1% sušeného mléka v TBS)
- Roztok sekundární protilátky (1 µl sekundární protilátky a 10ml roztoku 1% sušeného mléka v TBS)
- Roztok NBT-BCIP pro detekci alkalické fosfatasy (33 µl roztoku NBT (10% NBT v 70% DMF), 33 µl roztoku BCIP (5% BCIP v 100% DMF), 10 ml pufru pro alkalickou fosfatasu (100 mmol.l⁻¹ NaCl, 50 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 100 mmol.l⁻¹ Tris-HCl (pH 9,5)))

3.1.3 Přístroje a vybavení

- Analytické váhy (Radwag, Česká republika)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Blotovací komůrka Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA)
- Blotovací papír ALBET (ScienceLab, USA)
- Centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo)
- Digitální předvážky (Radwag, Česká republika)
- Dokumentační systém pro gely Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)
- Elektroforetická souprava MINI-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, USA)

- Inkubátor Dry Bath (Major Science, USA)
- Magnetická míchačka Big Squid (IKA, Německo)
- Mikrodestička TPP (96 jamek) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Mikrodestičkový spektrofotometr PowerWave XS (BioTek Instruments, USA)
- Nitroceluloseová membrána (póry o velikosti 0,45 μm) (Bio-Rad, USA)
- Třepačka 3D (Biosan, Lotyšsko)
- Vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)
- Zdroj pro elektroforézu PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

3.1.4 Biologický materiál

hemolymfa včely medonosné – vzorek hemolymfy byl odebrán z dospělých dělnic, získaných z pokusného včelína Výzkumného ústavu včelařského na Kývalce v září 2019, hemolymfa byla po odstřižení zadečku odebrána z hrudníku včel a uschována v mrazicím boxu do dalšího použití

3.2 Metody

3.2.1 Stanovení proteinů Bradfordovou metodou

3.2.1.1 Příprava pracovního roztoku Bradfordova činidla

Zásobní roztok Coomassie Blue (50 mg Coomassie Blue G250 rozpuštěno v 25 ml EtOH a 50 ml 85% kys. fosforečné, doplněno ddH₂O na 100 ml) byl naředěn ddH₂O v poměru 1:4 (2 ml zás. roztoku a 8 ml ddH₂O). Výsledný roztok je stabilní cca týden při 4 °C a má hnědomodrou barvu.

3.2.1.2 Příprava standardů proteinu BSA

Byl připraven zásobní roztok BSA o hmotnostní koncentraci 2 mg.ml⁻¹ (2000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) tak, že bylo naváženo 100 mg BSA, které se rozpustilo v 50 ml ddH₂O. Postupným ředěním byla připravena kalibrační řada BSA o hm. koncentracích 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

3.2.1.3 Postup spektrofotometrického měření standardů BSA

Do 36 jamek (blank + 11 vzorků, 3 opakování v řádku = 36 jamek) 96jamkové mikrodestičky bylo pipetováno postupně: 45 μl ddH₂O, 5 μl standardu BSA, 200 μl

pracovního roztoku Bradfordova činidla (blank: 50 μ l ddH₂O, 200 μ l). Destička byla zakryta víkem a jemně protřepána, poté ponechána 5 min. vyvinout zbarvení. Následně byla na mikrodestičkovém spektrofotometru PowerWave XS změřena absorbance při vlnových délkách 590 a 450 nm. Toto měření bylo vyhodnoceno programem Gen5 (Biotek) v podobě kalibrační přímky závislosti poměru absorbance při vlnových délkách 590/450 nm na koncentraci standardů.

3.2.1.4 Příprava vzorků proteinu z hemolymfy včel

Byly připraveny dva vzorky proteinů. První obsahoval nezředěnou hemolymfu včel (30 μ l). Druhý obsahoval 10x zředěnou hemolymfu včel (3 μ l hemolymfy + 27 μ l ddH₂O).

3.2.1.5 Postup spektrofotometrického měření proteinů

Do 6 jamek (2 vzorky, 3 opakování v řádku) mikrodestičky bylo pipetováno 45 μ l ddH₂O, 5 μ l vzorku proteinu, 200 μ l pracovního roztoku Bradfordova činidla. Destička byla zakryta víkem a jemně protřepána, poté ponechána 10 min. vyvinout zbarvení. Následně byla na mikrodestičkovém spektrofotometru PowerWave XS změřena absorbance při vlnových délkách 590 a 450 nm a data byla zobrazena v programu Gen5 (Biotek). Koncentrace proteinů ve vzorcích byla následně vyhodnocena pomocí kalibrační přímky závislosti poměru absorbance při vlnových délkách 590/450 nm na koncentraci standardů, které byly změřeny předtím (Zor a Selinger, 1996).

3.2.2 Metoda SDS-PAGE

3.2.2.1 Příprava vzorků

Ke vzorku neředěné hemolymfy byl přidán stejný objem 2x vzorkovacího pufru dle Laemmliho (100 μ l hemolymfy + 100 μ l vz. pufru). Takto připravený vzorek byl promíchán na vortexu a po dobu 5 min. zahřán na 95 °C v inkubátoru. Po ochlazení v ledové lázni byl vzorek centrifugován v centrifuze 5418 R 5 min. při 15000 *g* a 4 °C.

3.2.2.2 Postup

Čtyři skleněné desky pro nalévání gelu byly důkladně odmaštěny pomocí ethanolu. Mezi skleněné desky byly vloženy plastové hřebínky a na plastové držáky skel byla

popisovačem vyznačena vzdálenost 1 cm od konce zubů hřebínku. Poté byly hřebínky odstraněny.

Do dvou označených kádinek pro přípravu zaostřovacího a dělicího gelu byly pipetovány jednotlivé roztoky (složky gelu):

- dělicí gel 10%: 3,4 ml AA/BIS (30%/0,8%); 2,5 ml pufru Tris/HCl (1,5 mol.l⁻¹; pH 8,8); 3,8 ml ddH₂O; 0,1 ml SDS (10%); 0,01 ml TEMED
- zaostřovací gel 4%: 1,3 ml AA/BIS (30%/0,8%); 2,5 ml pufru Tris/HCl (0,5 mol.l⁻¹; pH 6,8); 5,9 ml ddH₂O; 0,2 ml SDS (10%); 0,02 ml TEMED

Přidáním čerstvě připraveného roztoku APS v objemu 0,07 ml do kádinky pro dělicí gel byla zahájena polymerace gelu. Připravená směs po promíchání na magnetické míchačce Big Squid byla rychle přenesena pomocí Pasteurovy pipety do prostoru mezi skla. Směs byla nalévána až po značku na držáku.

Tato směs byla převrstvena tenkou vrstvou *n*-butanolu. Po ztuhnutí dělicího gelu po 30 min. byl odstraněn *n*-butanol a povrch gelu byl opláchnut stříčkou destilovanou vodou a vysušen filtračním papírem.

Do kádinky pro zaostřovací gel bylo přidáno 0,12 ml APS a po rychlém promíchání na magnetické míchačce, byla připravená směs přenesena Pasteurovou pipetou do prostoru mezi skla na ztuhlý dělicí gel. Do směsi pro zaostřovací gel byly opatrně vloženy hřebínky tak, aby se pod jejich zuby nedostaly vzduchové bubliny. Zaostřovací gel tuhnul 30 min.

Popisovačem byly na vnější straně silných skel vyznačeny jednotlivé zuby hřebínků a hřebínky byly opatrně vyjmuty. Skla s připravenými gely byla vložena do elektroforetické komůrky MINI-PROTEAN Tetra, do níž byl nalit elektrodový pufr tak, aby přetekl do jamek gelu.

Do krajních jamek (č. 1 a 8) gelů byly aplikovány automatickou pipetou 2 μl standardu molekulové hmotnosti proteinů. Do jamek č. 2 a 5 bylo aplikováno 5 μl připraveného vzorku, do jamek č. 3 a 6 to bylo 10 μl vzorku a do jamek č. 4 a 7 to bylo 15 μl vzorku. Elektroforetická komůrka byla uzavřena víkem, připojena ke zdroji elektrického napětí PowerPac Basic. Na něm bylo nastaveno konstantní napětí 100 V.

Jakmile zóna bromfenolové modři, obsažené ve vzorkovacím pufru, doputovala na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu (po cca 1 hod.), zdroj napětí byl nastaven na 200 V.

Po doputování zóny bromfenolové modři téměř na úroveň dolního okraje skel (po další cca 1 hod.) byl zdroj napětí vypnut. Elektrické kabely byly odpojeny, víko sejmuto a elektrodový pufr vylit. Pomocí plastové špachtle byla oddělena od gelů skla a gely byly označeny odkrojením pravého dolního rohu (pro orientaci při vyhodnocování gelů).

Gely byly pomocí špachtle rozděleny na poloviny (celkem čtyři gely) a dva z nich uloženy do plastových krabiček s 20 ml fixačního roztoku. Jeden z těchto gelů byl uschován v lednici pro další využití. Druhý gel byl ponechán na třepačce 3D.

Ke třetímu gelu bylo přidáno 20 ml barvicího roztoku s CBB a v plastové krabičce byl ponechán na třepačce do druhého dne. Ke čtvrtému gelu bylo přidáno 20 ml detekčního roztoku s kvercetinem a AlCl_3 a byl v krabičce protřepáván 10 min.

Detekční roztok s kvercetinem a AlCl_3 byl odstraněn a gel byl třikrát promyt destilovanou vodou. Barvicí roztok s CBB byl odstraněn a gel byl třikrát promyt odbarvovacím roztokem pro odbarvení gelu. Po jeho odstranění byl gel čtyřikrát promyt destilovanou vodou.

Pomocí dokumentačního přístroje Gel Doc EZ Imager a programu Image Lab (Bio-Rad) byly dva gely (po barvení CBB/značení kvercetinem a AlCl_3) zaznamenány v podobě obrázků pro následné vyhodnocení.

Z gelu uloženého v ledničce byl odstraněn fixační roztok. Následně byl tento gel ponořen do 100 ml barvicího roztoku Súdanské černi B po dobu 2 hod. Poté byl tento barvicí roztok odstraněn a ke gelu byl přidán odbarvovací roztok a gel byl inkubován na třepačce přes noc. Poté byl gel promyt třikrát destilovanou vodou. Pomocí dokumentačního přístroje Gel Doc EZ Imager a programu Image Lab byl gel zdokumentován ve formě obrázků pro následné vyhodnocení.

3.2.3 Metoda Western blot

Z gelu na třepačce byl odstraněn fixační roztok. Tento gel byl následně čtyřikrát promyt destilovanou vodou a přenesen do blotovacího pufru spolu s dvěma filtračními papíry a nitroceluloseovou membránou po dobu 10 min., která předtím byla vystřižena podle velikosti gelu (5,5 x 4,25 cm).

Do blotovací komůrky Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell byly na anodu (spodní elektrodu) naskládány jednotlivé vrstvy v tomto pořadí: 1 ks filtračního papíru, nitroceluloseová membrána, gel, 1 ks filtračního papíru. Pomocí skleněné tyčinky byly odstraněny vzduchové bubliny mezi gelem a membránou. Na horní filtrační papír byla

přiložena katodová elektroda. Blotovací komůrka byla uzavřena víkem a připojena ke zdroji napětí, který byl nastaven na 40 mA. Po cca 2 hod. bylo blotování ukončeno, zdroj napětí byl odpojen, membrána byla vyjmuta a barvena barvicím roztokem Ponceau S v plastové krabici po dobu 5 min. Poté byl barvicí roztok odstraněn a membrána byla třikrát promyta destilovanou vodou a použita pro imunochemickou detekci proteinů.

Imunochemická detekce proteinů byla započata blokací membrány inkubací s 20 ml roztoku 5% sušeného mléka v TBS po dobu 2 hod. Dalším krokem bylo dvojité promytí membrány roztokem Tweenu v TBS (TBS-T) (2 x 50 ml) po dobu dvakrát 10 min. Následně byla membrána inkubována s 10 ml roztoku primární protilátky v 1% sušeném mléku v TBS po dobu 2 hod. Dále byla znovu dvakrát promyta roztokem TBS-T (2 x 50 ml, 2 x 10 min). Poté byla membrána inkubována s 10 ml roztoku sekundární protilátky v 1% sušeném mléku v TBS. Následně byla znovu dvakrát promyta roztokem TBS-T (2 x 50 ml, 2 x 10 min). Poté byla membrána inkubována s 10 ml roztoku NBT-BCIP pro detekci alkalické fosfatasy po dobu 10 min. Následně byla pětkrát promyta destilovanou vodou (5 x 50 ml). Nakonec byla membrána položena na skleněnou podložku a vyfocena mobilním telefonem pro následné vyhodnocení.

