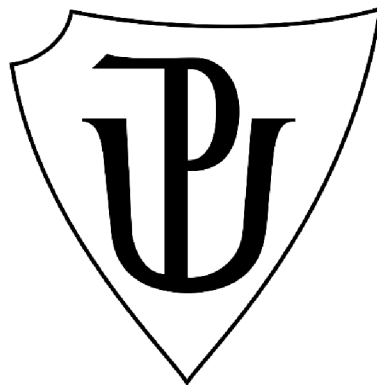


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Prírodovedecká fakulta  
Katedra biochémie



**Antioxidačné funkcie včelieho vitellogenínu**

## **BAKALÁRSKA PRÁCA**

Autor:	<b>Eva Hrtánková</b>
Študijný program:	B1406 Biochémia
Študijný odbor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	<b>prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.</b>
Rok:	2022

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa .....

.....

Podpis študenta

Chcela by som veľmi pekne poďakovať vedúcemu mojej bakalárskej práce, prof. Mgr. Marekovi Petřivalskému, Dr., za odborné vedenie, trpezlivosť a pomoc pri vypracovávaní bakalárskej práce. Zároveň moje poďakovanie patrí všetkým zamestnancom Katedry biochémie za ochotu a cenné rady pri vypracovávaní experimentálnej časti práce.

## Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Eva Hrtánková
Názov práce	Antioxidačné funkcie včelieho vitellogenínu
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby	2022

### Abstrakt

Táto bakalárska práca sa zaoberá štúdiom proteínu vitellogenínu so zameraním na jeho pôsobenie v organizme včely medonosnej (*Apis mellifera*). Vitellogenín podľa doterajších poznatkov zohráva významnú úlohu v regulácii dlhovekosti, sociálnom usporiadaní, imunitných reakciách a antioxidačnej ochrane včiel. Teoretická časť práce predstavuje súhrn informácií o štruktúre a vlastnostiach vitellogenínu. V literárnej rešerši sú ďalej zhrnuté dopady pôsobenia oxidačného stresu na živé organizmy a krátky prehľad metód využívaných na testovanie antioxidačných vlastností proteínov a nízkomolekulárnych látok. V experimentálnej časti bola optimalizovaná detekcia vitellogenínu z včelej hemolymfy metódou Western blot. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté v usporiadaní Semi-dry blot s využitím nitrocellulosovej membrány a polovičným riedením primárnej protilátky oproti pôvodnému protokolu. Následne prebiehalo testovanie antioxidačných vlastností vitellogenínu pomocou detekcie nitrovaných a karbonylovaných proteínov. Bolo dokázané, že včelí vitellogenín a hexameríny podliehajú nitrácii, čo môže byť pokladané za kľúčové zistenie pre ďalší výskum v súvislosti s antioxidačnými vlastnosťami vitellogenínu. Prítomnosť karbonylovaných proteínov sa nepodarilo preukázať ani v hemolymfe, ani na vzorovom hovädzom sérovom albumíne.

Kľúčové slová	vitellogenín, proteíny, včela medosná, antioxidant, oxidačný stres, dlhovekosť, imunita
Počet strán	71
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský



## **Bibliographical identification**

Autor's first name and surname	Eva Hrtánková
Title	Antioxidant functions of honey bee vitellogenin
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2022

### **Abstract**

This bachelor thesis deals with the study of vitellogenin protein with a focus on its action in the honey bee (*Apis mellifera*). Vitellogenin, according to previous knowledge, plays an important role in the regulation of longevity, social organization, immune responses and antioxidant protection in honey bees. The theoretical part of this thesis presents a summary of information on the structure and properties of vitellogenin. Further, it summarizes the effects of oxidative stress on living organisms and a brief review of methods used to test the antioxidant properties of proteins and low molecular weight substances. In the experimental part, the detection of vitellogenin from honey bee haemolymph by Western blot was optimised. The best results were obtained in a Semi-dry blot arrangement using nitrocellulose membrane and half dilution of the primary antibody compared to the original protocol. Subsequently, the antioxidant properties of vitellogenin were tested by detecting nitrated and carbonylated proteins. Honey bee vitellogenin and hexamerins were shown to undergo nitration, which can be considered as a key finding for further research regarding the antioxidant properties of vitellogenin. The presence of carbonylated proteins could not be demonstrated either in haemolymph or on the model bovine serum albumin.

Keywords	vitellogenin, protein, honey bee, antioxidant, oxidative stress, longevity, immunity
Number of pages	71
Number of appendices	0
Language	Slovak

## OBSAH

1 ÚVOD .....	1
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....	3
2.1 Molekulárne vlastnosti včelieho vitellogenínu.....	3
2.1.1 Gén <i>vitellogenínu</i> .....	3
2.1.2 Štruktúra vitellogenínu .....	4
2.1.3 Biosyntéza a lokalizácia.....	6
2.2 Biologické funkcie včelieho vitellogenínu.....	7
2.2.1 Funkcie vitellogenínu vo vývoji .....	7
2.2.2 Funkcie vitellogenínu v reprodukcií .....	8
2.2.3 Vzťah vitellogenínu a včelích hormónov .....	9
2.2.4 Funkcie vitellogenínu v imunite .....	11
2.2.5 Rozdielne funkcie Vg medzi včelími kastami .....	14
2.2.6 Funkcie vitellogenínu v stresových odpovediach hmyzu .....	16
2.2.7 Funkcie vitellogenínu v dlhovekosti a antioxidačnej ochrane včiel .....	17
3 TESTOVANIE ANTIOXIDAČNÝCH VLASTNOSTÍ MOLEKÚL .....	20
3.1 Oxidačné poškodenie makromolekúl .....	20
3.2 Meranie antioxidačných vlastností proteínov.....	21
3.2.1 Detekcia karbonylovaných proteínov .....	21
3.2.2 Detekcia modifikácií tyrosínu.....	22
3.2.3 Detekcia tiolových skupín značených [ <sup>14</sup> C] iódacetamidom .....	23
3.3 Stanovenie antioxidačnej aktivity ostatných molekúl .....	23
3.3.1 Stanovenie celkovej antioxidačnej aktivity metódou TEAC .....	23
3.3.2 Reakcia s difenylpikrylhydrazylom .....	24
3.3.3 Metóda ORAC .....	24
3.3.4 Metóda FRAP .....	24
4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....	26

4.1 Materiál .....	26
4.1.1 Chemikálie .....	26
4.1.2 Roztoky .....	27
4.1.3 Biologický materiál.....	28
4.1.4 Prístroje a pomôcky .....	28
4.2 Metódy.....	29
4.2.1 Stanovenie proteínov v hemolymfe Bradfordovou metódou.....	29
4.2.2 Príprava nitrovanej hemolymfy a BSA.....	30
4.2.3 Príprava oxidovanej hemolymfy a modifikácia s DNPH .....	30
4.2.4 SDS-PAGE .....	30
4.2.4.1 Elektroforéza nemodifikovanej hemolymfy .....	30
4.2.4.2 Elektroforéza nitrovaných proteínov.....	32
4.2.4.3 Elektroforéza karbonylovaných proteínov .....	33
4.2.5 Western blot .....	33
4.2.5.1 Semi-dry blot pre detekciu vitellogenínu .....	34
4.2.5.2 Tank blot pre detekciu vitellogenínu.....	34
4.2.5.3 Semi-dry blot pre detekciu nitrovaných proteínov.....	35
4.2.5.4 Semi-dry blot pre detekciu karbonylovaných proteínov .....	35
4.2.6 Imunochemická detekcia proteínov na membráne .....	35
4.2.6.1 Pôvodný protokol pre detekciu vitellogenínu .....	35
4.2.6.2 Optimalizovaný postup detekcie vitellogenínu po Semi-dry blot.....	36
4.2.6.3 Optimalizovaný postup detekcie vitellogenínu po Tank blot .....	36
4.2.6.4 Detekcia nitrovaných proteínov .....	36
4.2.6.5 Detekcia karbonylovaných proteínov .....	37
5 VÝSLEDKY A DISKUSIA .....	38
5.1 Stanovenie proteínov v hemolymfe Bradfordovou metódou .....	38
5.2 Detekcia vitellogenínu.....	40

5.2.1	Separácia proteínov včelej hemolymfy metódou SDS-PAGE .....	40
5.2.2	Western blot a imunochemická detekcia proteínov .....	41
5.2.2.1	Detekcia vitellogenínu po Semi-dry blot .....	41
5.2.2.2	Detekcia vitellogenínu po Tank blot .....	44
5.2.2.3	Zhrnutie optimalizácie metódy Western blot a imunodetekcie.....	45
5.3	Detekcia nitrovaných proteínov .....	46
5.3.1	Separácia proteínov metódou SDS-PAGE .....	46
5.3.2	Imunochemická detekcia proteínov na membráne .....	47
5.4	Detekcia karbonylovaných proteínov .....	50
5.4.1	Separácia proteínov metódou SDS-PAGE .....	50
5.4.2	Imunochemická detekcia proteínov na membráne .....	51
6	ZÁVER .....	53
7	LITERATÚRA.....	54
8	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....	62

## Ciele práce

### Teoretická časť

Vypracovať literárnu rešerš:

- aktuálnych znalostí o proteíne vitellogeníne so zameraním na funkciu v reprodukčnom, imunitnom a antioxidantnom systéme včely medonosnej (*Apis mellifera*)
- metód testovania antioxidantných vlastností nízkomolekulárnych látok a proteínov

### Praktická časť

- Optimalizovať postup detekcie vitellogenínu z včelej hemolymfy pomocou metódy Western blot
- Testovať analýzu antioxidantných vlastností vitellogenínu *in vitro* pomocou metódy Western blot

## 1 ÚVOD

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patrí medzi zástupcov eusociálneho hmyzu (eusocialita vyjadruje spoločenské usporiadanie, kedy v jednom hniezde žije viac vzájomne spolupracujúcich jedincov rovnakého druhu) s prísne kastovým usporiadaním. Zástupcovia jednotlivých kást sa odlišujú nielen funkciou, ale aj dĺžkou života, čo súvisí s odolnosťou voči oxidačnému stresu. Ukazuje sa, že na regulácii tohto usporiadania sa významne podieľa proteín vitellogenín (Vg) okrem iného aj tým, že ochraňuje dlhšie žijúce včely pred oxidačným poškodením organizmu. Štúdium Vg a jeho antioxidantných vlastností je preto predmetom záujmu mnohých vedeckých prác a predstavuje dôležitý míľnik v pochopení dlhovekosti, imunity a sociálneho usporiadania včiel.