3.2.4 Bioinformatická analýza

3.2.4.1 Porovnání sekvencí nukleotidů a aminokyselin

Pro zjištění nukleotidových (mRNA) a aminokyselinových sekvencí genu *vitellogeninu* a jeho proteinu a genů *vg-like* a jejich proteinů včely medonosné byla využita webová stránka NCBI (National Center for Biotechnology Information (NCBI), c1988-2021). Tyto sekvence byly následně ve formátu FASTA porovnány se sekvencemi z ostatních hmyzích druhů pomocí vyhledávacího nástroje BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“) na stejné webové stránce (Altschul, 1997; Zhang *et al.*, 2000; Altschul *et al.*, 2005; Morgulis *et al.*, 2008). Porovnávání bylo omezeno na třídu hmyzu. Pro nukleotidové sekvence byla použita databáze „Nucleotide collection (nr/nt)“ a vyhledávání bylo zaměřeno na vysoce podobné sekvence („megablast“). Pro aminokyselinové sekvence byla vybrána databáze „Non-redundant protein sequences (nr)“ a algoritmus byl nastaven na „blastp (protein-protein BLAST)“.

3.2.4.2 Vyhledávání předpokládaných míst fosforylace

Předpokládaná místa fosforylace byla hledána pomocí webové stránky NetPhos 3.1 Server za použití aminokyselinových sekvencí vitellogeninu a vg-like proteinů včely medonosné ve formátu FASTA (Blom *et al.*, 1999). Vyhledávání nebylo nikterak omezeno.

3.2.4.3 Vyhledávání předpokládaných míst glykosylace

Pomocí webové stránky NetNGlyc 1.0 Server byla vyhledávána předpokládaná místa glykosylace v sekvenci vitellogeninu a vg-like proteinů včely medonosné (Gupta a Brunak, 2001). Sekvence byly použity ve formátu FASTA. Vyhledávání nebylo nijak omezeno.

3.2.4.4 Tvorba 3D modelů

Sekvence vitellogeninu a vg-like proteinů včely medonosné ve FASTA formátu byly použity pro homologní 3D modelování na webové stránce SWISS-MODEL (Guex *et al.*, 2009; Bienert *et al.*, 2017; Bertoni *et al.*, 2017; Waterhouse *et al.*, 2018; Studer *et al.*, 2020).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Vyhodnocení stanovování koncentrace proteinů Bradfordovou metodou

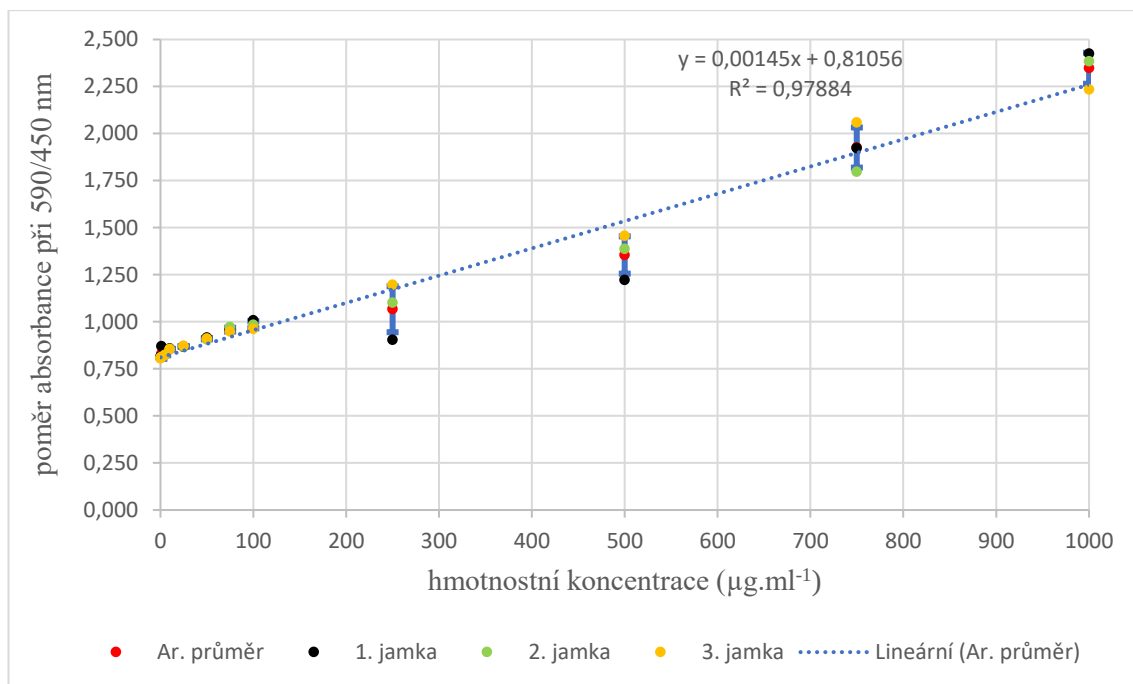
Na základě naměřených hodnot absorbance standardů proteinu BSA byla sestavena kalibrační přímka závislosti poměru absorbancí při vlnových délkách 590/450 nm na koncentracích standardů ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) (Obr. 6). Jednotlivé standardy byly nanášeny do jamek destičky v trojím opakování. Naměřené hodnoty absorbance byly aritmeticky zprůměrovány a byla vypočítána směrodatná odchylka hodnot technických replikátů.

Pro naměřenou závislost poměru absorbancí na koncentraci standardu byla metodou lineární regrese určena rovnice kalibrační přímky (Tab. 1).

Je zřejmé, že zejména hodnoty poměru absorbance u standardu s koncentrací $500 \mu\text{g.ml}^{-1}$ se mírně odchýlily od kalibrační přímky. Tento jev mohl být způsoben nepřesným ředěním standardu nebo jeho pipetováním do jamek mikrodestičky.

Pomocí získané kalibrační rovnice byla vypočítána koncentrace proteinů ve dvou vzorcích včelí hemolymfy – neředěném a 10x ředěném (Tab. 2). Pro výpočet u 10x ředěného vzorku byl použit průměr naměřených hodnot poměru absorbancí při 590/450 nm. Tato hodnota byla dosazena do rovnice kalibrační přímky za neznámou y a vypočítána hodnota koncentrace tohoto vzorku proteinu, která byla zaokrouhlena na jednotky. Hodnota absorbance neředěného vzorku se nacházela mimo rozsah hodnot použitých koncentrací proteinového standardu, tím pádem by výpočet hodnoty koncentrace neředěného vzorku s použitím připravené kalibrační přímky byl nesprávný. Proto byla hodnota koncentrace u neředěného vzorku vypočítána ze zaokrouhlené hodnoty koncentrace naměřené u 10x ředěného vzorku.

V desetkrát ředěném vzorku hemolymfy byla tedy určena koncentrace proteinů $204 \mu\text{g.ml}^{-1}$ a výpočtem u původního neředěného vzorku $2040 \mu\text{g.ml}^{-1}$.



Obr. 6 Kalibrační přímka závislosti průměru poměrů absorbancí při 590/450 nm na koncentracích standardu hovězího sérového albuminu ($n = 3$) ($\mu\text{g.ml}^{-1}$). Chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku.

Tab. 1 Hodnoty parametrů rovnice kalibrační přímky.

Rovnice kal. přímky	Parametr	Hodnota
$y = ax + b$	a	0,00145
	b	0,81056

Tab. 2 Výsledná koncentrace vzorků ($n = 3$) proteinů z včelí hemolymfy.

	Poměr absorbance při 590/450 nm	Výsledná koncentrace ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)
10x ředěný vzorek z hemolymfy	1,107	204
Neředěný vzorek z hemolymfy	5,453	2040*

*Hodnota vypočítána vynásobením hodnoty výsl. koncentrace u 10x ředěného vzorku deseti.

4.2 Vyhodnocení metody SDS-PAGE

4.2.1 Barvení pomocí roztoku s Coomassie Blue

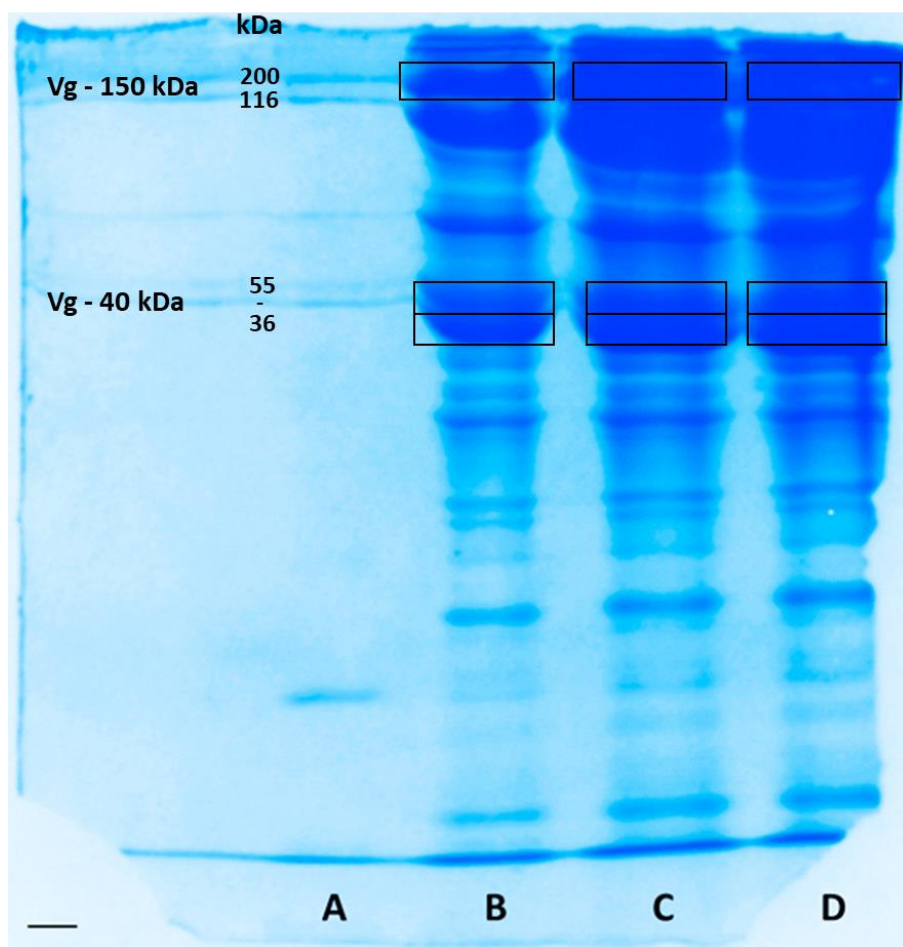
Pomocí barvicího roztoku CBB byly na gelu po provedení SDS-PAGE identifikovány jednotlivé zóny markeru molekulové hmotnosti a zejména proteinů, přítomných ve třech jamkách (Obr. 7). Gel byl zdokumentován pomocí přístroje Gel Doc EZ Imager a programu Image Lab.

Marker molekulové hmotnosti je složen celkem z dvanácti různě velkých proteinů o hmotnosti od 6,5 do 200 kDa, avšak na gelu bylo pozorováno pouze šest zón (jamka A), přičemž některé byly přítomny i v krajní nevyužité jamce. Je zřejmé, že do nevyužité jamky se marker dostal v důsledku nepřesného pipetování. Přítomnost pouze šesti zón by mohla být vysvětlena použitím malého množství (2 μ l) markeru, případně také nedokonalým pipetováním.

V jamce B, kam bylo pipetováno 5 μ l vzorku hemolymfy, byly jasně obarveny zóny proteinů. Na základě umístění zón markeru se podařilo určit zónu odpovídající velké podjednotce vitellogeninu o molekulové hmotnosti 150 kDa. Zóna malé podjednotky vitellogeninu o molekulové hmotnosti 40 kDa nebyla určena přesně, protože bylo obtížné určit velikost zón markeru. Nedošlo totiž k obarvení všech jeho proteinů. Nicméně byly označeny dvě potenciální zóny, které by malé podjednotce mohly odpovídat. Bylo tedy částečně potvrzeno, že se vitellogenin skládá ze dvou rozdílných podjednotek, jak uvádí Havukainen *et al.* (2011a).

Zóny v jamce C byly silně výrazné, což bylo způsobeno větším objemem (10 μ l) pipetovaného vzorku hemolymfy, ve kterém bylo obsaženo větší množství proteinů. To zapříčinilo stíženou rozlišitelnost zón proteinů o velké molekulové hmotnosti.

V jamce D nebylo možné vzhledem k ještě většímu objemu (15 μ l) vzorku hemolymfy s jistotou rozeznat jednotlivé zóny velkých proteinů. Naopak zóny proteinů o velmi malé molekulové hmotnosti bylo možné rozlišit lépe nežli v jamce B či C.



Obr. 7 Detekce proteinů v SDS-PAGE gelu pomocí CBB. A: Marker molekulové hmotnosti proteinů (SigmaMarker wide range), B: 5 µl vzorku hemolymfy, C: 10 µl vzorku hemolymfy, D: 15 µl vzorku hemolymfy. Měřítko: 0,236 cm. Vyfoceno přístrojem Gel Doc EZ Imager. Zpracováno v programu Image Lab.

4.2.2 Značení pomocí roztoku s kvercetinem a chloridem hlinitým

Na dalším gelu z SDS-PAGE, fluorescenčně značeném za použití detekčního roztoku s kvercetinem a AlCl_3 , byly identifikovány slabé zóny markeru molekulových hmotností a zřetelné zóny proteinů ze vzorků hemolymfy (Obr. 8). Gel byl vyfocen pomocí přístroje Gel Doc EZ Imager a programu Image Lab.

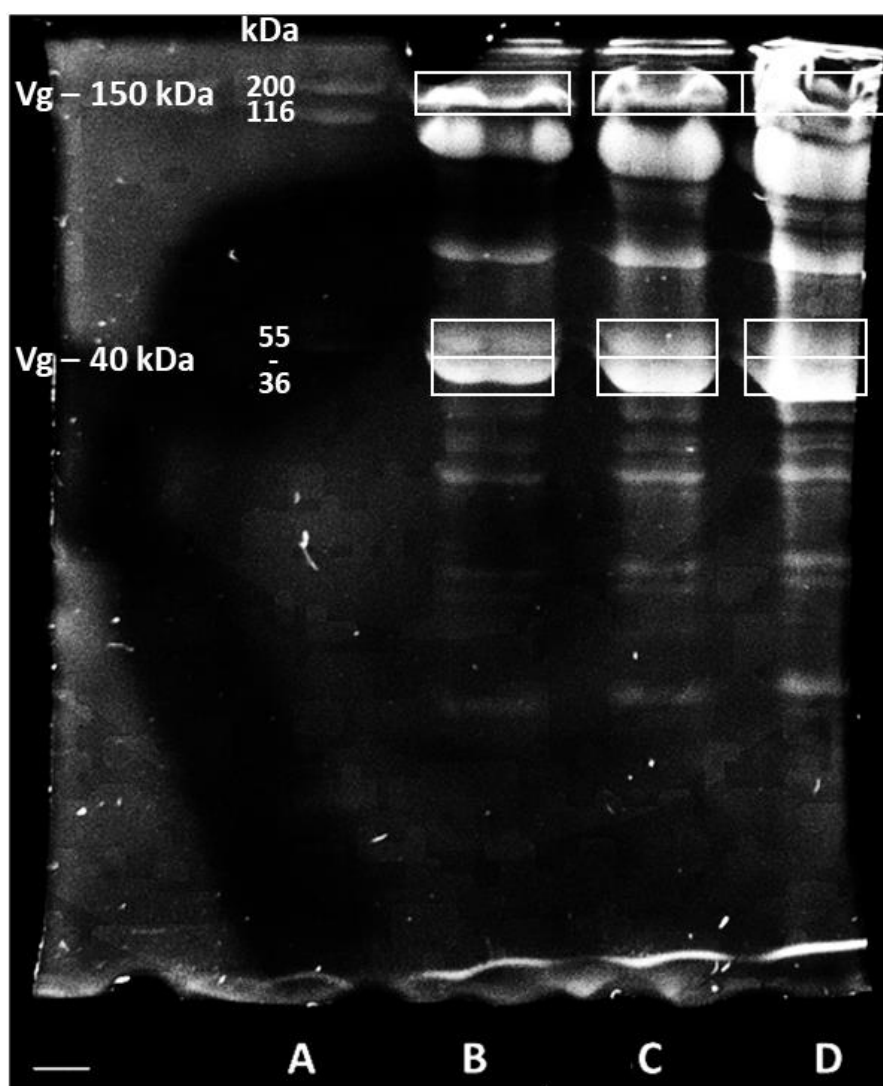
Pět nevýrazných zón markeru v jamce A mohlo být způsobeno podobně jako u gelu, barveného roztokem CBB, malým pipetovaným objemem (2 µl) nebo nepřesnostmi při pipetování. Navíc vzhledem k tomu, že kvercetin barví zejména fosfoproteiny, je možné, že nedošlo k obarvení všech proteinů, vyskytujících se v markeru (Wang *et al.*, 2014b).

Intenzita značení zón velkých proteinů v jamce B byla dostatečně silná, a bylo tedy možné určit zónu velké podjednotky vitellogeninu, přestože pipetovaný objem vzorku

hemolymfy byl pouze 5 μ l. Kvůli velmi slabému značení zón markeru byly vyznačeny dvě potenciální zóny, které by mohly odpovídat malé podjednotce vitellogeninu.

Jamka C obsahovala dvojnásobné množství vzorku (10 μ l) hemolymfy, avšak intenzita signálu byla podobná jako v jamce B. Nicméně signál zón menších proteinů byl zřetelnější.

V jamce D, obsahující 15 μ l vzorku hemolymfy, byly zóny velkých proteinů velmi intenzivní a větší než v předchozích jamkách, což způsobilo, že zóny pro obě podjednotky vitellogeninu byly obtížněji rozeznatelné od ostatních.



Obr. 8 Fluorescenční detekce fosfoproteinů v SDS-PAGE gelu metodou s kvercetinem a AlCl_3 . A: Marker molekulové hmotnosti proteinů (SigmaMarker wide range), B: 5 μ l vzorku hemolymfy, C: 10 μ l vzorku hemolymfy, D: 15 μ l vzorku hemolymfy. Měřítka: 0,236 cm. Vyfoceno přístrojem Gel Doc EZ Imager. Zpracováno v programu Image Lab.

4.2.3 Barvení pomocí roztoku Sudánské černi B

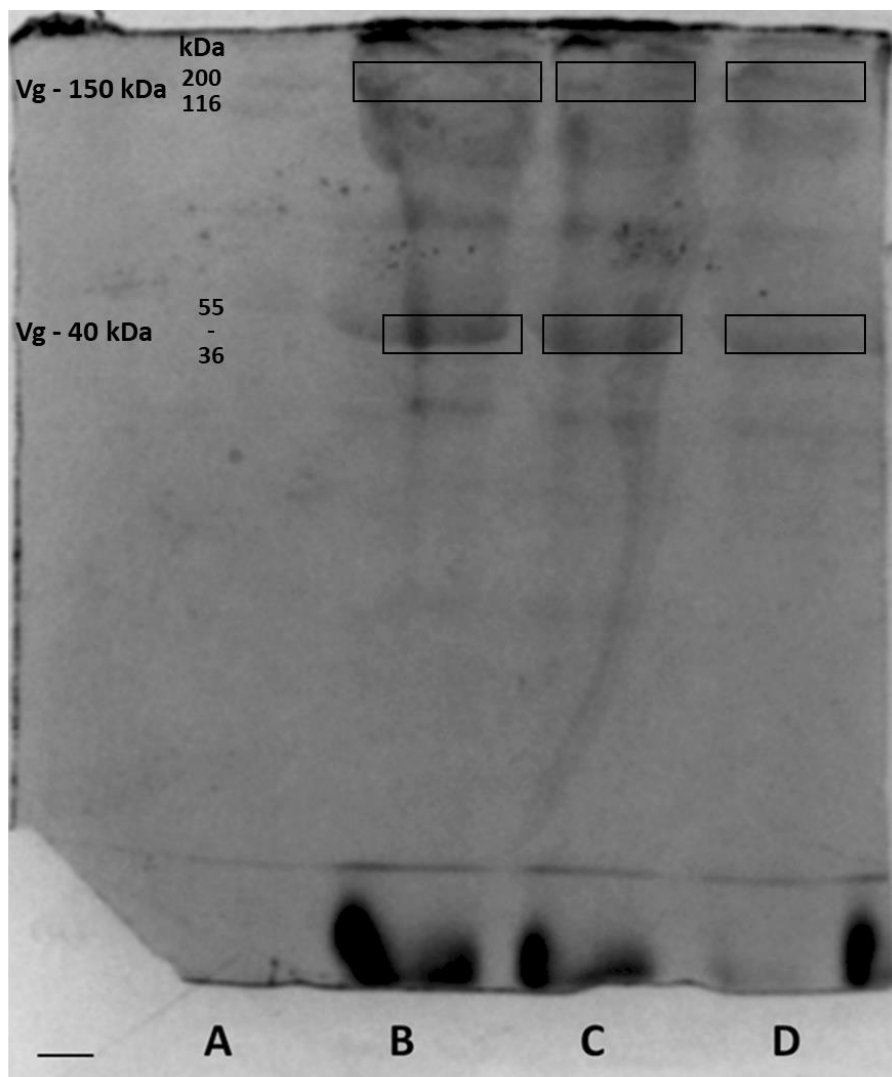
Na třetím gelu byly pomocí barvicího roztoku Sudánské černi B detekovány lipoproteiny (Obr. 9). Zóny markeru molekulové hmotnosti byly identifikovány velmi obtížně. Zóny proteinů ze vzorků měli menší intenzitu nežli u předchozích gelů. Gel byl opět zdokumentován přístrojem Gel Doc EZ Imager a programem Image Lab.

Sudánská čern B se podle výrobce (Sigma-Aldrich) používá pro barvení lipoproteinů po elektroforéze. To by mohl být důvod slabého zbarvení zón markeru molekulové hmotnosti v jamce A, protože je možné, že se zmíněné barvivo nemuselo navázat na všechny markerové proteiny. Druhou možností by mohlo být podobně jako u předchozích gelů použití malého objemu markeru (2 μ l).

V jamce B, obsahující 5 μ l vzorku hemolymfy, byla identifikována zóna malé podjednotky vitellogeninu, která byla nejintenzivnější. Zóna velké podjednotky byla určena podle dvou velmi slabých zón markeru. Zóny malých proteinů byly velmi slabě zbarveny.

Jamka C, do níž bylo pipetováno 10 μ l vzorku hemolymfy, vykazovala podobné zbarvení zón proteinů jako jamka B, tedy obtížně rozlišitelné zóny velkých proteinů, intenzivní zónu malé podjednotky vitellogeninu a špatně identifikovatelné zóny malých proteinů.

V jamce D, obsahující největší objem vzorku hemolymfy (15 μ l), byly překvapivě zóny velkých i malých proteinů zbarveny slaběji nežli v předchozích jamkách. Důvodem mohla být nepřesnost při pipetování vzorku do jamek.



Obr. 9 Detekce lipoproteinů v SDS-PAGE gelu metodou se Súdánskou černí B. A: Marker molekulové hmotnosti proteinů (SigmaMarker wide range), B: 5 µl vzorku hemolymfy, C: 10 µl vzorku hemolymfy, D: 15 µl vzorku hemolymfy. Měřítka: 0,236 cm. Vyfoceno přístrojem Gel Doc EZ Imager. Zpracováno v programu Image Lab.

4.3 Vyhodnocení metody Western blot

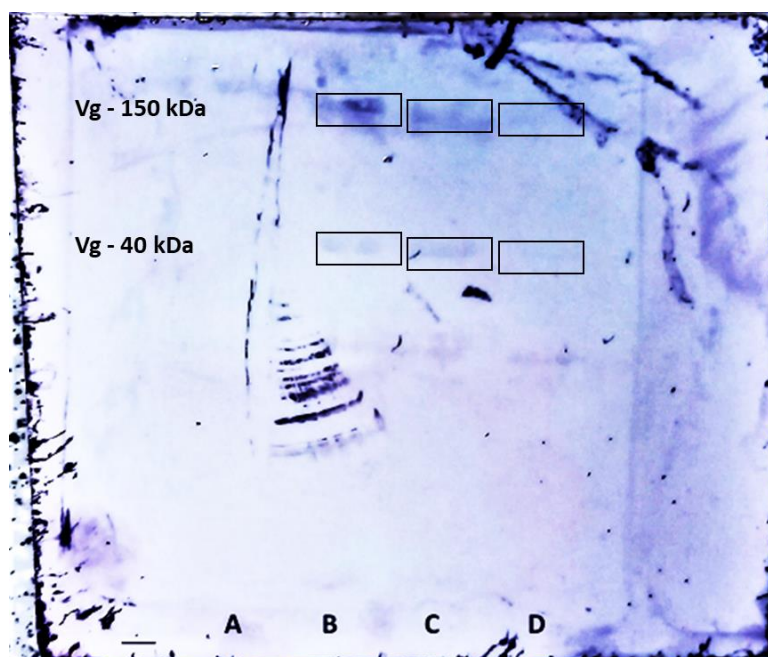
Proteiny separované v SDS-PAGE gelu byly metodou Western blot přeneseny na nitrocelulosovou membránu. Membrána byla po inkubaci v blokačním roztoku inkubována s králíčími primárními protilátkami proti vitellogeninu a následně s kozími anti-králíčími sekundárními protilátkami s navázanou alkalickou fosfatase pro imunochemickou detekci. Na této membráně byly identifikovány zóny odpovídající proteinům ze vzorku hemolymfy, zejména vitellogeninu (Obr. 10).