Vitellogenín je charakteristický hlavne pre vajcorodé a vajcoživorodé živočíchy. Jeho názov bol odvodený od slova vitellogenéza, čo je termín označujúci proces tvorby vaječného žltka (Pan et al., 1969). V dozrievajúcom oocyte zohráva najmä nutričnú funkciu – pôsobí ako prekursor vitellínu (Vn), hlavného proteínu sprostredkujúceho výživu embrya vo vaječnom žltku (Engelmann, 1979; Tufail & Takeda, 2008). Produkcia Vg prebieha extraovariálne – u hmyzu v tukovom teliesku a u stavovcov prevažne v pečeni a hepatopankrease, odkiaľ je odvádzaný krvou alebo hemolymfou do vaječného žltka (Engelmann 1979; Havukainen et al., 2013).

Hmyzí Vg má okrem výživy embrya niekoľko ďalších funkcií. Zohráva úlohu v transporte lipidov a sacharidov, čo znamená, že po proteosyntéze môže byť upravený rôznymi posttranslačnými modifikáciami, ako napr. glykozyláciou, lipidáciou alebo fosforyláciou a prenášať tak naviazané molekuly do oocyty (Tufail & Takeda, 2008). Rovnako zastáva aj imunitnú a antioxidantnú funkciu. Jeho prítomnosť v hemolymfe hmyzu pravdepodobne súvisí s prevenciou proti oxidačnému stresu vyvolanému reaktívnymi kyslíkovými radikálmi (ROS) alebo reaktívnymi dusíkovými radikálmi (RNS). Je všeobecne známe, že zvýšená miera oxidačného stresu spôsobuje predčasné starnutie (Harman, 1956). Predpokladá sa, že obsah Vg v hemolymfe včely medonosnej preto vplýva na dlhovekosť. Vysoká koncentrácia Vg je charakteristická pre špecifickú populáciu robotníc, takzvané „zimné“ včely (lat. *diutinus*), ktoré dokážu prežiť až 1 rok na rozdiel od „letných“ včiel, ktoré prežívajú 4-8 týždňov (Page & Peng, 2001; Amdam et al, 2004).

Vg je schopný viazať sa na poškodené a odumreté bunky, vďaka čomu je predpokladaný jeho protizápalový účinok (Havukainen et al., 2013). Vykazuje tiež

zvýšenú afinitu k zložkám bakteriálnej bunkovej steny (peptidoglykán, kyselina lipoteichoová, lipopolysacharidy) a po naviazaní na baktériu môže pôsobiť ako molekula signalizujúca jej prítomnosť a uľahčujúca fagocytózu imunitným bunkám (Li et al., 2008).

V teoretickej časti bakalárskej práce je uvedený prehľad aktuálnych poznatkov o pôsobení Vg v organizme včely medonosnej. Hlavným cieľom praktickej časti je testovať vplyv RNS a ROS na Vg a prispieť tak k doterajším zisteniam ohľadom antioxidantných vlastností včelieho Vg.

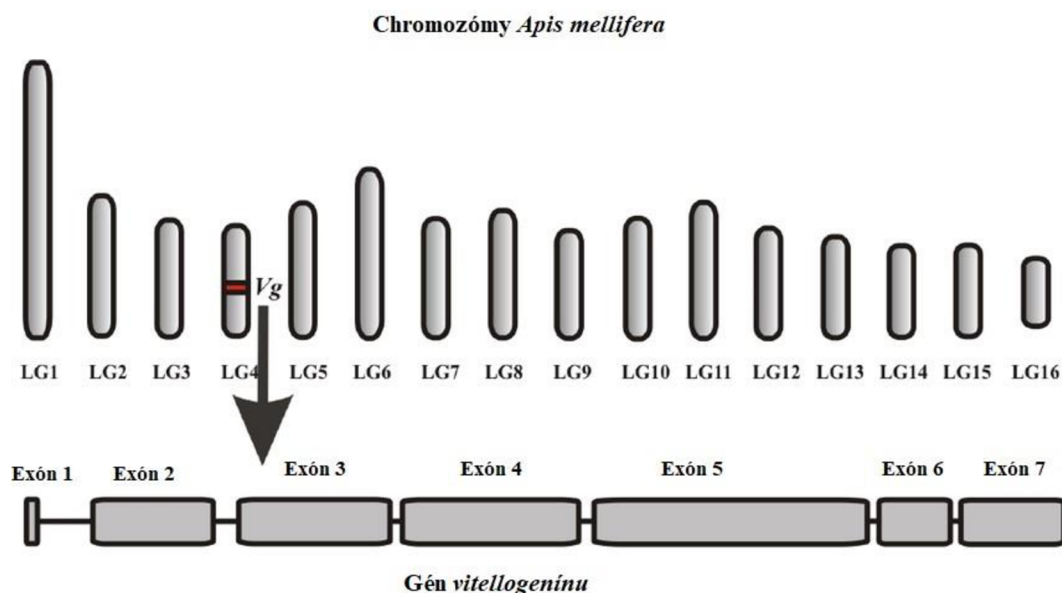
## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 Molekulárne vlastnosti včelieho vitellogenínu

#### 2.1.1 Gén *vitellogenínu*

Gén včelieho *vitellogenínu* (*Vg*) má dĺžku 5440 bp. Kóduje monomérny 180 kDa polypeptid tvorený sekvenciou 1770 aminokyselín (Wheeler & Kawooya, 1990; Piluchas et al., 2003). Napriek tomu, že u väčšiny organizmov je tento proteín špecifický pre plodné samičie jedince, u včiel bola expresia *Vg* génu potvrdená aj u robotníc a trúdiv (Trenczek et al., 1989; Barchuk et al., 2002).

Vitellogenín je polygenetický proteín, čo znamená, že niektoré druhy organizmov sú schopné exprimovať viac ako jeden *Vg* gén. Napríklad kobylka druhu *Nilaparvata lugens* má iba jeden *Vg* gén, kura domáca (*Gallus gallus*) exprimuje tri *Vg* gény, pazúrnatka vodná (*Xenopus laevis*) má štyri a hlístovec druhu *Caenorhabditis elegans* má až šesť *Vg* génov (Jiang et al., 2020). Počet exprimovaných *Vg* génov u hmyzu sa tiež líši na základe druhu. Väčšina druhov z radu blanokřídlavcov (*Hymenoptera*), kam patrí aj včela medonosná, má iba jednu kópiu *Vg* génu (Tufail & Takeda, 2008). Nukleotidová sekvencia včelieho *Vg* pozostáva zo siedmich exónov a gén je lokalizovaný na štvrtom chromozóme (Obr. 1) (Ilyasov et al., 2015).



Obr. 1: Lokalizácia génu *vitellogenínu* včely medonosnej na štvrtom chromozóme a jeho exón-intronová štruktúra (prevzaté a upravené podľa Ilyasov et al., 2015).



Gén hmyzieho *Vg* prešiel v evolučnom vývoji rôznymi zmenami. Jedná sa najmä o zmenu aminokyselinového zloženia. Z pôvodného proteínu sa v rámci vývoja a adaptácie diferencovali vitellogenínu podobné proteíny (*vg-like*), a to konkrétne *vg-like-A*, *vg-like-B* a *vg-like-C* (Morandin et al., 2014). *Vg-like* gény včiel sa od *Vg* génu líšia lokalizáciou na chromozómoch: *vg-like-A* je lokalizovaný na 13. chromozóme a *vg-like-B* spolu s *vg-like-C* na 2. chromozóme. Tiež bol pozorovaný rozdiel v počte glykozylačných miest, umiestnení sekrečného signálneho peptidu a fosforylačných miest medzi *Vg* a *vg-like* homológmi (Salmela et al., 2016).

### 2.1.2 Štruktúra vitellogenínu

Včelí vitellogenín je monoméry fosfolipoglykoproteín. Obsahuje približne 91 % aminokyselín, 7 % lipidov (prevažne fosfolipidy a diacylglycerol) a 2 % sacharidov (hlavne kovalentne viazaná manosa). Na rozdiel od iných typov vitellogenínov, včelí pozostáva iba z jedného typu apoproteínu (Wheeler & Kawooya, 1990).

Zrelý 180 kDa proteín sa nachádza v hemolymfe a tukovom teliesku včiel a môže byť ďalej štiepený na dva menšie reťazce. Fragment o veľkosti 150 kDa pozostáva z  $\alpha$ -helikálnej domény. Vyskytuje sa v hemolymfe a vaječníkoch kráľovien, tukovom teliesku a hypofaryngeálnych žľazách robotníc, v ktorých slúži najmä ako výživa pri kŕmení lariev. Druhý fragment je ľahší (40 kDa), obsahuje N-koncovú doménu proteínu a jeho prítomnosť je spojená prevažne s tukovým telieskom. Funkcia tohto fragmentu však ešte nie je celkom objasnená. Väčšina hmyzích *Vg* je štiepená v blízkosti polyserínovej spojky, kde sa nachádza štiepne miesto RXXR (R – arginín, X – akákoľvek iná aminokyselina). Na toto miesto sa viažu špecifické endoproteazy (EC 3.4). Včeliemu *Vg* toto miesto chýba a štiepenie je pravdepodobne regulované fosforyláciou, ale princíp a podrobnosti tohto procesu sú zatiaľ neznáme (Amdam et al., 2003a; Seehus et al., 2007; Havukainen et al., 2011).

Hmyzí *Vg* pozostáva z troch hlavných domén (Obr. 2): N-koncová doména, doména s neznámou funkciou (DUF1943) a von Willebrandov faktor typu D (vWFD). Niektorí autori uvádzajú tiež štvrtú, C-koncovú doménu. V sekvencii *Vg* bolo objavených 5 aminokyselinových zvyškov, ktoré sú pravdepodobne zodpovedné za jeho funkčný polymorfizmus. Predpokladá sa, že pri väzbe konkrétneho patogénu na tieto miesta je *Vg* schopný prispôbiť svoju štruktúru a efektívnejšie rozpoznávať podobné patogény (Tufail & Takeda, 2008; Leipart et al., 2021).