V části A byly pozorovány slabé zóny, jejichž vysvětlením by mohla být nespecifická vazba použitých sekundárních protilátek na markerové proteiny.

Do části B byly přeneseny zóny proteinů vzorku o objemu 5 μ l. Byla zde detekována zóna velké podjednotky vitellogeninu, která měla největší intenzitu, což je zapříčiněno specifitou primární protilátky vůči tomuto proteinu. Avšak zóna malé podjednotky měla pouze slabou intenzitu, což mohlo být teoreticky způsobeno menším počtem vazebných míst pro protilátku.

V části C, kam byly přeneseny zóny vzorku o objemu 10 μ l, lze identifikovat zónu velké podjednotky vitellogeninu se slabší intenzitou a zónu malé podjednotky se silnější intenzitou nežli v části B. To by mohlo být zdůvodněno nedostatečnou optimalizací některého z kroků metody Western blot, např. ředění primární a sekundární protilátky.

Část D obsahuje pouze velmi slabé zóny podjednotek vitellogeninu, přestože na ní byly přeneseny zóny proteinů ze vzorku o největším objemu (15 μ l). Kromě toho je membrána v místech zón velkých proteinů poškozena pravděpodobně poškrábáním, ke kterému mohlo dojít při jejím vystříhování.



Obr. 10 Imunochemická detekce vitellogeninu v hemolymfě včely na nitrocelulosové membráně za použití polyklonální králičí protilátky a sekundární koží protilátky s navázanou alkalickou fosfatasou. A: Zóny markeru molekulových hmotností (SigmaMarker wide range), B: Zóny proteinů 5 μ l vzorku hemolymfy, C: Zóny proteinů 10 μ l vzorku hemolymfy, D: Zóny proteinů 15 μ l vzorku hemolymfy. Měřítka: 0,224 cm. Membrána byla vyfocena mobilním telefonem.

4.4 Vyhodnocení bioinformatické analýzy

4.4.1 Porovnání nukleotidových a aminokyselinových sekvencí

Pomocí nástroje BLAST byly získány výsledky porovnávání sekvence nukleotidů genu *vitellogeninu* a *vg-like* genů a aminokyselin vitellogeninu a *vg-like* proteinů včely medonosné se sekvencemi ostatních hmyzích druhů. Porovnávané sekvence je možné seřadit podle několika parametrů.

Prvním je tzv. „E value“, tento parametr udává počet nukleotidů nebo aminokyselin, u kterých lze očekávat náhodnou shodu. „Max score“ je kritérium, udávající nejvyšší skóre shodných nukleotidů či aminokyselin. „Total score“ značí součet skóre shodných nukleotidů či aminokyselin všech segmentů, které jsou součástí sekvence shodující se se sekvencí zájmu. „Query cover“ udává délku shodujících se sekvencí v procentech. „Percent identity“ (procentuální shoda) je parametr udávající shodu dvou sekvencí v procentech. „Accession length“ značí délku konkrétní sekvence (National Center for Biotechnology Information (NCBI), c1988-2021). Porovnávané sekvence byly seřazeny podle parametru procentuální shody.

Nukleotidová sekvence genu *vitellogeninu* v podobě mRNA byla shodná se šesti sekvencemi z více než 89 % (Tab. 3). Jednalo se zejména o různě dlouhé sekvence, pocházející ze včely východní (*Apis cerana* F.), které byly všechny identické z více jak 92 %. Také byla vyhledána sekvence ze včely obrovské (*Apis dorsata* F.), která byla s více než 5500 nukleotidy největší. Poslední byla sekvence, kterou lze nalézt u včely květné (*Apis florea* F.), obsahující o více než 40 nukleotidů méně. Ta měla méně než 90% shodu.

U genu *vg-like-A* byla zjištěna více než 90 % podobnost tří sekvencí (Tab. 4). První sekvenci, která má o 49 nukleotidů více, lze nalézt u včely východní. Druhá se nachází u včely obrovské. Ta má naopak o 31 nukleotidů méně. Poslední pochází ze včely květné a obsahuje o 15 nukleotidů méně.

Gen *vg-like-B* se shodoval vysokou měrou (více než 97 %) se třemi sekvencemi (Tab. 5). Jednalo se o sekvenci z včely východní, která má o pouhých šest nukleotidů více. Sekvence pocházející ze včely obrovské má o 12 nukleotidů více. Největší sekvence se nacházela u včely květné, ta byla větší o 36 nukleotidů.

U genu *vg-like-C* byly nalezeny pouze dvě sekvence, navíc s menší shodou (cca 83 %) (Tab. 6). První sekvence pocházela ze včely květné a byla menší o více než

300 nukleotidů. Druhá sekvence se nacházela u včely východní. Ta byla výrazně větší nežli sekvence genu *vg-like-C* (o více než 240 nukleotidů).

Tab. 3 Porovnání nukleotidové sekvence genu *vitellogeninu* včely medonosné s ostatními druhy hmyzu („Query cover“ > 95 %, procentuální shoda > 89 %)

Gen (NCBI referenční sekvence/GenBank)	Organismus	Procentuální shoda (%)	Délka sekvence (počet nukleotidů)
<i>vitellogenin</i> (NM_001011578.1)	<i>Apis mellifera</i>	100,00	5441
KP119837.1	<i>Apis cerana</i>	93,16	5313
NM_001328484.1	<i>Apis cerana</i>	92,74	5483
KP398512.1	<i>Apis cerana</i>	92,56	5411
MG775224.1	<i>Apis cerana</i>	92,52	5313
XM_006615976.2	<i>Apis dorsata</i>	92,49	5505
XM_003689645.3	<i>Apis florea</i>	89,44	5395

Tab. 4 Porovnání nukleotidové sekvence genu *vg-like-A* včely medonosné s ostatními druhy hmyzu (procentuální shoda > 90 %)

Gen (NCBI referenční sekvence)	Organismus	Procentuální shoda (%)	Délka sekvence (počet nukleotidů)
<i>vg-like-A</i> (NM_001331117.1)	<i>Apis mellifera</i>	100,00	4739
XM_028667202.1	<i>Apis cerana</i>	94,72	4788
XM_006609516.2	<i>Apis dorsata</i>	93,00	4708
XM_003690825.3	<i>Apis florea</i>	91,46	4724

Tab. 5 Porovnání nukleotidové sekvence genu *vg-like-B* včely medonosné s ostatními druhy hmyzu („Query cover“ > 98 %, procentuální shoda > 90 %)

Gen (NCBI referenční sekvence)	Organismus	Procentuální shoda (%)	Délka sekvence (počet nukleotidů)
<i>vg-like-B</i> (XM_006561115.3)	<i>Apis mellifera</i>	100,00	4419
XM_017055217.2	<i>Apis cerana</i>	98,51	4425
XM_006622136.2	<i>Apis dorsata</i>	97,60	4431
XM_003691345.3	<i>Apis florea</i>	97,11	4455

Tab. 6 Porovnání nukleotidové sekvence genu *vg-like-C* včely medonosné s ostatními druhy hmyzu („Query cover“ > 69 %, procentuální shoda > 83 %)

Gen (NCBI referenční sekvence)	Organismus	Procentuální shoda (%)	Délka sekvence (počet nukleotidů)
<i>vg-like-C</i> (XM_001122505.5)	<i>Apis mellifera</i>	100,00	1671
XM_003691362.3	<i>Apis florea</i>	83,89	1369
XM_017055248.2	<i>Apis cerana</i>	83,80	1917

Pro sekvenci aminokyselin vitellogeninu, jejíž délka je 1770 reziduí, bylo nalezeno šest sekvencí, které se shodují z více než 80 % (Tab. 7). Všechny tyto sekvence pocházejí z různých druhů včely. Nejvyšší hodnotu procentuální shody měla sekvence vitellogeninu ze včely východní o délce 1770 reziduí. Následovala sekvence ze stejného organismu, která měla srovnatelnou procentuální shodu jako sekvence předchozí a obsahovala o jedno reziduum méně. Další sekvence se stejným počtem reziduí byla opět ze stejného druhu. Oproti sekvenci včely medonosné se lišila o méně než 2 %. Čtvrtá sekvence pocházela ze včely obrovské a byla rozdílná také o méně než 2 %, avšak chyběly u ní dvě rezidua. Následovala sekvence označovaná jako vitellogenin-3 opět ze včely východní, která měla podobnost na úrovni předchozí sekvence, nicméně zahrnovala o 21 reziduí více než sekvence zájmu. Poslední sekvence s podobností nad 80 % pocházela ze včely květné a obsahovala o pět reziduí méně.

Aminokyselinová sekvence proteinu *vg-like-A*, složená z 1570 reziduí, byla identická z více než 90 % se třemi dalšími sekvencemi z včelích druhů (Tab 8). Jednalo se o sekvenci vitellogeninu-6-like ze včely východní, která obsahovala stejný počet reziduí a lišila se o více než 5 %. Dále to byla sekvence ze včely obrovské opět se stejným počtem reziduí. Poslední byla sekvence vitellogenin-6-like, pocházející ze včely květné, obsahující o jedno reziduum více a lišící se o více než 9 %.

Pro sekvenci aminokyselin proteinu *vg-like-B*, složenou ze 1420 aminokyselin, byly nalezeny také tři velmi podobné sekvence, tvořené 1420 rezidui (Tab. 9). První pocházela ze včely východní, která se lišila pouze v méně než 2 %. Druhá patřila včele obrovské a byla podobně shodná. Třetí pocházela ze včely květné a byla rozdílná v méně než 3 %.

Sekvence aminokyselin proteinu *vg-like-C*, který je zásadně menší než proteiny předchozí (319 reziduí), se shodovala se třemi sekvencemi z více než 70 % (Tab. 10).

Jednalo se o sekvenci z včely východní, která měla o čtyři rezidua méně a lišila se o méně než 15 %. Další byla o jedno reziduum větší sekvence ze včely květné, jejíž rozdílnost byla menší než 19 %. Poslední byla sekvence ze včely obrovské, která také obsahovala o jedno reziduum navíc a lišila se o méně než 23 %.

Z výsledků je patrné, že mezi nukleotidovými i aminokyselinovými sekvencemi u včely medonosné a u ostatních včelích druhů je určitý rozdíl. Ten by mohl být důsledkem pozitivní selekce genů, při níž dochází ke změnám v sekvenci nukleotidů, které se promítají do sekvence aminokyselin. Pozitivní selekce je u evropské populace včely medonosné častější než u ostatních porovnávaných druhů. Tyto druhy se v Evropě nevyskytují. Důvodem pozitivní selekce by mohla být adaptace na chladnější evropské podnebí, která mohla probíhat po historické migraci včel z Afriky (Ruttner, 1988; Havukainen *et al.*, 2011b; Kent *et al.*, 2011).

Tab. 7 Porovnání aminokyselinové sekvence vitellogeninu včely medonosné s ostatními druhy hmyzu (procentuální shoda > 80 %)

Protein (NCBI referenční sekvence/GenBank)	Organismus	Procentuální shoda (%)	Délka sekvence (rezidua aminokyselin)
Vitellogenin (NP_001011578.1)	<i>Apis mellifera</i>	100,00	1770
AJE68889.1	<i>Apis cerana</i>	89,45	1770
NP_001315413.1	<i>Apis cerana</i>	89,27	1769
AKQ06245.1	<i>Apis cerana</i>	88,88	1770
XP_006616039.1	<i>Apis dorsata</i>	88,72	1768
PBC33094.1	<i>Apis cerana</i>	88,33	1791
XP_003689693.1	<i>Apis florea</i>	85,93	1765

Tab. 8 Porovnání aminokyselinové sekvence vg-like-A včely medonosné s ostatními druhy hmyzu (procentuální shoda > 90 %)

Protein (NCBI referenční sekvence)	Organismus	Procentuální shoda (%)	Délka sekvence (rezidua aminokyselin)
Vg-like-A (XP_001121939)	<i>Apis mellifera</i>	100,00	1570
XP_028523003.1	<i>Apis cerana</i>	94,82	1507
XP_006609579.1	<i>Apis dorsata</i>	93,96	1507
XP_003690873.3	<i>Apis florea</i>	90,78	1508

Tab. 9 Porovnání aminokyselinové sekvence vg-like-B včely medonosné s ostatními druhy hmyzu („Query cover“ = 100 %, procentuální shoda > 90 %)

Protein (NCBI referenční sekvence)	Organismus	Procentuální shoda (%)	Délka sekvence (rezidua aminokyselin)
Vg-like-B* (XP_006561178.1)	<i>Apis mellifera</i>	100,00	1420
XP_016910706.1	<i>Apis cerana</i>	98,73	1420
XP_006622199.1	<i>Apis dorsata</i>	98,03	1420
XP_003691393.1	<i>Apis florea</i>	97,54	1420

*isoforma X1

Tab. 10 Porovnání aminokyselinové sekvence vg-like-C včely medonosné s ostatními druhy hmyzu (procentuální shoda > 70 %)

Protein (NCBI referenční sekvence)	Organismus	Procentuální shoda (%)	Délka sekvence (rezidua aminokyselin)
Vg-like-C (XP_001122505.3)	<i>Apis mellifera</i>	100,00	319
XP_016910737.1	<i>Apis cerana</i>	85,05	315
XP_003691410.2	<i>Apis florea</i>	81,48	320
XP_006615267.2	<i>Apis dorsata</i>	77,78	320

4.4.2 Předpokládaná místa fosforylace

Server NetPhos 3.1, pomocí nějž byly vyhledány předpokládaná místa fosforylace, také vyhodnocuje parametr fosforylačního potenciálu (v grafu na ose y), jehož hodnoty se pohybují v rozmezí 0-1 (Obr. 11-14). Pokud je hodnota vyšší než 0,5 („threshold“ vyznačuje hodnotu 0,5), jedná se o pozitivní predikci fosforylace, tedy pravděpodobnost

fosforylace v takovém místě je více než náhodná. Na ose x jsou vyznačeny aminokyselinová rezidua dané sekvence, kde by mělo k fosforylaci docházet. Červeně je označena aminokyselina serin, zeleně threonin a modře tyrosin (Blom *et al.*, 1999).

Pro sekvenci aminokyselin vitellogeninu bylo nalezeno 311 pozitivních predikcí fosforylací, přičemž některé se nacházely na stejném reziduu, ale měly by být katalyzovány různými kinasami (EC 2.7) (Obr. 11). Podle Havukainen *et al.* (2012) se v oblasti polyserinové spojky (rezidua 349-381) nachází místa, kde dochází k fosforylaci pomocí kasein kinasy II (EC 2.7.11.1). Proto byla tato fosforylace ověřena pomocí programu Gen 5.0, kde bylo vyhledávání omezeno na tento enzym. Podařilo se najít čtyři předpokládaná místa fosforylace, přičemž u jednoho by měla být fosforylace katalyzována pouze kompletním enzymem, u dvou míst buď kompletním enzymem, nebo jeho podjednotkou alfa I a u jednoho jenom zmiňovanou podjednotkou (Tab. 11).

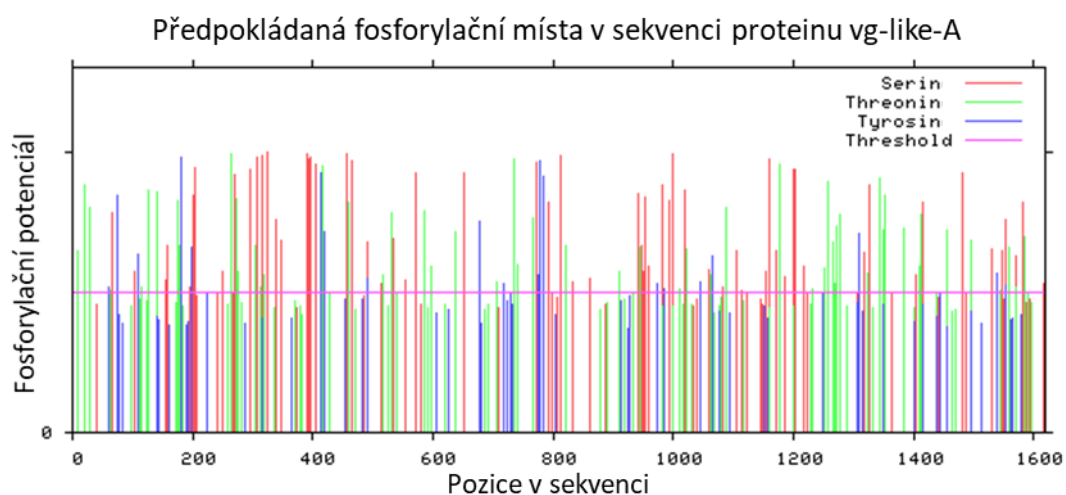
Pro sekvence proteinu vg-like-A bylo zjištěno 214 pozitivních predikcí fosforylací, kdy by opět některé měly být zprostředkovány různými kinasami na jednom reziduu (Obr. 12). To platilo i pro sekvence proteinu vg-like-B a vg-like-C, avšak u vg-like-B se jednalo o 206 pozitivních predikcí fosforylací (Obr. 13) a u vg-like-C jich bylo nalezeno 57 (Obr. 14). Je tedy zřejmé, že u vg-like proteinů je méně předpokládaných míst fosforylace. Příčinou je pravděpodobně jejich postupně se zmenšující velikost a také skutečnost, že postrádají polyserinovou spojku (Salmela *et al.*, 2016). Na ní by mělo s jistotou docházet k fosforylacím (Havukainen *et al.*, 2012).



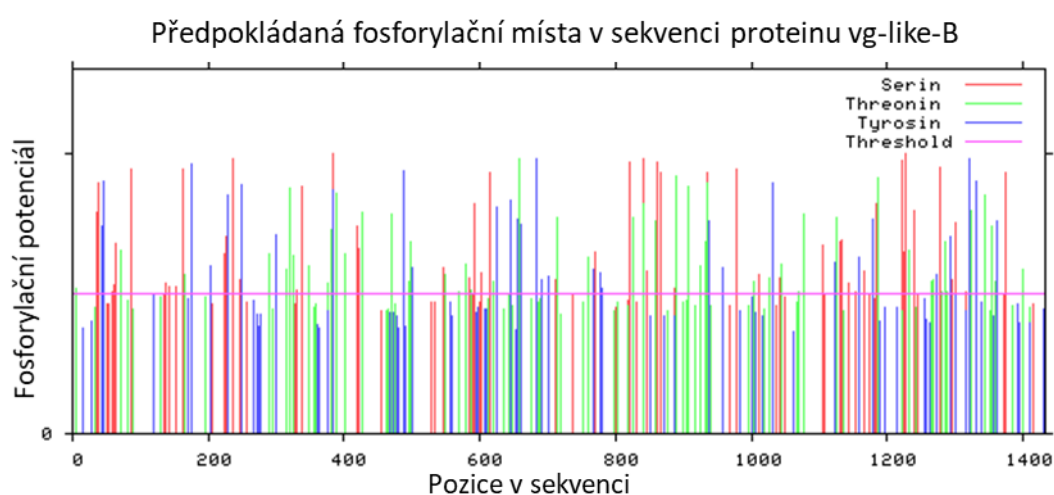
Obr. 11 Predikce fosforylačních míst v sekvenci vitellogeninu pomocí serveru NetPhos 3.1 (Blom *et al.*, 1999).

Tab. 11 Přehled předpokládaných míst fosforylace v sekvenci polyserinové spojky vitellogeninu. Vyhledáno pomocí programu GPS 5.0 (Xue *et al.*, 2005).

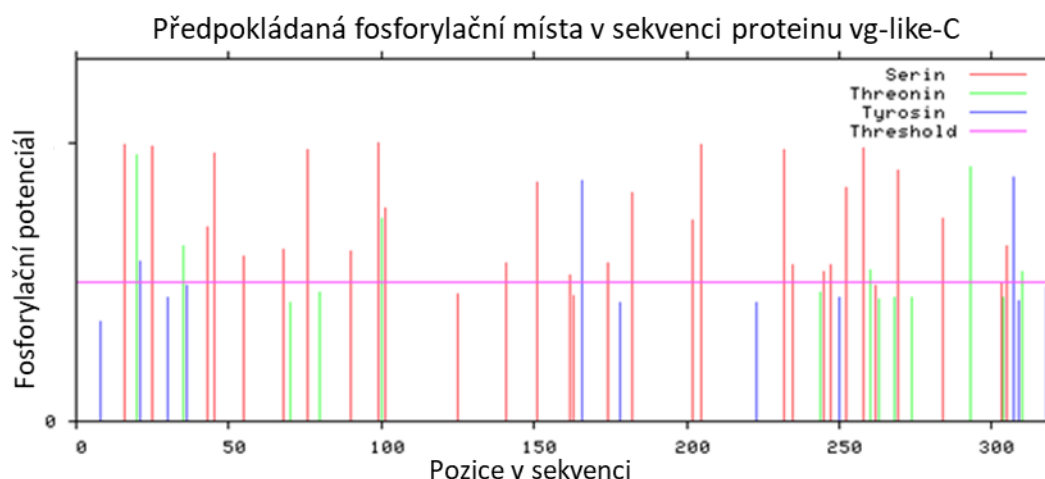
Pořadí rezidua	Aminokyselina	Kinasa
354	S	CKIIaI
355	S	CKII
379	S	CKIIaI
379	S	CKII
380	S	CKIIaI
380	S	CKII



Obr. 12 Predikce fosforylačních míst v sekvenci proteinu vg-like-A pomocí serveru NetPhos 3.1 (Blom *et al.*, 1999).



Obr. 13 Predikce fosforylačních míst v sekvenci proteinu vg-like-B pomocí serveru NetPhos 3.1 (Blom *et al.*, 1999).



Obr. 14 Predikce fosforylačních míst v sekvenci proteinu vg-like-C pomocí serveru NetPhos 3.1 (Blom *et al.*, 1999).

4.4.3 Předpokládaná místa N-glykosylace

Pomocí serveru NetNGlyc 1.0 byl vytvořen předpoklad, kde může v sekvencích vitellogeninu nebo vg-like proteinů docházet k N-glykosylaci. Takovým místem je aminokyselina asparagin hlavně v případě, kdy se nachází v sekvenci aminokyselin v pořadí asparagin-X-serin/threonin, přičemž X může být jakákoliv aminokyselina kromě prolinu.

Grafy, popisující předpokládaná místa N-glykosylace, ukazují na ose y potenciál N-glykosylace a na ose x pořadí rezidua v sekvenci daného proteinu, kde může k N-glykosylaci docházet. Pokud potenciál protíná hranici „threshold“, jedná se o předpokládané místo N-glykosylace.

Pro sekvenci vitellogeninu bylo nalezeno jenom jedno místo s dostatečným potenciálem, kde by mohlo docházet ke glykosylaci (Obr. 15). Salmela *et al.* (2016) popisují po provedení *in silico* analýzy pomocí stejného serveru tři taková místa, avšak z jejich vědecké práce není jasné, zdali nebyly započítány i dvě místa s nízkým potenciálem o hodnotě menší než 0,5. Nicméně Havukainen *et al.* (2011a) pomocí iontoměničové chromatografie naznačili, že by u tohoto proteinu mohla být přítomna dvě glykosylační místa.

V sekvenci proteinu vg-like-A bylo identifikováno šest míst, kde by mělo docházet k N-glykosylaci, avšak dvě z nich (rezidua 354 a 1412) se nacházela v sekvenci s prolinem na druhém místě, což značí nemožnost N-glykosylace (Obr. 16). U proteinu

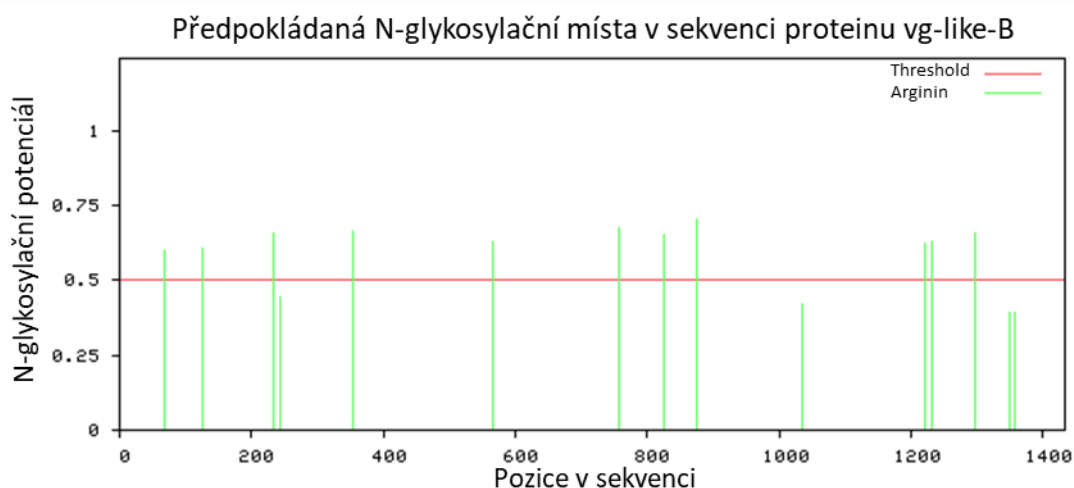
vg-like-B bylo zjištěno 11 míst s dostatečným potenciálem pro N-glykosylaci (Obr. 17). Pro protein vg-like-C se podařilo najít stejně jako pro vitellogenin pouze jedno takové místo (Obr. 18). Stejně počty míst glykosylace pro všechny tři vg-like proteiny uvádí i Salmela *et al.* (2016).