N-koncová doména je rozdelená na dve subdomény ( $\beta$ -barel a  $\alpha$ -helix), ktoré sú medzi sebou prepojené polyserínovou spojkou. Vo vnútri domény sa nachádza kladne nabitá hydrofóbna dutina. Je pravdepodobné, že do tejto dutiny sa viažu záporne nabité mastné kyseliny (Havukainen et al., 2011). N-koncová doména obsahuje väzbové miesto pre vitellogenínové receptory, avšak vykazuje tiež vysokú afinitu k lipidovej dvojvrstve bunkových membrán, na ktorú sa dokáže viazať aj bez receptorov (Havukainen et al., 2013).

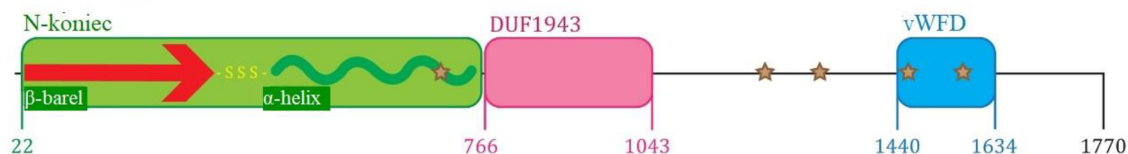
Polyserínová spojka je lokalizovaná medzi  $\beta$ -barelom a  $\alpha$ -helixom. Ide o charakteristickú štruktúrnú črtu Vg blanokrídľeho hmyzu. Predpokladá sa, že zohráva úlohu ako fosforylačné miesto, v ktorom sa nachádza vysoká koncentrácia záporného náboja, čo môže podporovať rozpustnosť Vg alebo tvorbu chelátov s niektorými esenciálnymi iónmi (napr.  $\text{Ca}^{2+}$  alebo  $\text{Fe}^{3+}$ ) (Tufail & Takeda, 2008).

Štruktúru von vWFD možno rozdeliť do dvoch segmentov. Jeden pozostáva z  $\beta$ -sendviča a druhý obsahuje väzbové miesto pre  $\text{Ca}^{2+}$  ióny, krátku  $\alpha$ -helikálnu štruktúru a tri krátke  $\beta$ -vlákna. Segmenty sú navzájom prepojené disulfidovými väzbami. Funkciou vWFD by hypoteticky mohla byť účasť na rozoznávaní patogénov (Leipart et al., 2021).

V C-koncovej časti za vWFD doménou nasleduje 9 cysteínových zvyškov a konzervovaná GL/ICG (G – glycín, L – leucín, I – isoleucín, C – cysteín) sekvencia. Táto časť molekuly Vg pravdepodobne, tak ako u stavovcov, súvisí s oligomerizáciou vitellínu. Predpokladaná funkcia oligomerizovaného Vn u hmyzu spočíva v naviazaní neaktívnych steroidných hormónov (ekdyteroidov), ktoré sa postupne uvoľňujú počas embryogenézy (Tufail & Takeda, 2008).

Vg-like proteíny pozostávajú z podobných štruktúr ako Vg, avšak odlišujú sa zložením. Najviac podobný Vg je proteín vg-like-A, ale tak ako ostatným Vg-like proteínom mu chýba polyserínová spojka. Vg-like-B okrem toho nemá ani doménu vWFD a lipidová dutina je zmenšená. Vg-like-C sa od ostatných homológov odlišuje najviac, pretože je tvorený iba  $\beta$ -barelovou subdoménou N-listu (Salmela et al., 2016).

## Včelí vitellogenín



Obr. 2: Štruktúra včelieho vitellogenínu. Včelí Vg obsahuje proteolytické štiepne miesto, polyserínovú spojku (žlté S), ktorá spája  $\beta$ -barel (červená šípka) a  $\alpha$ -helix (zelená vlnovka) subdomény N-konca. Aminokyselinové zvyšky zodpovedné za polymorfizmus (hnedé hviezdičky) sú na pozíciách 640, 1220, 1284, 1451 a 1536 (upravené podľa Leipart et al., 2021).

### 2.1.3 Biosyntéza a lokalizácia

Vo všeobecnosti je vitellogenín považovaný za špecifický proteín vaječného žltka a jeho syntéza prebieha iba v dospelých plodných samičích jedincoch. Pre sociálny hmyz toto pravidlo neplatí. V prípade včely medonosnej dochádza k syntéze Vg aj u robotníčok a trúdov (Trenczek et al., 1989; Barchuk et al., 2002; Piulachs et al., 2003). Vg je dokonca syntetizovaný aj vo vývojovom štádiu larvy a kukly (Guidugli et al., 2005a).

Proces transkripcie Vg prebieha hlavne v tukovom teliesku, a to konkrétne v bunkách nazývaných trofocyty. Najviac trofocytov sa u včiel nachádza v oblasti zadočku, ale niektoré sú rozptýlené v okolí hrude a hlavy (Corona et al., 2007; Amdam et al., 2012). Expresia Vg u včelej matky prebieha aj vo vaječníkoch, avšak v menšej miere ako v tukovom tkanive (Guidugli et al., 2005a). U robotníčok sa dlho predpokladalo, že Vg je exprimovaný výlučne v tukovom teliesku. Cardoso-Júnior et al. (2021) vo svojej štúdií dokázali, že včelie robotníčky dokážu exprimovať Vg gén rovnako vo vaječníkoch. Prítomnosť Vg bola preukázaná aj v mozgu krmičiek, no nie je dokázané, či tu prebieha aj jeho syntéza alebo je do mozgu transportovaný (Münch et al., 2015).

Počas syntézy Vg v hmyzích tukových bunkách dochádza k mnohým zmenám, vďaka ktorým sa z buniek plniacich prevažne zásobnú funkciu stávajú bunky, v ktorých prebieha proteosyntéza. U hmyzu boli rozlíšené tri fázy syntézy vitellogenínu: 1) previtellogenetická fáza, kedy sa v bunkách vyskytujú veľké lipidové inklúzie, veľké glykogény a jadro je sploštené; 2) vitellogenetická fáza charakteristická zväčšeným drsným endoplazmatickým retikulom a Golgiho aparátom, veľkým jadrom a viaclaločným jadričkom; 3) terminačná fáza, kedy je prítomný zvýšený počet lyzozómov (Valle, 1993).

Skladanie novovzniknutej molekuly vitellogenínu do konečnej podoby prebieha v endoplazmatickom retikule, kde dochádza tiež k jeho posttranslačným modifikáciám.

Odtiaľ je transportovaný do sekrečných vezikúl prostredníctvom membránového spojenia s Golgiho aparátom (Mazzini et al., 1989). Následne dochádza k sekrécii Vg do hemolymfy, ktorou sa dostáva do cieľových tkanív (Raikhel & Dhadialla, 1992).

## **2.2 Biologické funkcie včelieho vitellogenínu**

### **2.2.1 Funkcie vitellogenínu vo vývoji**

Včela medonosná je radená do kategórie eusociálneho hmyzu. Typická kolónia včelstva pozostáva z 10-20 tisíc vajíčok, lariev, kukiel, viac ako 30 000 dospelých robotníc, nula až niekoľko stoviek trúdov a jednej matky. Vo väčšine prípadov platí, že matka je ako jediná schopná klásť oplodnené vajíčka a dožíva sa najvyššieho veku (Page & Peng, 2001; Rodriguez Messan et al., 2018). Dospelé robotnice prechádzajú niekoľkými vývinovými štádiami. Po premene z kukly sa z včely stáva tzv. mladuška, ktorá má po dobu približne troch dní za úlohu čistiť bunky v úli. Následne mladuška prechádza do štádia krmíčky, ktorá sa stará o larvy a kŕmi ich. Toto obdobie trvá 3-11 dní. Potom sa z krmíčky stáva strážkyňa, ktorej úlohou je ochraňovať úl a spracovávať nektár. Najstaršie včelie robotnice sa nazývajú lietavky. Ide o včely staršie ako 20 dní, ktoré vylietavajú z úľa a zbierajú potravu (Johnson, 2003; Page et al., 2012).

Vývin včely možno rozdeliť do štyroch fáz: vajíčko, larva, kukla a dospelý jedinec. Vitellogenín, ako prekurzor proteínov vo vaječnom žltku, je najdôležitejším zdrojom aminokyselín pre dozrievajúce embryo. Do vajíčka sa dostáva z hemolymfy matky, kde už tri dni po dosiahnutí dospelosti tvorí viac ako 70 % zo všetkých proteínov (Hagedorn & Kunkel, 1979; Guidugli et al., 2005). Po vyliahnutí včely z vajíčka sa o jej výživu starajú krmíčky. V ich hypofaryngenálnych žľazách vzniká tzv. včelia materská kašička, čo je zmes esenciálnych proteínov vrátane Vg, ktorá slúži ako výživa pre larvy. Rýchlosť syntézy Vg u krmíčiek je v tomto období priamo úmerná množstvu vajíčok nakladených matkou. Produkcia Vg je tiež závislá na kvalite a dostupnosti peľu a s prechodom do štádia lietavky sa znižuje (Amdam et al., 2003a; Rodriguez Messan et al., 2018).

Špecifické vitellogenínové receptory (VgR) patria do skupiny lipoproteínových receptorov s nízkou hustotou a ich expresia sa pri väčšine živočíchov vzťahuje na vaječníky. U včely medonosnej bola dokázaná prítomnosť VgR (250 kDa) aj v hypofaryngenálnych žľazách robotníc. Na základe tohto zistenia je možné

predpokladať, že Vg sa okrem výživy podieľa aj na tvorbe včelej materskej kašičky (Amdam et al., 2003a; Guidugli-Lazzarini et al., 2008).

Guidugli et al. (2005a) vo svojej štúdií zistili, že v ranom štádiu vývoja larvy robotnice je prítomná vysoká expresia Vg, ktorá sa postupne znižuje a v štádiu predkukly a rannej kukly už Vg nie je exprimovaný vôbec. V štádiu neskorej kukly znova dochádza k expresii Vg, pričom koncentrácia Vg v hemolymfe kukly je podobná ako koncentrácia Vg v hemolymfe mladých dospelých robotníc. Rovnakému experimentu boli podrobené aj počiatočné vývojové štádiá trúdov a matky, pričom záver bol totožný (Guidugli et al., 2005a).