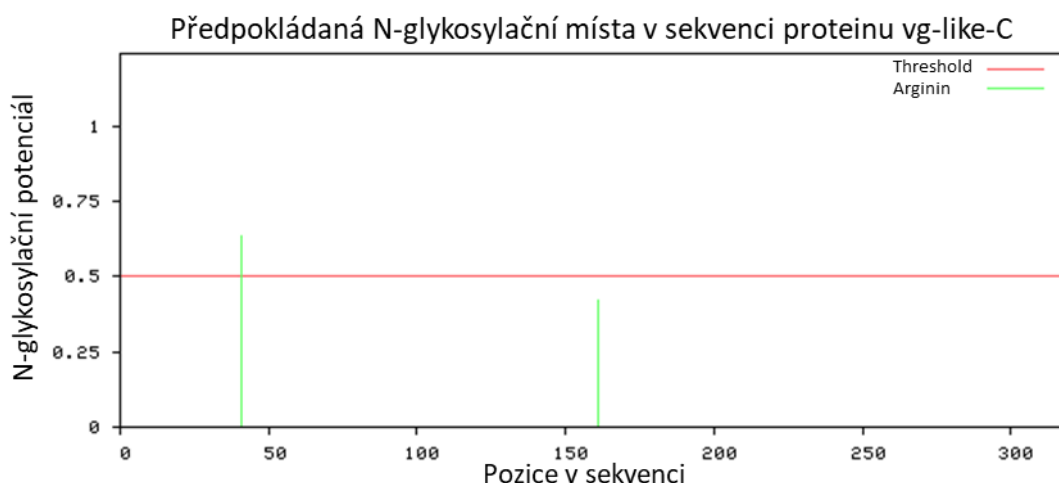
Obr. 15 Predikce míst N-glykosylace v sekvenci vitellogeninu pomocí serveru NetNGlyc 1.0 (Gupta a Brunak, 2001).



Obr. 16 Predikce míst N-glykosylace v sekvenci proteinu vg-like-A pomocí serveru NetNGlyc 1.0 (Gupta a Brunak, 2001).



Obr. 17 Predikce míst N-glykosylace v sekvenci proteinu vg-like-B pomocí serveru NetNGlyc 1.0 (Gupta a Brunak, 2001).



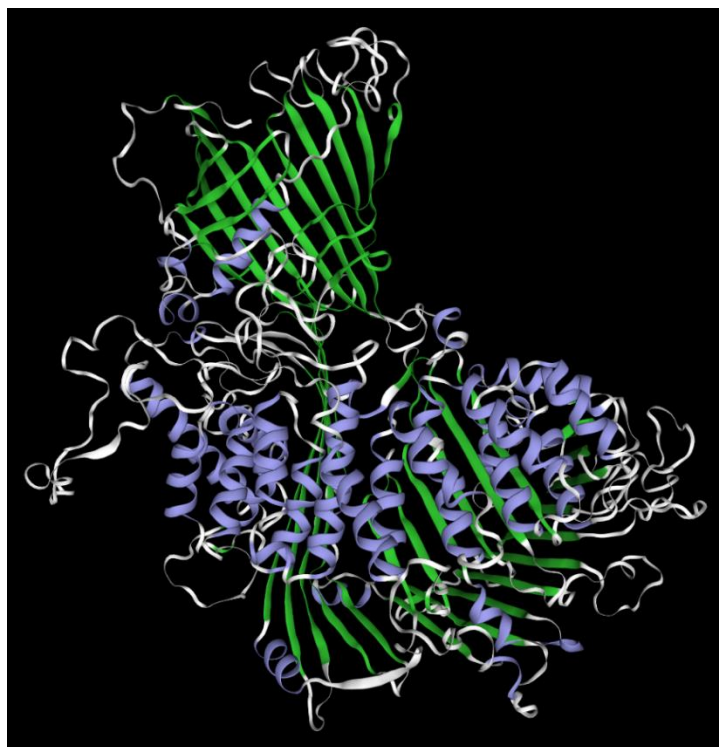
Obr. 18 Predikce míst N-glykosylace v sekvenci proteinu vg-like-C pomocí serveru NetNGlyc 1.0 (Gupta a Brunak, 2001).

4.4.4 3D modely

Server SWISS-MODEL 3D byl využit k vytvoření modelů vitellogenu a vg-like proteinů. Tyto modely byly sestaveny na základě homologního modelování. Jako templát byl použit protein lipovitellin z mihule jednohroté (*Ichthyomyzon unicuspis*). Modely nezobrazují skutečnou podobu proteinů, jelikož nejsou kompletně homologní s templátem. Zeleně jsou v modelech vyznačeny beta-skládané listy, fialově alfa-helixy a bíle smyčky.

Model vitellogeninu byl vytvořen podle dvou podjednotek lipovitellinu (LV-1N a LV-2) (Obr. 19). První podjednotka lipovitellinu se shodovala s částí sekvence vitellogeninu z 16,03 %. U druhé podjednotky byla tato hodnota 13,03 %. Druhý model pro protein vg-like-A byl sestaven podle stejných templátových sekvencí, jako v případě vitellogeninu (Obr. 20). Podjednotky lipovitellinu se shodovaly ze 14,02 % a 10,85 %. Model proteinu vg-like-B byl vytvořen pouze podle podjednotky lipovitellinu LV-1N, u které byla shoda 17,97 % (Obr. 21). Doména nejmenšího proteinu vg-like-C byla také vymodelována podle podjednotky LV-1N, přičemž hodnota shody sekvencí byla 12,45 % (Obr. 22).

Vzniklé modely se podobají těm, které byly vytvořeny složitějším programem (MODELER) v práci Salmela *et al.* (2016), avšak se nepodařilo vyobrazit molekuly lipidů. Pozorovatelné však jsou u vitellogeninu dvě velké domény – N-list a alfa-helikální doména. Ty jsou přítomné také u modelů proteinů vg-like-A a -B. U nejmenšího proteinu vg-like-C přirozeně chybí alfa-helikální doména. Části, které se ani v jednom z modelů nevyskytují kvůli nedostatku homologních sekvencí, jsou polyserinová spojka, vWFD doména a C-koncová oblast.



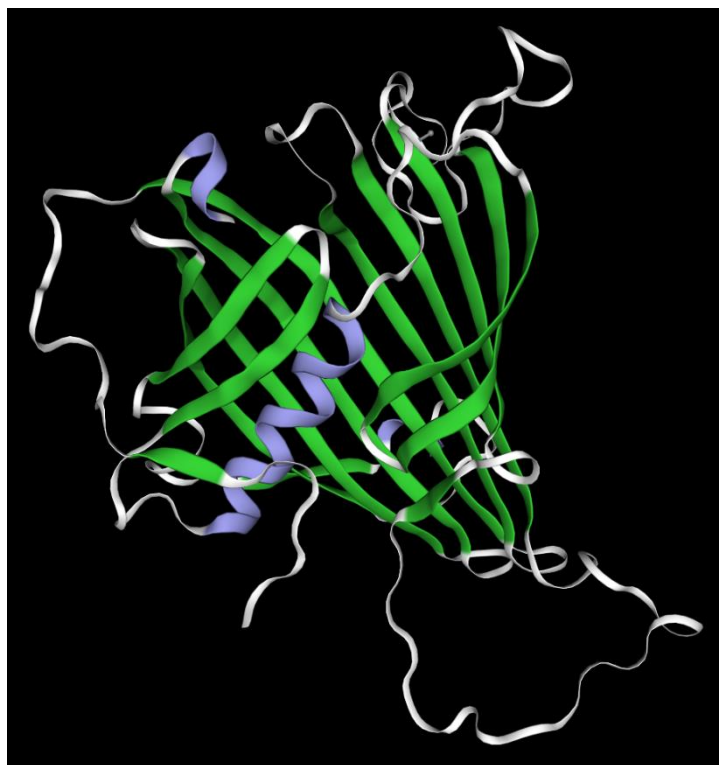
Obr. 19 Model struktury vitellogeninu vytvořený serverem SWISS-MODEL 3D (Guex *et al.*, 2009; Bienert *et al.*, 2017; Bertoni *et al.*, 2017; Waterhouse *et al.*, 2018; Studer *et al.*, 2020). Zeleně jsou vyznačeny beta-skládané listy, fialově alfa-helixy a bíle smyčky.



Obr. 20 Model struktury proteinu vg-like-A vytvořený serverem SWISS-MODEL 3D (Guex *et al.*, 2009; Bienert *et al.*, 2017; Bertoni *et al.*, 2017; Waterhouse *et al.*, 2018; Studer *et al.*, 2020). Zeleně jsou vyznačeny beta-skládané listy, fialově alfa-helixy a bíle smyčky.



Obr. 21 Model struktury proteinu vg-like-B vytvořený serverem SWISS-MODEL 3D (Guex *et al.*, 2009; Bienert *et al.*, 2017; Bertoni *et al.*, 2017; Waterhouse *et al.*, 2018; Studer *et al.*, 2020). Zeleně jsou vyznačeny beta-skládané listy, fialově alfa-helixy a bíle smyčky.



Obr. 22 Model struktury proteinu vg-like-C vytvořený serverem SWISS-MODEL 3D (Guex *et al.*, 2009; Bienert *et al.*, 2017; Bertoni *et al.*, 2017; Waterhouse *et al.*, 2018; Studer *et al.*, 2020). Zeleně jsou vyznačeny beta-skládané listy, fialově alfa-helixy a bíle smyčky.

5 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vypracovat přehled současných znalostí o proteinu vitellogeninu u včely medonosné, které se týkaly zejména jeho genu, struktury, biosyntézy, a také funkcí v imunitě či antioxidační ochraně. Dále byly shrnuty poznatky o metodách, kterými lze studovat tento protein, zaměřujících se zejména na jeho izolaci, purifikaci a detekci. V experimentální části byly provedeny tři metody. Jednalo se o stanovení proteinů podle Bradforda, metodu SDS-PAGE a Western blot. Také byla uskutečněna bioinformatická analýza, zahrnující porovnávání sekvencí aminokyselin a nukleotidů vitellogeninu a vg-like proteinů a jejich genů. Kromě toho byla u těchto proteinů vyhledávána předpokládaná místa fosforylace a N-glykosylace. Nakonec byly pomocí specializovaného serveru vytvořeny homologní modely pro tyto proteiny.

V této práci bylo dosaženo následujících výsledků:

1. Byla určena celková koncentrace proteinů ve vzorcích včelí hemolymfy pomocí Bradfordovy metody.
2. Metodou SDS-PAGE byly separovány proteiny ve vzorku hemolymfy a vitellogenin byl následně v polyakrylamidovém gelu detekován pomocí nespecifické detekce proteinů i specifické detekce fosfoproteinů a lipoproteinů.
3. Využitím specifické polyklonální protilátky byl detekován vitellogenin metodou Western blot.
4. Při porovnávání sekvencí aminokyselin a nukleotidů vitellogeninu a vg-like proteinů a jejich genů včely medonosné byly zjištěny značné podobnosti se sekvencemi z dalších druhů včel, nejčastěji ze včely východní s častou shodou přes 90 %.
5. Byla predikována místa fosforylace v polyserinové spojení vitellogeninu, kterou by podle Havukainen *et al.* (2012) mohla katalyzovat kasein kinasa II.
6. Homologním modelováním byly naznačeny rozdíly, které se můžou vyskytovat mezi strukturními doménami vitellogeninu a vg-like proteinů.

Další práce by mohla být zaměřena na kvantifikaci a porovnání exprese genu *vitellogeninu* v různých tkáních včely. Pro přesnější určení struktury vitellogeninu by také mohla být provedena krystalizace purifikovaného proteinu a jeho rentgenostrukturní analýza.

6 LITERATURA

- Altschul S. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**, 3389-3402.
- Altschul S., Wootton J. C., Gertz E. M., Agarwala R., Morgulis A., Schaffer A. A., Yu Y.-K. (2005): Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS Journal* **272**, 5101-5109.
- Amdam G. V., Omholt S. W. (2002): The Regulatory Anatomy of Honeybee Lifespan. *Journal of Theoretical Biology* **216**, 209-228.
- Amdam G. V., Simões Z. L. P., Guidugli K. R., Norberg K., Omholt S. W. (2003a): Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 1799-1802.
- Amdam G. V., Simões Z. L. P., Guidugli K. R., Norberg K., Omholt S. W. (2003b): Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology* **3**, 1-8.
- Amdam G. V., Omholt S. W. (2003c): The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology* **223**, 451-464.
- Amdam G. V., Simões Z. L. P., Hagen A., Norberg K., Schröder K., Mikkelsen Ø., Kirkwood T. B.L., Omholt S. W., (2004): Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology* **39**, 767-773.
- Amdam G. V., Aase A. L. T.O., Seehuus S.-C., Kim F. M., Norberg K., Hartfelder K. (2005): Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology*. **40**, 939-947.
- Amdam G. V., Seehuus S.-Ch. (2006): Order, Disorder, Death: Lessons from a Superorganism. In: *Advances in cancer research*. 1., (G. V. Woude, G. Klein eds.), Elsevier, 31-60.
- Amdam G. V., Ihle K. E., Page R. E. (2009): Regulation of Honeybee Worker (*Apis mellifera*) Life Histories by Vitellogenin. In: *Hormones, Brain and Behavior*. Elsevier, 1003-1027.
- Amdam G. V. (2011): Social context, stress, and plasticity of aging. *Aging Cell* **10**, 18-27.
- Amdam G. V., Fennern E., Havukainen H. (2012): Vitellogenin in Honey Bee Behavior and Lifespan. In: *Honeybee Neurobiology and Behavior*. 1., (Galizia, C. G., Eisenhardt D., Giurfa M. eds.), Dordrecht, Springer, Netherlands, 17-29.
- Amsalem E., Malka O., Grozinger Ch., Hefetz A. (2014): Exploring the role of juvenile hormone and vitellogenin in reproduction and social behavior in bumble bees. *BMC Evolutionary Biology* **14**, 1-13.
- Arrese E. L., Soulagès J. L. (2010): Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*. **55**, 207-225.
- Atzmon G., Gabriely I., Greiner W., Davidson D., Schechter C., Barzilai N. (2002): Plasma HDL Levels Highly Correlate With Cognitive Function in Exceptional Longevity. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **57**, 712-715.
- Aurori C. M., Buttstedt A., Dezmirean D. S., Mărghițaș L. A., Moritz R. F. A., Erler S. (2014): What Is the Main Driver of Ageing in Long-Lived Winter Honeybees: Antioxidant Enzymes, Innate Immunity, or Vitellogenin?. *The Journals of Gerontology: Series A* **69**, 633-639.
- Baker M. E. (1988): Is vitellogenin an ancestor of apolipoprotein B-100 of human low-density lipoprotein and human lipoprotein lipase?. *Biochemical Journal* **255**, 1057-1060.
- Barchuk A. R., Bitondi M. M. G., Simões Z. L. P. (2002): Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science* **2**, 1-8.
- Barr P. J. (1991): Mammalian subtilisins: The long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell* **66**, 1-3.
- Bedick J. C., Tunaz H., Nor Aliza A.R., Putnam S. M., Ellis M. D., Stanley D. W. (2001): Eicosanoids act in nodulation reactions to bacterial infections in newly emerged adult honey bees, *Apis mellifera*, but not in older foragers. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* **130**, 107-117.

- Berg J. M., Tymoczko J. L., Stryer L. (2002): *Biochemistry*. 5., W. H. Freeman, New York, 1100.
- Bertoni M., Kiefer F., Biasini M., Bordoli L., Schwede T. (2017): Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Scientific Reports* **7**.
- Bienert S., Waterhouse A., de Beer T. A. P., Tauriello G., Studer G., Bordoli L., Schwede T. (2017): The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Research* **45**, 313-319.
- Bitondi, M. M., Simões A. M., Nascimento Z. L., Garcia S. L. (1994): Variation in the Haemolymph Protein Composition of Confined Apis Mellifera and Partial Restoration of Vitellogenin Titre by Juvenile Hormone Analogue Treatment. *Journal of Hymenoptera research* **3**, 107-117.
- Bitondi M. M. G., Simões Z. L. P. (1996): The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized Apis mellifera workers. *Journal of Apicultural Research* **35**, 27-36.
- Bloch G., Wheeler D. E., Robinson G. E. (2002): Endocrine Influences on the Organization of Insect Societies. In: *Hormones, Brain and Behavior*. 3., Elsevier, 195-235.
- Blom N., Gammeltoft S., Brunak S. (1999): Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology* **294**, 1351-1362.
- Callewaert L., Michiels Ch. W. (2010): Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences* **35**, 127-160.
- Capella I. C. S., Hartfelder K. (1998): Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *Journal of Insect Physiology* **44**, 385-391.
- Cardoso-Júnior C. A. M., Oldroyd B. P., Ronai I. (2021): Vitellogenin expression in the ovaries of adult honeybee workers provides insights into the evolution of reproductive and social traits. *Insect Molecular Biology*.
- Cohen P. (2000): The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences* **25**, 596-601.
- Corona M., Velarde R. A., Remolina S., Moran-Lauter A., Wang Y., Hughes K. A., Robinson G. E. (2007): Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 7128-7133.
- Crailsheim K. (1986): Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifica carnica* Pollm.). *Journal of Insect Physiology* **32**, 629-634.
- Crailsheim K., Stolberg E. (1989): Influence of diet, age and colony condition upon intestinal proteolytic activity and size of the hypopharyngeal glands in the honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* **35**, 595-602.
- Crailsheim K. (1990): The protein balance of the honey bee worker. *Apidologie* **21**, 417-429.
- Crailsheim K. (1991): Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Comparative Physiology B* **161**, 55-60.
- Della-Cioppa G., Engelmann F. (1987): The vitellogenin of *Leucophaea maderae*. *Insect Biochemistry* **17**, 401-415.
- Engels W., Fahrenhorst H. (1974): Alters- und kastenspezifische Veränderungen der Haemolymph-Protein-Spektren bei *Apis mellificia*. *Wilhelm Roux' Archiv für Entwicklungsmechanik der Organismen* **174**, 285-296.
- Engels, W., Kaatz H., Zillikens A., Simões Z. L. P., Trube A., Braun R., Dittrich F., Hoshi M., Yamashita O. (1990): Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In: *Advances in invertebrate reproduction* 5. 1st edition, Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division), Netherlands, 495 - 502.
- Erbán T., Jedelsky P. L., Titera D. (2013): Two-dimensional proteomic analysis of honeybee, *Apis mellifera*, winter worker hemolymph. *Apidologie* **44**, 404-418.
- Fahrbach S. E., Giray T., Robinson G. E. (1995): Volume Changes in the Mushroom Bodies of Adult Honey Bee Queens. *Neurobiology of Learning and Memory* **63**, 181-191.

- Feingold K. R., Grunfeld C. (2012): Lipids: a key player in the battle between the host and microorganisms. *Journal of Lipid Research* **53**, 2487-2489.
- Finkel T., Holbrook N. J. (2000): Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-247.
- Fluri P., Wille H., Gerig L., Lüscher M. (1977): Juvenile hormone, vitellogenin and haemocyte composition in winter worker honeybees (*Apis mellifera*). *Experientia* **33**, 1240-1241.
- Fluri P., Sabatini A. G., Vecchi M. A., Wille H. (2015): Blood Juvenile Hormone, Protein and Vitellogenin Titres in Laying and Non-Laying Queen Honeybees. *Journal of Apicultural Research* **20**, 221-225.
- Freitak D., Heckel D. G., Vogel H. (2009): Dietary-dependent trans-generational immune priming in an insect herbivore. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **276**, 2617-2624.
- Freitak D., Schmidtberg H., Dickel F., Lochnit G., Vogel H., Vilcinskis A. (2014): The maternal transfer of bacteria can mediate trans-generational immune priming in insects. *Virulence* **5**, 547-554.
- Giorgi F., Snigirevskaya E. S., Raikhel A. S. (2005): The cell biology of yolk protein precursor synthesis and secretion. In: *Reproductive Biology of Invertebrates. vol. XII, Part B: Progress in Vitellogenesis*. 1st edition, CRC Press, Boca Raton, 33-68.
- González-Santoyo I., Córdoba-Aguilar A. (2012): Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **142**, 1-16.
- Guex N., Peitsch M. C., Schwede T. (2009): Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *ELECTROPHORESIS* **30**, 162-173.
- Guidugli K. R., Nascimento A. M., Amdam G. V., Barchuk A. R., Omholt S., Simões Z. L. P., Hartfelder K. (2005): Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters* **579**, 4961-4965.
- Guidugli-Lazzarini K. R., do Nascimento A. M., Tanaka É. D., Piulachs M. D., Hartfelder K., Bitondi M. G., Simões Z. L. P. (2008): Expression analysis of putative vitellogenin and lipophorin receptors in honey bee (*Apis mellifera* L.) queens and workers. *Journal of Insect Physiology* **54**, 1138-1147.
- Gupta R., Brunak S. (2001): Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. In: *Biocomputing 2002*. WORLD SCIENTIFIC, 310-322.
- Hagedorn H. H., Moeller F. E. (2015): The Rate of Pollen Consumption by Newly Emerged Honeybees. *Journal of Apicultural Research* **6**, 159-162.
- Harman D. (1956): Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology* **11**, 298-300.
- Hartfelder K., Steinbrück G. (1997): Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. *Invertebrate Reproduction & Development* **31**, 237-250.
- Hartfelder K., Engels W. (1998): Social Insect Polymorphism: Hormonal Regulation of Plasticity in Development and Reproduction in the Honeybee. In: *Current topics in developmental biology*, Elsevier, **40**, 45-77.
- Hausman D. B., Fischer J. G. a Johnson M. A. (2012): Protein, lipid, and hematological biomarkers in centenarians: Definitions, interpretation and relationships with health. *Maturitas* **71**, 205-212.
- Havukainen H., Halskau Ø., Skjaerven L., Smedal B., Amdam G. V. (2011a): Deconstructing honeybee vitellogenin: novel 40 kDa fragment assigned to its N terminus. *Journal of Experimental Biology* **214**, 582-592.
- Havukainen H., Halskau Ø., Amdam G. V. (2011b): Social pleiotropy and the molecular evolution of honey bee vitellogenin. *Molecular Ecology* **20**, 5111-5113.
- Havukainen H., Underhaug J., Wolschin F., Amdam G. V., Halskau Ø. (2012): A vitellogenin polyserine cleavage site: highly disordered conformation protected from proteolysis by phosphorylation. *Journal of Experimental Biology* **215**, 1837-1846.

- Havukainen H., Münch D., Baumann A., Zhong S., Halskau Ø., Krogsgaard M., Amdam G. V. (2013): Vitellogenin Recognizes Cell Damage through Membrane Binding and Shields Living Cells from Reactive Oxygen Species. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 28369-28381.
- Hernández López J., Schuehly W., Crailsheim K., Riessberger-Gallé U. (2014): Trans-generational immune priming in honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **281**.
- Hernández-Martínez P., Naseri B., Navarro-Cerrillo G., Escriche B., Ferré J., Herrero S. (2010): Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis*. *Environmental Microbiology* **12**.
- Hnasko T. S., Hnasko R. M. (2015): The Western Blot. In: *ELISA*. (Hnasko, Robert, ed.) Springer New York, New York, NY, 87-96.
- Hou L., Liu K., Li Y., Ma S., Ji X., Liu L. (2016): Necrotic pyknosis is a morphologically and biochemically distinct event from apoptotic pyknosis. *Journal of Cell Science* **129**, 3084-3090.
- Hsieh Y.-S., Hsu C.-Y. (2011): Honeybee trophocytes and fat cells as target cells for cellular senescence studies. *Experimental Gerontology* **46**, 233-240.
- Huang Z.-Y., Robinson G. E. (1996): Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **39**, 147-158.
- Cho N.-H., Seong S.-Y. (2009): Apolipoproteins inhibit the innate immunity activated by necrotic cells or bacterial endotoxin. *Immunology* **128**, 479-486.
- Joshi S., Yu D. (2017): Immunofluorescence. In: *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 1st edition, Elsevier, s. 135-150.
- Kent C. F., Issa A., Bunting A. C., Zayed A. (2011): Adaptive evolution of a key gene affecting queen and worker traits in the honey bee, *Apis mellifera*. *Molecular Ecology* **20**, 5226-5235.
- Kuang J., Yan X., Genders A. J., Granata C., Bishop D. J., Kalendar R. (2018): An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLOS ONE* **13**, 1-27.
- Lee R. D. (2003): Rethinking the evolutionary theory of aging: Transfers, not births, shape senescence in social species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 9637-9642.
- Lemaitre B., Hoffmann J. (2007): The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology* **25**, 697-743.
- Leoncini I., Le Conte Y., Costagliola G., Plettner E., Toth A. L., Wang M., Huang Z., Becard J.-M., Crauser D., Slessor K. N., Robinson G. E. (2004): Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 17559-17564.
- Lin H., Winston M. L. (1998): The role of nutrition and temperature in the ovarian development of the worker honey bee (*Apis mellifera*). *The Canadian Entomologist* **130**, 883-891.
- Lu C.-Y., Huang P.-J., Hsu C.-Y. (2018): The cholesterol-hydroxyecdysone-vitellogenin pathway is involved in the longevity of trophocytes and oenocytes of queen honey bees (*Apis mellifera*). *Apidologie* **49**, 721-733.
- Marmaras V. J., Lampropoulou M. (2009): Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling* **21**, 186-195.
- Mazzini M., Burrini A., Giorgi F. (1989): The secretory pathway of vitellogenin in the fat body of the stick insect *Bacillus rossius*: An ultrastructural and immunocytochemical study. *Tissue and Cell* **21**, 589-604.