Funkcia včely v úli je okrem veku riadená tiež vonkajšími podmienkami, ročným obdobím, hladinou hormónov a zložením potravy. Vyššia hladina Vg je spojená s konzumáciou a zberom peľu, ktorý je bohatý na obsah proteínov. To má pozitívny vplyv na syntézu Vg najmä u krmíčiek, ktoré tak môžu zabezpečiť dostatok proteínov pre larvy. Naopak, staršie včely s nižšou koncentráciou Vg v hemolymfe vyhľadávajú nektár obsahujúci najmä sacharidy (Nelson et al., 2007; Marco Antonio et al., 2008).

V období nepriaznivých vonkajších podmienok, napr. nízke teploty, dlhotrvajúce dažde, zimné obdobie a pod. robotnice prestávajú so zberom potravy či vychovávaním plodu a stávajú sa z nich tzv. „zimné včely“ (lat. *diutinus*). Táto kasta robotníc je charakteristická vysokou koncentráciou Vg v hemolymfe a jeho expresiou v tukovom teliesku. *Diutinus* sa nestarajú sa o plod ani nezahŕňajú potravu. Ich hlavnou úlohou v úli je udržať stabilnú teplotu (30 °C), pričom teplo generujú pomocou kontrakcie hrudných svalov. Primárnym zdrojom potravy je v tomto období zásoba medu (Omholt, 1987). Tieto robotnice dokážu prežiť niekoľkonásobne dlhšie obdobie (až 1 rok), na rozdiel od letných robotníc, ktoré prežívajú 4-8 týždňov (Page & Peng, 2001).

### **2.2.2 Funkcie vitellogenínu v reprodukcii**

Názov vitellogenínu bol odvodený od slova vitellogenéza, čo je pojem označujúci proces tvorby vaječného žltka (Pan et al., 1969). Prenos Vg do ovárií prebieha pomocou VgR procesom nazývaným endocytóza. Po naviazaní Vg na VgR dôjde k vytvoreniu Vg/VgR komplexu, ktorý je transportovaný do cytoplazmy. Komplex oddisociuje v podobe endozómu a putuje do vaječného žltka (Raikhel & Dhadialla, 1992). Vg následne kryštalizuje a je uložený vo forme označovanej ako vitellín. Vn pôsobí ako hlavný zdroj aminokyselín pre dozrievajúce embryo. Vďaka jeho kryštalickej podobe je možné

regulovať uvoľňovanie aminokyselín pomocou kontrolovanej hydrolyzy kryštalického proteínu na jednotlivé peptidy. Týmto spôsobom je pre dozrievajúce embryo zabezpečený konštantný prísun potrebných živín (Hagedorn & Kunkel, 1979; Kunkel & Nordin, 1985; Izumi et al., 1994).

Predpokladá sa, že vitellogenín by mohol mať vplyv na reprodukčné správanie hmyzu. Hrobárik malý (*Nicrophorus vespilloides*) je chrobák patriaci do kategórie subsociálneho hmyzu, kde na rozdiel od eusociálneho hmyzu jedinci nežijú v kolóniách, ale rodičia sa starajú o svojich potomkov. Po narodení potomkov bola u oboch pohlaví tohto chrobáka zaznamenaná znížená expresia Vg. Tento jav by mohol súvisieť so skutočnosťou, že Vg sa podieľa na reprodukcii a v období rodičovskej starostlivosti tak klesá plodnosť dospelých jedincov (Roy-Zokan et al., 2015). Naopak u eusociálnej včely medonosnej je syntéza Vg krmíčiek, ktoré sa starajú o vyvíjajúci sa plod vyššia v porovnaní s lietavkami. Hladina Vg však v tomto prípade pravdepodobne súvisí s obsahom lipidov v potrave a v organizme – krmíčky majú viac lipidových zásob, a zároveň vyššiu expresiu Vg ako lietavky (Toth & Robinson, 2005; Harwood et al., 2017). Lipidové zásoby hrobárika malého počas starostlivosti o potomstvo klesajú, pretože v tomto období rodičia prijímajú oveľa menej potravy (Roy-Zokan et al., 2015).

Vzhľadom na dôležitú úlohu Vg v reprodukcii má tento proteín najvyššie zastúpenie v hemolymfe včelej matky. Počas kladenia vajíčok môže tvoriť okolo 55 % z celkového obsahu proteínov. V tomto období je jeho syntéza asi trikrát rýchlejšia ako syntéza iných proteínov (Hagedorn & Kunkel, 1979). Avšak aj u sterilných robotníc môže koncentrácia Vg dosahovať rovnako vysoké hodnoty, a to v prípade, ak kolónia matku stratí. Vtedy dochádza k aktivácii ovárií robotníc, ktoré môžu klásť vajíčka. Tieto vajíčka sú spravidla neoplozené a liahnu sa z nich iba trúdy. Za normálnych okolností je aktivita vaječníkov robotníc pozastavená vplyvom špecifických feromónov vylučovaných matkou (Piulachs et al., 2003; Amdam et al., 2006b; Harwood et al., 2017).

### **2.2.3 Vzťah vitellogenínu a včelích hormónov**

Medzi hormóny regulujúce transkripciu Vg hmyzu patria juvenilný hormón (JH), ekdysteroidné hormóny a neuropeptidy. Mechanizmus pôsobenia a prítomnosť jednotlivých hormónov sa líši v závislosti od druhu hmyzu (Tufail et al., 2014).

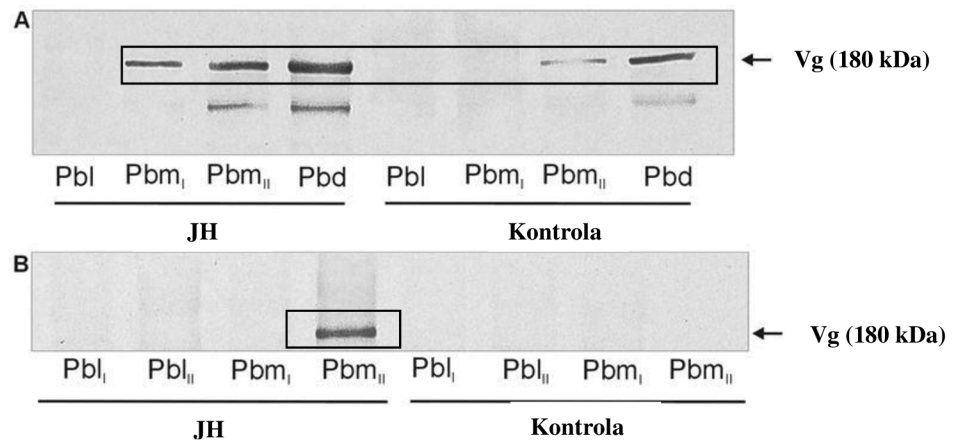
Najväčší vplyv na reguláciu hladiny vitellogenínu včely medonosnej má JH. Jedná sa o gonádotropný hormón produkovaný prostredníctvom žľazy *corpus allatum*, ktorý

sa podieľa na regulácii oogenézy, reprodukcie, dĺžky života a správania hmyzu (Amdam et al., 2006a).

Pri väčšine druhov hmyzu je hladina JH priamo úmerná hladine Vg. U včiel však toto pravidlo neplatí. Amdam & Omholt (2003) predstavili tzv. duálny represorový model, ktorého princíp spočíva v tom, že včelí Vg pôsobí ako inhibítor syntézy JH a naopak. Bolo dokázané, že umelé podanie JH alebo jeho analógu mladým včelám (kŕmičkám) spôsobilo, že sa z nich predčasne stali lietavky. Pri zvýšení koncentrácie JH teda dôjde k zastaveniu syntézy Vg. To spôsobuje vyčerpanie Vg zásob, čo predstavuje signál urýchľujúci vývoj a spúšťa začiatok hľadania potravy u robotníc (Amdam & Omholt, 2003). Rovnaký efekt, teda zvýšenie koncentrácie JH, vyvolalo zastavenie exprese Vg pomocou RNA interferencie (RNAi). RNAi predstavuje proces, pri ktorom molekula dvojvláknovej RNA (dsRNA) umelo vnesená do organizmu inhibuje tvorbu homológnych transkriptov z príbuzných génov (Guidugli et al., 2005b).

Prechod včely do štádia lietavky je sprevádzaný zmenou citlivosti chuťových receptorov. Vyššia koncentrácia JH v hemolymfe je pravdepodobne spojená so zlepšením zmyslového vnímania včiel a ich vnímaním chuti, čo má za následok zvýšenú chuťovú citlivosť na sacharózu. Tieto zmeny sú nevyhnutné pre zber nektáru (Amdam et al., 2006a). Pri vyššej hladine JH dochádza tiež k zvýšenej aktivácii metabolizmu sacharidov, ktorý prevláda u lietaviek, pričom organizmus kŕmičiek je závislý najmä na lipidoch a proteínoch. Doposiaľ nebolo objasnené, či Vg a JH ovplyvňujú hľadanie potravy priamo. Skôr sa predpokladá, že ide o nepriamy súvis v kombinácii s inými faktormi (Wang et al., 2012).

Zaujímavé výsledky získali vo svojej štúdií Barchuk et al. (2002), kde dokázali, že mierne zvýšená koncentrácia JH v rôznych štádiách kukly, včelej robotnice a matky má pozitívny vplyv na syntézu Vg (Obr. 3). Konkrétne je JH v tomto období vývoja včiel zodpovedný za reguláciu syntézy Vg na úrovni transkripcie. Aplikácia ekdyteroidného hormónu naopak spôsobila inhibíciu syntézy Vg v štádiu kukly (Barchuk et al., 2002).



Obr. 3: Detekcia Vg (180 kDa) pomocou Western blot analýzy v štádiu kukly včelej matky (A) a robotnice (B) pred a po injekčnom ošetrení lariev 10 µg JH rozpusteného v acetóne. Pre kontrolu bol použitý čistý acetón. Pbl, Pbm a Pbd: štádium hnedookej kukly s bledo, stredne tmavo a tmavo sfarbenou kutikulou. Pbm I a Pbm II predstavujú postupný vývoj Pbm fázy. Intenzita sfarbenia kutikuly a očí sa zvyšuje s narastajúcim vekom včelej kukly (prevzaté a upravené podľa Barchuk et al., 2002).

#### 2.2.4 Funkcie vitellogenínu v imunite

Imunita včiel je rozdelená na sociálnu a individuálnu imunitu. Sociálna imunita predstavuje ochranu voči patogénom prostredníctvom špecifického správania. Toto správanie zahŕňa napríklad odstraňovanie mŕtvych a chorých jedincov z úľa, čím včely predchádzajú šíreniu parazitov. Tak isto lietavky, ktoré umrú mimo úľa pri zbere potravy spadajú do sociálnej imunity, pretože sa tak znižuje množstvo parazitov prinesených do úľa. Individuálna imunita reprezentuje imunitný systém jedinca. Prvú ochranu pred patogénom poskytujú fyziologické bariéry, ako napr. exoskelet, kutikula, alebo stena tráviacej trubice (Evans & Spivak, 2010). Ak ich patogén prekoná, dochádza k aktivácii imunitnej odpovede. Tá je sprostredkovaná antimikrobiálnymi peptidmi, fagocytmi, enzýmami spôsobujúcimi degradáciu patogénov alebo rôznymi proteínmi, ktoré dokážu rozpoznať špecifické štruktúrne znaky baktérií nachádzajúce sa v ich bunkovej stene (Evans et al., 2006; DeGrandi-Hoffman & Chen, 2015). Medzi spomínané znaky patrí prítomnosť lipopolysacharidov u gram-negatívnych baktérií, peptidoglykánu u gram-negatívnych aj gram-pozitívnych baktérií, kyseliny lipoteichoovej u gram-pozitívnych baktérií a glukánu v bunkovej stene húb. Imunitnú odpoveď sprostredkujú aj elicitory prítomné v bunkových stenách baktérií a húb. Naviazaním patogénu na proteín dochádza k aktivácii imunitných buniek (Zhang et al., 2011; DeGrandi-Hoffman & Chen, 2015; Salmela et al., 2015).



Imunitné bunky hmyzu sa nazývajú hemocyty. Dokážu zneškodniť baktériu jej pohltením (fagocytóza), uzavretím do vaku (enkapsulácia) alebo obklopením (nodulácia) (Lavine & Strand, 2002). Koncentrácia hemocytov v hemolymfe včelích robotníc s vekom klesá (Schmid et al., 2008). Rovnako klesá koncentrácia Vg, čo pravdepodobne súvisí najmä so zvýšenou koncentráciou JH (Pinto et al., 2000). Úbytok hemocytov je tak priamo úmerný úbytku Vg. Vysvetlenie poskytuje fakt, že Vg je hlavným transportným proteínom pre zinok (Amdam et al., 2004). Zinok pôsobí ako katalyzačný, štruktúrny a regulačný ión antioxidantných procesov a jeho nedostatok spôsobuje apoptózu mnohých typov buniek, vrátane imunitných (Mocchegiani et al., 2000).

Znížená tvorba Vg u lietaviek má pravdepodobne význam v regulácii spotreby proteínov v kolónii. Keďže peľ je pomerne vzácnym zdrojom potravy, z hľadiska prežitia je jeho konzumácia obmedzená najmä na kŕmičky, ktoré nie sú vystavené riziku úhynu vo vonkajšom prostredí. Naopak lietavky, ktoré často opúšťajú úl, majú oveľa vyššiu úmrtnosť. Preto je peľ prenechaný mladším včelám. Tento mechanizmus pozitívne vplyva na reprodukciu včiel. Rovnako prispieva k prirodzenej selekcii včiel, kedy je pokles koncentrácie Vg u starších včiel priamo úmerný poklesu obranyschopnosti, čím dochádza k výmene starších a slabších jedincov za mladších a silnejších (Amdam & Omholt, 2002; Amdam et al., 2004; Amdam et al., 2005).

V štúdií od Li et al. (2009) bolo preukázané, že Vg môže mať baktericidné účinky. Autori štúdie použili Vg izolovaný z ryby druhu *Hexagrammos otakii* a skúmali, či dokáže spôsobiť lýzu bunkových stien alebo protoplastov baktérií *Escherichia coli* a *Staphylococcus aureus*. Na základe dosiahnutých výsledkov dokázali, že Vg spôsobil narušenie bunkovej steny *E. coli* aj *S. aureus*, ale ich protoplasty zostali nepoškodené. Ďalej zistili, že väzba Vg na bunkovú stenu *E. coli* cez lipopolysacharidy ako aj väzba na bunkovú stenu *S. aureus* prostredníctvom kyseliny lipoteiochoovej spôsobila smrť buniek, zatiaľ čo väzba Vg na bunkovú stenu *S. aureus* priamo cez peptidoglykán letálna nebola (Li et al., 2009). Vg môže po naviazaní na bunkovú stenu baktérií pôsobiť aj ako tzv. opsonín, čo je molekula uľahčujúca fagocytózu mikrobov sprostredkovanú makrofágmi (Li et al., 2008).

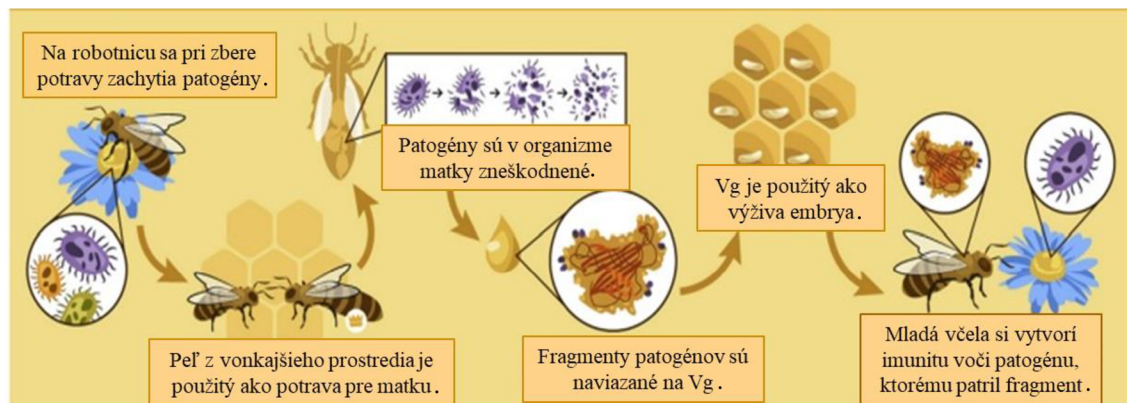
Havukainen et al. (2013) zistili, že včelí Vg vykazuje zvýšenú afinitu k mŕtvym a poškodeným bunkám. Poškodené bunky boli v pokuse demonštrované lipozómami obsahujúcimi fosfatidylserín a nepoškodené bunky lipozómami obsahujúcimi fosfatidylcholínom. Fosfatidylserín je záporne nabitý fosfolipid nachádzajúci sa najmä

na vnútornej strane bunkovej membrány. Prítomnosť fosfatidylserínu na vonkajšej strane membrány značí poškodenie bunky alebo jej apoptózu. Fosfatidylcholín má neutrálny náboj a bežne sa vyskytuje na vonkajšej membráne buniek (Schlegel & Williamson, 2001). Na základe výsledkov štúdie od Havukainen et al. (2013) má Vg vyššiu afinitu k fosfatidylserínu ako k fosfatidylcholínu. Väzba Vg na mŕtve a poškodené bunky by mohla byť spojená s antioxidantnými a protizápalovými funkciami včelieho Vg.

Hmyz nemá bunky imunitnej pamäte a protilátky, ktoré sú u stavovcov prenášané z matky na plod. Predpokladá sa, že informácie o patogénoch, ktoré následne pomáhajú budovať imunitnú odpoveď, sú do oocyty hmyzu prenášané z hemolymfy matky, čo potvrdzuje napríklad štúdia od Sadd et al. (2005), kedy injekčné vnesenie mŕtvej baktérie *Arthrobacter globiformis* do matky čmeľa zemného (*Bombus terrestris*) spôsobilo zvýšenú odolnosť lariev voči uvedenej baktérii. Podobný záver prezentovali Hernandez-Lopéz et al. (2014), kedy bola rovnakým spôsobom vpravená mŕtva baktéria *Paenibacillus larvae* do organizmu matky včely medonosnej, a následne bola pozorovaná vyššia odolnosť lariev voči patogénu.

V prírode sa matka dostáva do styku s patogénmi prostredníctvom príjmu potravy z vonkajšieho prostredia a v jej hemolymfe sú baktérie zneškodnené imunitnými bunkami. Vďaka schopnosti Vg viazať sa na membránu patogénov je predpokladané, že Vg sprostredkúva transport bakteriálnych fragmentov z hemolymfy matky do oocyty (Obr. 4). Salmela et al. (2015) potvrdili, že transport fragmentov *E. coli* bol do ovárií včelej matky realizovaný prostredníctvom Vg. Ďalej porovnávali väzbu Vg na gram-pozitívnu baktériu *P. larvae*, ktorá napáda a zabíja larvy včiel, s väzbou Vg na gram-negatívnu baktériu *E. coli*. Podľa záverov štúdie je možné predpokladať, že väzba včelieho Vg na gram-pozitívne baktérie je silnejšia, ako na gram-negatívne. Vzhľadom na vyššiu afinitu Vg ku gram-pozitívnej baktérii by sa mohlo jednať o adaptáciu na hlavné patogény napádajúce larvy včiel: *P. larvae* a *Melissococcus plutonius* (obe gram-pozitívne).

Na rozpoznávaní patogénu sa podieľa najmä 180 kDa proteín a 150 kDa fragment, ktorý vykazuje k bunkovej stene baktérie o niečo nižšiu afinitu. Za naviazanie patogénu je pravdepodobne zodpovedná  $\alpha$ -helikálna subdoména. Nachádza sa tu vysoká koncentrácia kladného náboja, vďaka ktorému priťahuje záporne nabitú bunkovú membránu (Havukainen et al., 2013; Salmela et al., 2015; Leipart et al., 2021).