- Mckay G. J., Silvestri G., Chakravarthy U., Dasari S., Fritsche L. G., Weber B. H., Keilhauer C. N., Klein M. L., Francis P. J., Klaver C. C., Vingerling J. R., Ho L., De Jong P. T. D. V., Dean M., Sawitzke J., Baird P. N., Guymer R. H., Stambolian D., Orlin A., Seddon J. M., Peter I., Wright A. F., Hayward C. (2011): Variations in Apolipoprotein E Frequency With Age in a Pooled Analysis of a Large Group of Older People. *American Journal of Epidemiology* **173**, 1357-1364.
- Mocchegiani E., Muzzioli M., Giacconi R. (2000): Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing. *Biogerontology*. **1**, 133-143.
- Morandin C., Havukainen H., Kulmuni J., Dhaygude K., Trontti K., Helanterä H. (2014): Not Only for Egg Yolk—Functional and Evolutionary Insights from Expression, Selection, and Structural Analyses of Formica Ant Vitellogenins. *Molecular Biology and Evolution* **31**, 2181-2193.
- Moreau J., Martinaud G., Troussard J.-P., Zanchi C., Moret Y. (2012): Trans-generational immune priming is constrained by the maternal immune response in an insect. *Oikos* **121**, 1828-1832.
- Moret Y. (2006): "Trans-generational immune priming": specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **273**, 1399-1405.
- Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T. L., Agarwala R., Schäffer A. A. (2008): Database indexing for production MegaBLAST searches. *Bioinformatics* **24**, 1757-1764.
- Münch D., Kreibich C. D., Amdam G. V. (2013): Aging and its modulation in a long-lived worker caste of the honey bee. *Journal of Experimental Biology*. **216**, 1638-1649.
- Münch D., Amdam G. V. (2010): The curious case of aging plasticity in honey bees. *FEBS Letters* **584**, 2496-2503.
- Münch D., Ihle K. E., Salmela H., Amdam G. V. (2015): Vitellogenin in the honey bee brain: Atypical localization of a reproductive protein that promotes longevity. *Experimental Gerontology* **71**, 103-108.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (c1988-2021). Bethesda, Spojené státy americké: National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (17. 5. 2021).
- Nelson C. M., Ihle K. E., Fondrk M. K., Page R. E., Amdam G. V., Chittka L. (2007): The Gene vitellogenin Has Multiple Coordinating Effects on Social Organization. *PLoS Biology* **5**, 673-677.
- Page R. E., Fondrk M., Hunt G. J., Guzmán-Novoa E., Humphries M. A., Nguyen K., Greene A. S. (2000): Genetic dissection of honeybee (*Apis mellifera* L.) foraging behavior. *Journal of Heredity* **91**, 474-479.
- Pelley J. W. (2012): Recombinant DNA and Biotechnology. In: *Elsevier's Integrated Review Biochemistry*. 2nd edition, Elsevier, 161-169.
- Petrova O. E., Sauer K. (2017): High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)-Based Detection and Quantitation of Cellular. In: *C-di-GMP Signaling*. 1657., (Sauer K. ed.), Springer, New York, 33-43.
- Pinto L. Z., Bitondi M. M. G., Simões Z. L. P. (2000): Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *Journal of Insect Physiology* **46**, 153-160.
- Piulachs M.D., Guidugli K.R., Barchuk A.R., Cruz J., Simões Z.L.P., Bellés X. (2003): The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **33**, 459-465.
- Rachinsky A., Strambi C., Strambi A., Hartfelder K. (1990): Caste and metamorphosis: Hemolymph titers of juvenile hormone and ecdysteroids in last instar honeybee larvae. *General and Comparative Endocrinology* **79**, 31-38.
- Raikhel A. S., Dhadialla T. S. (1992): Accumulation of Yolk Proteins in Insect Oocytes. *Annual Review of Entomology* **37**, 217-251.
- Rembold H., Dietz A. (1966): Biologically Active Substances in Royal Jelly. In: *Vitamins & Hormones*. 23., Elsevier, 359-382.

- Remolina S. C., Hafez D. M., Robinson G. E., Hughes K. A. (2007): Senescence in the worker honey bee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* **53**, 1027-1033.
- Robinson G. E. (1992a): Regulation of Division of Labor in Insect Societies. *Annual Review of Entomology* **37**, 637-665.
- Robinson G. E., Page R. E., Strambi C., Strambi A. (1992b): Colony Integration in Honey Bees: Mechanisms of Behavioral Reversion. *Ethology* **90**, 336-348.
- Roth O., Sadd B. M., Schmid-Hempel P., Kurtz J. (2009): Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **276**, 145-151.
- Rouillé Y., Duguay S. J., Lund K., Furuta M., Gong Q., Lipkind G., Oliva A. A., Chan S. J., Steiner D. F. (1995): Proteolytic Processing Mechanisms in the Biosynthesis of Neuroendocrine Peptides: The Subtilisin-like Proprotein Convertases. *Frontiers in Neuroendocrinology* **16**, 322-361.
- Rueppell O., Fondrk M. K., Page R. E. (2005): Biodemographic analysis of male honey bee mortality. *Aging Cell* **4**, 13-19.
- Ruttner F. (1988): *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*. 1st edition. Springer, Berlin, Heidelberg, 284.
- Sadd B. M., Kleinlogel Y., Schmid-Hempel R., Schmid-Hempel P. (2005): Trans-generational immune priming in a social insect. *Biology Letters* **1**, 386-388.
- Salmela H., Amdam G. V., Freitak D., Schneider D. S. (2015): Transfer of Immunity from Mother to Offspring Is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin. *PLOS Pathogens* **11**, e1005015.
- Salmela H., Stark T., Stucki D., Fuchs S., Freitak D., Dey A., Kent C. F., Zayed A., Dhaygude K., Hokkanen H., Sundström L. (2016): Ancient Duplications Have Led to Functional Divergence of Vitellogenin-Like Genes Potentially Involved in Inflammation and Oxidative Stress in Honey Bees. *Genome Biology and Evolution* **8**, 495-506.
- Sánchez-Bayo F., Goulson D., Pennacchio F., Nazzi F., Goka K., Desneux N. (2016): Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. *Environment International* **89-90**, 7-11.
- Sappington T. W., Raikhel A. S. (1998): Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 277-300.
- Seehuus S.-Ch., Norberg K., Gimsa U., Krekling T., Amdam G. V. (2006): Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 962-967.
- Seehuus S.-Ch., Norberg K., Krekling T., Fondrk K., Amdam G. V. (2007): Immunogold Localization of Vitellogenin in the Ovaries, Hypopharyngeal Glands and Head Fat Bodies of Honeybee Workers, *Apis Mellifera*. *Journal of Insect Science* **7**, 1-14.
- Segraves W. A. (1994): Steroid Receptors and Other Transcription Factors in Ecdysone Response. In: *Proceedings of the 1992 Laurentian Hormone Conference*. 49., Elsevier, 167-195.
- Sengupta P., Khanra K., Chowdhury A. R., Datta P. (2019): Lab-on-a-chip sensing devices for biomedical applications. In: *Bioelectronics and Medical Devices*. 1st edition, Elsevier, 47-95.
- Seong S.-Y., Matzinger P. (2004): Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature Reviews Immunology* **4**, 469-478.
- Schmid M. R., Brockmann A., Pirk Ch. W. W., Stanley D. W., Tautz J. (2008): Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology* **54**, 439-444.
- Slessor K. N., Winston M. L., Conte Y. L. (2005): Pheromone Communication in the Honeybee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Chemical Ecology* **31**, 2731-2745.
- Smedal B., Brynne M., Kreibich C. D., Amdam G. V. (2009): Brood pheromone suppresses physiology of extreme longevity in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology* **212**, 3795-3801.
- Snigirevskaya E. S., Hays A. R., Raikhel A. S. (1997): Secretory and internalization pathways of mosquito yolk protein precursors. *Cell and Tissue Research* **290**, 129-142.

- Snigirevskaya E. S., Raikhel A. S. (2005): Receptor-mediated endocytosis of yolk proteins in insect oocytes. In: *Reproductive Biology of Invertebrates. Vol. 12, Part B*, 1st edition, CRC Press, Boca Raton, 199-228.
- Sohal R. S., Weindruch R. (1996): Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science* **273**, 59-63.
- Sohal R. S. (2002): Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 37-44.
- Spieth J., Nettleton M., Zucker-Aprison E., Lea K., Blumenthal T. (1991): Vitellogenin motifs conserved in nematodes and vertebrates. *Journal of Molecular Evolution* **32**, 429-438.
- Strand M. R., Pech L. L. (1995): Immunological Basis for Compatibility in Parasitoid-Host Relationships. *Annual Review of Entomology* **40**, 31-56.
- Strand M. R. (2008): The insect cellular immune response. *Insect Science* **15**(1), 1-14.
- Studer G., Rempfer C., Waterhouse A. M., Gumienny R., Haas J., Schwede T., Elofsson A. (2020): QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics* **36**, 1765-1771.
- Terman A., Brunk U. T. (2006): Oxidative Stress, Accumulation of Biological 'Garbage', and Aging. *Antioxidants & Redox Signaling* **8**, 197-204.
- Trenczek T., Engels W. (1986): Occurrence of vitellogenin in drone honeybees (*Apis mellifica*). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* **10**, 307-311.
- Trenczek T., Zillikens A., Engels W. (1989): Developmental patterns of vitellogenin haemolymph titre and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology* **35**, 475-481.
- Tufail M., Takeda M. (2008): Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology* **54**, 1447-1458.
- Tufail M., Nagaba Y., Elgendy A. M., Takeda M. (2014): Regulation of vitellogenin genes in insects. *Entomological Science* **17**, 269-282.
- Wang Y., Brent C. S., Fennern E., Amdam G. V., Rulifson E. (2012): Gustatory Perception and Fat Body Energy Metabolism Are Jointly Affected by Vitellogenin and Juvenile Hormone in Honey Bees. *PLoS Genetics* **8**.
- Wang H., Zhang S.-W., Zeng Z.-J., Yan W.-Y. (2014a): Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie* **45**, 618-625.
- Wang X., Ni M., Niu C., Zhu X., Zhao T., Zhu Z., Xuan Y., Cong W. (2014b): Simple detection of phosphoproteins in SDS-PAGE by quercetin. *EuPA Open Proteomics* **4**, 156-164.
- Wang, Y., Ma L.-T., Xu B.-H. (2015): Diversity in life history of queen and worker honey bees, *Apis mellifera* L. *Journal of Asia-Pacific Entomology* **18**, 145-149.
- Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S., Studer G., Tauriello G., Gumienny R., Heer F. T., de Beer T. A. P., Rempfer C., Bordoli L., Lepore R., Schwede T. (2018): SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research* **46**, 296-303.
- Wheeler D. E., Kawooya J. K. (1990): Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **14**, 253-267.
- Xue, Y., Zhou F., Zhu M., Ahmed K., Chen G., Yao X. (2005): GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Research* **33**, 184-187.
- Yang W., Tian Y., Han M., Miao X. (2017): Longevity extension of worker honey bees (*Apis mellifera*) by royal jelly: optimal dose and active ingredient. *PeerJ* **5**.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. (2000): A Greedy Algorithm for Aligning DNA Sequences. *Journal of Computational Biology* **7**, 203-214.
- Zor T., Selinger Z. (1996): Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Anal Biochem* **236**, 302-308.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA/BIS	akrylamid/N,N'-mehylenbisakrylamid
AMK	aminokyseliny
APS	peroxodisíran amonný
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
bHLH-PAS	rodina proteinů „basic helix–loop–helix/Per – Arnt– Sim“
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“ – srovnávač primárních sekvencí
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cDNA	komplementární DNA
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DTT	dithiotreitol
EC	numerické klasifikační schéma pro enzymy
FACS	fluorescenčně-aktivované třídění buněk
FASTA	formát sekvencí aminokyselin či nukleotidů
Fl	intenzita fluorescence
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRE	elementy reagující na hormon
hROS	vysoce reaktivní formy kyslíku
LV	lipovitellin
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MALDI-TOF	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s detektorem doby letu
MET	protein „methoprene-tolerant“
mRNA	mediátorová RNA
NBT	nitrotetrazoliová modř
PBS	fosfátem pufovaný solný roztok
Pbm	hnědooká kukla se středně pigmentovanou kutikulou
PCR	polymerázová řetězová reakce
Pha	kukla vypadající jako dospělec

ppm	jedna miliontina celku
qPCR	kvantitativní PCR
RNA	ribonukleová kyselina
RNAi	RNA interference
SA- β -Gal	beta-galaktosidasa spojená se stárnutím
S. E.	směrodatná odchylka
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TBS	solný roztok pufovaný Tris
TBS-T	roztok Tweenu v TBS
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin
USP	jaderný receptor „ultraspiracle“
Vg	vitellogenin
VgR	receptor vitellogeninu
Vn	vitellin
vWFD	von Willebrandův faktor, typ D