Obr. 4: Teoretický model znázorňujúci predpokladaný priebeh, akým vitellogenín sprostredkúva imunitu mladých včiel. Robotnica sa pri zbere potravy dostáva do kontaktu s patogénmi, ktoré sú spolu s peľom a nektárom zachytené na povrchu jej tela a prinesené do úľa. Takýto peľ je použitý ako potrava pre matku. Patogény sú v jej organizme zneškodnené a fragmenty baktérií môžu byť naviazané na vitellogenín. Molekula vitellogenínu s naviazaným fragmentom je transportovaná do embrya, kde slúži ako výživa. Mladá včela sa týmto spôsobom bezpečne dostane do kontaktu so štruktúrnymi znakmi patogénu a pri neskoršom styku s týmto patogénom bude schopná rýchlejšie ho rozpoznať a zneškodniť (prevzaté a upravené podľa Harwood et al., 2017).

### 2.2.5 Rozdielne funkcie Vg medzi včelími kastami

Pre zástupcov vysoko eusociálneho hmyzu, kam patrí aj včela medonosná, je charakteristické členenie jedincov do kást. Spoločenstvo vždy pozostáva z matky, robotníc a trúdov, ktoré od seba odlišujú rôzne fyziologické, morfológické a behaviorálne znaky. Toto rozdelenie je výsledkom postembryonálneho vývoja, ktorý je ovplyvnený viacerými vonkajšími faktormi (Engels & Imperatriz-Fonseca, 1990).

Samičie včely sa liahnu z oplodnených (diploidných) vajíčok. O tom, či sa vyľahne robotnica alebo matka rozhoduje veľkosť bunky plástu, množstvo a zloženie potravy, ktorou je plod kŕmený a momentálna situácia v úli. Trúdy sa liahnu z neoplozených (haploidných) vajíčok. Vyvíjajúce sa jedince v bunke plástu sú umiestené v tekutine obsahujúcej všetky potrebné živiny. Táto gélová tekutina (včelia materská kašička) je produkovaná kŕmičkami, pričom larva matky je kŕmená iba včelou materskou kašičkou a larvám robotníc je podávaná jej zmes s medom a peľom. Vývoj matky trvá približne 18 dní, vývoj robotníc 21 dní a vývoj trúdov 24 dní (Jay, 1963; Haydak, 1970; Wang et al., 2015).

Vg zohráva zásadnú úlohu v regulácii sociálneho usporiadania hmyzu. Jeho vysoká koncentrácia potláča správanie súvisiace so zberom potravy a zároveň klesá s vekom

včelích robotníc. Vyššie koncentrácie Vg podmieňujú zber peľu mladšími včelami, zatiaľ čo staršie robotnice s nižšími hladinami Vg zbierajú nektár (Nelson et al., 2007).

Awde et al. (2020) vo svojej štúdií skúmali rozdiel hladiny Vg medzi robotnicami a matkou včely druhu *Lasioglossum laevissimum*. Potvrdili, že koncentrácia Vg súvisí s aktivitou vaječníkov a odráža príslušnosť ku kaste, schopnosť reprodukcie a pohlavie. Sociálne usporiadanie spoločenstva *L. laevissimum* je rovnaké ako u *A. mellifera*. Zo záverov štúdie vyplýva, že matka včiel z druhu *L. laevissimum* má vyššiu hladinu expresie Vg ako robotnice, čo pravdepodobne súvisí s funkciou Vg ako prekursora proteínov vo vaječnom žltku. Stupeň vývoja vaječníkov a hladina Vg tak priamo ovplyvňujú príslušnosť ku kaste.

Ako už bolo spomenuté, prítomnosť Vg nie je vždy viazaná iba na samičie pohlavie. Jeho syntéza bola dokázaná aj v tukových bunkách trúdov, kde sa však nachádza v oveľa nižších koncentráciách (Trenczek & Engels, 1986). Úlohou trúdov je poskytovať spermie matke. Liahnu sa najmä počas najteplejších mesiacov v roku, kedy sa včely častejšie roja a je potrebné, aby sa vyvíjalo viac matiek a robotníc. Dĺžka života dospelých trúdov sa väčšinou pohybuje medzi 20 až 40 dňami, avšak často dochádza k ich skoršiemu úhynu, pretože po párení sú z úľa vypudené (Page & Peng, 2001; Martin et al., 2019). Koncentrácia celkových proteínov rozpustených v hemolymfe trúdov dosahuje maximum v priebehu prvého týždňa po vyliahnutí a Vg z nich tvorí približne 5 %. Pre porovnanie, u matky obsah Vg v hemolymfe nikdy neklesá pod 40 % (Trenczek et al., 1989).

V hemolymfe matky sa Vg nachádza už krátko po vyliahnutí, kedy tvorí až 70 % celkových proteínov. Počas kladenia vajíčok koncentrácia klesá na približne 55 %, avšak opäť stúpa v zimnom období, kedy je reprodukcia pozastavená. U matky, ktorá práve nekladie vajíčka, rýchlosť syntézy aj napriek vysokej koncentracii Vg klesá na úroveň podobnú ostatným proteínom (Hagedorn & Kunkel, 1979).

Rozdiel medzi matkou a robotnicami spočíva okrem iného aj v obsahu Vg v hemolymfe počas rôznych vývojových štádií kukly pred dosiahnutím dospelosti. U matiek sa prvýkrát Vg vyskytuje približne 60 hodín pred dosiahnutím dospelosti v štádiu hnedookej kukly vykazujúcej stredný stupeň kutikulárnej pigmentácie. U robotníc bola prítomnosť Vg zaznamenaná asi 10 hodín pred dosiahnutím dospelosti v štádiu hnedookej kukly s tmavou kutikulou. Porovnanie na základe sfarbenia očí a kutikuly je relevantnejšie z toho dôvodu, že dĺžka vývoja matky a robotnice sa líši. Platí, že čím tmavšie má kutikula sfarbenie, tým je kukla staršia. Po dosiahnutí dospelosti je

koncentrácia Vg v hemolymfe matiek vyššia ako v hemolymfe robotníc (Barchuk et al., 2002).

### 2.2.6 Funkcie vitellogenínu v stresových odpovediach hmyzu

Medzi najčastejšie abiotické faktory spôsobujúce nadmerný stres organizmov patria zmeny teploty, ťažké kovy, či pesticídy. Tieto látky spôsobujú v organizme tvorbu reaktívnych kyslíkových radikálov, ktoré poškadzujú bunky a vyvolávajú oxidačný stres (Day et al., 1999; Liu et al., 2009; Yang et al., 2010). Po vystavení včely východnej (*Apis cerana cerana*) abiotickému stresu v podobe zníženej (4 °C) a zvýšenej (42 °C) teploty, ťažkého kovu (CdCl<sub>2</sub>) a herbicídu došlo vždy k zvýšenej expresii Vg, pričom sa, v závislosti na stresovom faktore, líšila miera zvýšenia a doba, po ktorej k zvýšeniu hladiny Vg došlo. Expresia bola sledovaná v mozgu, tukovom teliesku, svalovom tkanive, hemolymfe a strednom čreve. Najviac zaznamenaného Vg transkriptu bolo v tukovom teliesku a najmenej v mozgu. Najdlhšie trvajúca zvýšená miera expresie Vg nastala pri 4 °C. Pri podaní CdCl<sub>2</sub> došlo k náhlemu nárastu hladiny Vg po 9 hodinách, a potom koncentrácia opäť pomerne prudko klesla. Vyššia hladina Vg je spojená s ochranou proti poškodeniu buniek vplyvom oxidačného stresu (Zhang et al., 2017).

Olovo (Pb) je toxický ťažký kov, ktorý v živých organizmoch vyvoláva rôzne patologické zmeny. Jedná sa o látku u hmyzu spôsobujúcu narušenie endokrinných funkcií. V štúdií zaoberajúcej sa vplyvom olova na reprodukciu nočného motýľa z rodu blýskaviek (*Spodoptera litura*) bolo dokázané, že po vystavení lariev motýľa došlo k inhibícii syntézy Vg a k negatívnemu ovplyvneniu reprodukcie. Potenciálnym mechanizmom inhibičného účinku Pb na reprodukciu je poškodenie nervového systému hmyzu, čo následne narúša endokrinný systém a spôsobuje zníženú sekréciu hormónov ovplyvňujúcich syntézu Vg (Shu et al., 2009).

Na stresovej odpovedi včiel sa výrazne podieľajú aj homológne vg-like proteíny. Prítomnosť génov kódujúcich tieto proteíny je typickejšia pre sterilné robotnice ako pre matku čo naznačuje, že ich hlavnou úlohou na rozdiel od Vg nie je výživa embrya. V štúdií od Salmela et al. (2016) bola sledovaná expresia Vg a vg-like génov po vyvolaní oxidačného stresu. U jednej skupiny krmíčiek bol stres vyvolaný injekčne prostredníctvom herbicídu Parakvatu (N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid) a druhej skupine krmíčiek bol injekčne podaný včelí fyziologický roztok. Parakvat je pneumotoxická látka spôsobujúca produkciu a hromadenie superoxidových radikálov (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) v organizme (Day et al., 1999). Podanie fyziologického roztoku aj Parakvatu

zvýšilo mieru expresie *Vg* a *vg-like-A*. Expresia *vg-like-B* bola vyššia iba po injekcii Parakvatu. Hladina *vg-like-C* sa nezmenila ani v jednom prípade. Je teda pravdepodobné, že v stresových odpovediach včiel zohrávajú významnú úlohu *Vg* a *vg-like-A* proteíny, pretože ich zvýšenie bolo zaznamenané v prípade mierneho stresu vyvolaného podaním fyziologického roztoku, ako aj podaním pneumotoxického Parakvatu. Gén *vg-like-B* reagoval zvýšenou mierou expresie iba na podanie Parakvatu. Hypoteticky je tak možné predpokladať, že tento proteín má špecifickejšiu funkciu pri antioxidantných reakciách (Salmela et al., 2016).

V prípade, že je stres vyvolaný napríklad poranením alebo ochorením včely, dochádza k poklesu hladiny *Vg* v hemolymfe a k vzostupu koncentrácie JH, ktorý vyvoláva predčasné starnutie a vedie k úhynu včely (Amdam et al., 2012).

### **2.2.7 Funkcie vitellogenínu v dlhovekosti a antioxidantnej ochrane včiel**

Dĺžka života včely medonosnej sa mení v závislosti na vonkajších faktoroch. Matka sa dožíva najčastejšie 1 – 3 roky, avšak boli zaznamenané prípady, kedy sa dožila až 8 rokov. Sterilné robotnice sa vzhľadom na podmienky prostredia môžu dožívať niekoľkých týždňov až 1 roka (*diutinus*) a trúdy sa väčšinou nedožívajú viac, ako 5 týždňov (Page & Peng, 2001).

Podľa doterajších zistení je možné predpokladať, že na starnutí organizmu sa výrazne podieľa oxidatívny stres. Normálna metabolická aktivita organizmov vedie k nevyhnutnej produkcii reaktívnych kyslíkových radikálov (ROS), ktoré ak nie sú inaktivované prostredníctvom antioxidantov, vedú k poškodeniu nukleových kyselín, proteínov a lipidov. Toto poškodenie sa s postupom času znásobuje a prispieva k starnutiu (Harman, 1956; Beckman & Ames, 1998).

Makromolekuly najľahšie podliehajúce oxidácii sú polynenasýtené mastné kyseliny (PUFA). Obsah PUFA v súvislosti s dlhovekosťou bol študovaný najmä na cicavcoch, kde sa potvrdilo nižšie zastúpenie PUFA u dlhšie žijúcich jedincov (Pamplona et al., 1998). U včiel je táto spojitosť predpokladaná tiež. Lipidové dvojvrstvy včelej matky obsahujú oveľa vyššie zastúpenie mononenasýtených mastných kyselín (MUFA) a nižšie zastúpenie PUFA v porovnaní s robotnicami. Zaujímavé je, že v rannom vývojovom štádiu larvy majú všetky včelie kasty zastúpenie PUFA na membránach menej ako 2 %. Avšak, v neskoršom štádiu larvy už robotnice a trúdy vykazujú vyšší pomer PUFA/MUFA, pričom larve matky narastá pomer MUFA/PUFA. Tento fakt je

pravdepodobne spojený s tým, že larvy trúdov a robotníc prechádzajú v neskoršom štádiu na potravu s obsahom peľu, ale larva matky je počas celého vývinu kŕmená včelou materskou kašičkou. Peľ obsahuje až 88 % PUFA z celkového počtu mastných kyselín (Haydak, 1970; Haadad et al., 2007; Martin et al., 2019).

Ďalším dôležitým ukazovateľom oxidačného poškodenia v súvislosti so starnutím organizmu je hladina oxidačne modifikovaných proteínov. Proteíny môžu podliehať rôznym typom oxidácií, ako napríklad karbonylácii prostredníctvom oxidácie s ROS alebo nitrácii reakciou s RNS (Halliwell, 1995; Sohal, 2002).

Vg je ľahko oxidovateľný, vďaka čomu chráni pred oxidáciou ostatné molekuly. Bolo dokázané, že v hemolymfe včiel je Vg hlavným proteínom, ktorý podlieha oxidačnej karbonylácii. Porovnávaná bola miera oxidácie troch proteínov, ktoré sú v hemolymfe dospelých včiel zastúpené najviac: vitellogenínu, apolipoproteínu 1 a hexamerínu prostredníctvom. Vo výsledku bol Vg najviac oxidovaný z vybraných troch proteínov. Toto zistenie prispieva k domnienke, že Vg je pravdepodobne jedným z hlavných antioxidantných proteínov v hemolymfe včiel (Seehus et al., 2006a). Priamy súvis má jeho antioxidantná funkcia aj s dĺžkou života, keďže u lietaviek je koncentrácia Vg pomerne nízka ( $5-10 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ), v porovnaní so včelami *diutinus* ( $60-90 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) a kŕmičkami ( $20-50 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) (Amdam et al., 2004; Seehus et al., 2006b).

Havukainen et al. (2013) dokázali, že väzba Vg na membránu buniek priamo ochránila tieto bunky pred poškodením spôsobeným  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Je tak možné predpokladať, že Vg naviazaný na membránové fosfolipidy chráni bunky pred pôsobením ROS a nežiadúcou peroxidáciou lipidových dvojvrstiev.

Vplyv oxidačného stresu na aktivitu Vg génu včelích robotníc bol študovaný metódou RNAi. Oxidačný stres bol vyvolaný injekciou herbicídu Parakvatu. Včely, u ktorých došlo k zníženiu množstva Vg mRNA pomocou RNAi ( $vg^-$ ) mali po ošetrení Parakvatom oveľa vyššiu mieru úmrtnosti oproti včelám, kde nebola expresia Vg ovplyvnená ( $vg^+$ ) (Amdam et al., 2003b; Seehus et al., 2006a).

V súvislosti so starnutím včelích robotníc Seehus et al. (2006b) dospeli k zaujímavému zisteniu, že hladina karbonylovaných proteínov, a teda aj senescencia včiel viac súvisí s prechodom robotnice do štádia lietavky, než na vek. Vo všetkých ostatných vývojových štádiách bolo oxidačné poškodenie relatívne nízke, nezávisle na veku. To znamená, že 8-dňové kŕmičky a 200-dňové kŕmičky po prezimovaní aj 180-dňové včely *diutinus* vykazovali oveľa nižšie koncentrácie karbonylovaných proteínov v porovnaní s 20-dňovými lietavkami a 200-dňovými lietavkami po

prezimovaní, u ktorých bolo oxidačné poškodenie niekoľkonásobne vyššie. Označenie „včely po prezimovaní“ charakterizuje robotnice získané 2 týždne potom, čo kolónie zahájili chov potomstva a zber potravy po zimnom období (Seehuus et al., 2006b). Na rozdiel od toho sú včely *diutinus* charakteristicky prítomné iba keď sa v úli nevyskytuje plod (Maurizio & Hodges, 1950; Omholt & Amdam, 2004).

K pochopeniu mechanizmov starnutia včiel prispelo dôležité zistenie, že robotnice sú schopné takzvanej reverznej ontogenézy. To znamená, že lietavka sa dokáže vrátiť do štádia kŕmičky (teda do mladšieho fenotypu). Dôvodom je väčšinou znížené množstvo kŕmičiek v úli (napríklad vplyvom ochorenia, či napadnutia predátorom). Tieto robotnice potom opäť vykazujú zvýšenú koncentráciu Vg a funkčných hemocytov v hemolymfe. Rovnako u nich dochádza k zmene funkcie hypofaryngenálnych žliaz, ktoré prestávajú produkovať látky spojené s hľadaním potravy a opäť produkujú potravu pre vyvíjajúce sa potomstvo. K reverznej ontogenéze lietaviek do štádia *diutinus* dochádza najmä na jeseň, kedy je potrebné, aby tieto včely prečkali zimu a mohli tak na jar vychovať novú generáciu. Včely, ktoré podstúpia reverznú ontogenézu vykazujú tiež zvrátenie imunosenescencie, t.j. obnovenie imunity. Tento jav je podľa všetkého spôsobený poklesom koncentrácie JH (ktorý spôsobuje rozpad hemocytov) a nárastom koncentrácie Vg. S nástupom nepriaznivých podmienok (napr. ochladenie) do štádia *diutinus* prechádzajú tiež posledné včelie plody vyvíjajúce sa v danom období, pretože počas zimy matka vajíčka nekladie (Robinson et al., 1992; Amdam et al., 2005).

Predpokladá sa, že dĺžka života matky je spojená so životnosťou tukových buniek. Jedná sa o bunky, ktoré nie sú po dosiahnutí dospelosti včely schopné delenia. U robotníc dochádza k degradácii trofocytov rýchlejšie ako u matky (Hsieh & Hsu, 2011a; Hsieh & Hsu, 2011b). Syntéza Vg matky v oblasti zadočku, kde sa nachádza najviac tukových buniek, dosahuje vrchol na začiatku dospelosti. V oblasti hlavy a hrudníka je v tomto období Vg syntetizovaný iba v zanedbateľných množstvách. S pribúdajúcim vekom sa hladina Vg mRNA v oblasti zadočku znižuje, a naopak stúpa v oblasti hlavy a hrudníka. Počas celého života matky však prevažuje koncentrácia Vg mRNA v zadočku. Tento predpoklad prispieva k možnému vysvetleniu, prečo sa včelia matka dožíva vyššieho veku ako ostatné včely (Corona et al., 2007; Lu et al., 2018).



### 3 TESTOVANIE ANTIOXIDAČNÝCH VLASTNOSTÍ MOLEKÚL

#### 3.1 Oxidačné poškodenie makromolekúl

Látky spôsobujúce oxidačné poškodenie možno rozdeliť na reaktívne formy kyslíka a reaktívne formy dusíka. Medzi ROS patria voľné radikály (superoxid ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydroxylový radikál ( $HO^{\bullet}$ ), peroxy ( $ROO^{\bullet}$ ), alkoxy ( $RO^{\bullet}$ ), hydroperoxy ( $HO_2^{\bullet}$ )) a látky neradikálovej povahy (peroxid vodíka ( $H_2O_2$ ), kyselina chlórna ( $HOCl$ ), ozón ( $O_3$ ), singletový kyslík ( $^1O_2$ )). RNS sa delia rovnako na radikálové (oxid dusnatý ( $NO^{\bullet}$ ), oxid dusičitý ( $NO_2^{\bullet}$ )) a neradikálové zlúčeniny (nitrosyl ( $NO^+$ ), nitroxid ( $NO$ ), kyselina dusitá ( $HNO_3$ ), oxid dusitý ( $N_2O_3$ ), oxid dusičitý ( $N_2O_4$ ), nitronium ( $NO_2^+$ ), peroxyinitrit ( $ONOO$ ), alkylperoxyinitrit ( $ROONO$ )) (Štípek, 2000).

Aby sa v organizme predišlo nadmernému poškodeniu makromolekúl vplyvom ROS a RNS, je veľmi dôležitý pomer medzi týmito molekulami a antioxidantmi. Jedna z najčastejších definícií hovorí o antioxidante ako o látke, ktorá ak sa nachádza v organizme v nižšej koncentrácii ako oxidovateľný substrát, značne spomaľuje alebo zabráňuje oxidácii tohto substrátu. Antioxidačné vlastnosti majú najčastejšie proteíny (napr. bilirubín), enzýmy (napr. superoxid:superoxid oxidoreduktasa (superoxidismutasa, EC 1.15.1.1)), vitamíny (napr. vitamín E), organické kyseliny (napr. kyselina močová), farbivá (napr.  $\beta$ -karotén) a pod. (Halliwell, 1995).

Antioxidanty je možné podľa funkcie deliť na molekuly, ktoré bránia nadmernej tvorbe ROS a RNS (napr. reguláciou aktivity enzýmov tvoriacich tieto reaktívne zlúčeniny (napr. L-arginin, NADPH:kyslík oxidoreduktasa ( $NO^{\bullet}$  synthasa, EC 1.14.13.39)) alebo vychytávaním  $Fe^{2+}$  a  $Cu^+$  – katalyzátorov pri tzv. Fentonovej reakcii (vznik  $HO^{\bullet}$  z  $H_2O_2$ )) a na molekuly schopné vychytávať a odstraňovať radikály, ktoré sa už vytvorili. Iná možnosť predstavuje delenie antioxidantov na antioxidačné enzýmy a na látky vytvárajúce s ROS a RNS stálejšie, menej toxické produkty (Štípek, 2000).

Polynenasýtené mastné kyseliny vykazujú spomedzi makromolekúl najvyššiu senzitivitu k poškodeniu spôsobenému ROS, pričom poškodenie sa zvyšuje priamo úmerne počtu dvojitych väzieb v molekule (Bielski et al., 1983). PUFA obsahujú tzv. *bis*-allylové atómy uhlíka (nachádzajú sa medzi uhlíkovými atómami spojenými s ďalším reťazcom dvojitou väzbou), ktoré primárne podliehajú oxidačným reakciám (Cosgrove et al., 1987). Oxidácia PUFA vedie k tvorbe hydroperoxidov a cyklických peroxidov mastných kyselín, ktoré sú pomerne stále, avšak reagujú podobne ako  $H_2O_2$

s  $\text{Cu}^+$  a  $\text{Fe}^{2+}$  za vzniku reaktívnych foriem týchto zlúčenín. Hydroperoxydy a cyklické peroxydy sa môžu štiepiť na intermediáty, ako napríklad ethan, pentan, 4-hydroxynonenal, alebo malonylaldehyd. Tie potom reagujú s proteínmi za vzniku stabilných konečných produktov. Modifikované proteíny strácajú funkciu, čím dochádza k narušeniu dôležitých metabolických dejov v organizme (Štípek, 2000).

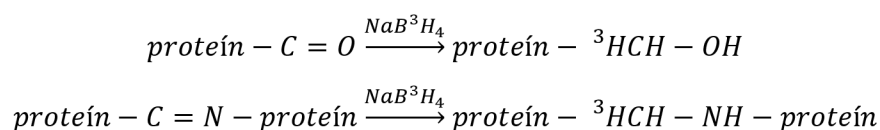
Proteíny s ROS a RNS reagujú prostredníctvom niektorých aminokyselinových zvyškov. Napríklad methionín je vplyvom ROS oxidovaný na sulfoxid, cysteín na sulfonát a tryptofán na kynureín (3-anthraniloylalanin). Modifikované proteíny strácajú svoju enzýmovú, transportnú alebo signálnu funkciu. Niektoré aminokyseliny môžu podliehať hydroxylácii s  $\text{HO}^\bullet$  alebo nitrácii s ONOO, ktorý reaguje najmä s tyrosinom za vzniku stáleho produktu nitrotyrosínu. Častou modifikáciou je karbonylácia, kedy dochádza k vzniku karbonylových derivátov. Príčinou je oxidácia aminoskupín postranných reťazcov (väčšinou založená na princípe Fentonovej reakcie), oxidačné štiepenie proteínov alebo konjugácia s aldehydmi vznikajúcimi oxidáciou PUFA. Stupeň karbonylácie proteínov je možné experimentálne stanoviť a často sa používa ako ukazovateľ oxidačného poškodenia organizmu (Štípek, 2000; Møller et al., 2011).

Oxidačné poškodenie DNA je spôsobené najmä  $\text{HO}^\bullet$ , ktorý reaguje s deoxyribosou za vzniku malondialdehydu a modifikuje či uvoľňuje purínové a pyrimidínové bázy. Následkom týchto reakcií dochádza k narušeniu polynukleotidového reťazca, k tvorbe krížových väzieb DNA s proteínmi a k chybnému párovaniu báz pri replikácii. Zmeny DNA vyvolané ROS v konečnom dôsledku spôsobujú mutácie, karcinogézu, apoptózu a starnutie (Štípek, 2000).

## 3.2 Meranie antioxidačných vlastností proteínov

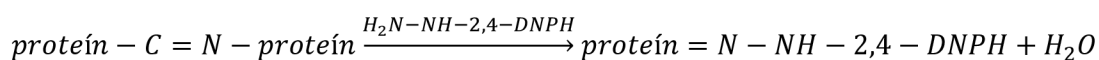
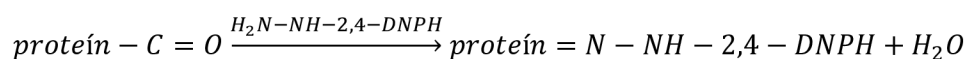
### 3.2.1 Detekcia karbonylovaných proteínov

Tetrahydridoboritan sodný ( $\text{NaBH}_4$ ) je redukčné činidlo, ktoré redukuje všetky karbonylové skupiny (t.j. aldehydy, ketóny a ketokyseliny) na alkoholy a Schiffove bázy na amíny. Metóda je veľmi citlivá a možno ju použiť aj v prípade nízkeho obsahu proteínov vo vzorke. Pre stanovenie sa využíva zlúčenina značená rádioaktívne trícium ( $\text{NaB}^3\text{H}_4$ ) (Levine et al., 1990). Reakcie vystihujú nasledovné reakčné schémy:



Detekciu trícia v modifikovaných proteínoch je možné previesť pomocou kvapalinovej scintilačnej spektrometrie (Levine et al., 1990). Jedná sa o analytickú metódu určenú pre meranie  $\beta$  žiarenia v roztoku. Kvapalným scintilátor je látka, ktorá pri interakcii s ionizujúcim žiarením prevádza časť absorbovanej energie na svetelné záblesky (scintilácie). Najčastejšie sú využívané cyklické uhľovodíky v organických rozpúšťadlách. Vzniknuté scintilácie sú zachytené fotonásobičmi a prevedené na elektrické impulzy. Počet impulzov je priamo úmerný počtu rádioaktívne značených častíc v roztoku (Astro Nukl Fyzika, 26.3.2022).

Metóda založená na podobnom princípe, ale bez použitia rádioaktívneho značenia predstavuje derivatizáciu karbonylovaných proteínov pomocou 2,4-dinitrofenylhydrazínu (2,4-DNPH). Princípom je reakcia, kedy karbonylovaný proteín alebo Schiffova báza reaguje s 2,4-dinitrofenylhydrazínom za vzniku farebného produktu 2,4-dinitrofenylhydrazónu, ktorý absorbuje svetlo pri vlnovej dĺžke 360-390 nm (Levine et al., 1990). Reakcie vystihujú nasledovné reakčné schémy:



Okrem spektrofotometrického stanovenia možno karbonylované proteíny detegovať aj pomocou metódy Western blot. V tomto prípade je potrebné najskôr proteíny rozdeliť podľa molekulovej hmotnosti prostredníctvom SDS-PAGE. Následne prebieha transport na membránu z nitrocellulosity alebo polyvinylidénfluoridu (PVDF) a stanovenie proteínov inkubáciou so špecifickými anti-DNP protilátkami (Nakamura et al., 1999) Pre spoľahlivý výsledok by mala vzorka obsahovať viac ako  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  proteínov (Levine et al., 1990).

Pre detekciu karbonylovaných proteínov sa ďalej môže využiť napr. fluorescein-5-thiosemikarbazid alebo fluorescein amín s kyanoborohydridom sodným, pričom stanovenie prebieha na rovnakom princípe ako v popísaných príkladoch (Levine et al., 1990).

### 3.2.2 Detekcia modifikácií tyrosínu

Jednou z foriem oxidačného poškodenia aromatickej aminokyseliny tyrosín je tvorba dityrosínu. Ionizovaná forma dityrosínu, v ktorej je jedna z fenolových hydroxylových skupín disociovaná, emituje fluorescenčné žiarenie s maximálnou vlnovou dĺžkou

približne pri 400 nm. Dityrosin je možné detegovať aj pomocou afinitnej chromatografie na imobilizovanom fenyloboritanе alebo pomocou dvojdimenzionálnej chromatografie (Malencik & Anderson, 2003).

Oxidačnou modifikáciou tyrosinu vplyvom RNS (najmä ONOO) je vznik nitrotyrosinu (Ntyr). Nitrotyrosin je možné stanoviť spektrofotometricky. Pri pH < 3 je roztok bezfarebný a najviac absorbuje pri 365 nm, pri pH > 9 je roztok žltý a absorpčné maximum je v oblasti 428 nm (Yan, 2009). Nitrotyrosin je tiež možné detegovať pomocou metódy Western blot s využitím špecifických anti-Ntyr protilátok (Seehus et al., 2006b).

### **3.2.3 Detekcia thiolových skupín značených [<sup>14</sup>C] iódacetamidom**

Thiolové skupiny (najmä cysteinové reziduá) sú vďaka vysokej reaktivite veľmi náchylné na oxidačné poškodenie. Iódacetamid pôsobí ako alkylačné činidlo, ktoré reaguje s nukleofilnými thiolovými skupinami za vzniku stabilného produktu. Označené sú teda neoxidované -SH skupiny. Čím je signál slabší, tým masívnejšie poškodenie je prítomné. Rádioaktívne značené produkty je možné analyzovať pomocou hmotnostnej spektrometrie alebo gélovej elektroforézy. Výhodou použitia iódacetamidu je, že nevytvára karboxylové skupiny a proteín tak nezískava ďalší záporný náboj (McKenzie et al., 1996; Sethuraman et al., 2004).

## **3.3 Stanovenie antioxidantnej aktivity ostatných molekúl**

### **3.3.1 Stanovenie celkovej antioxidantnej aktivity metódou TEAC**

Stanovenie celkovej antioxidantnej aktivity je založené na schopnosti vzorky alebo reakčnej zmesi zhasť kationový radikál ABTS<sup>•+</sup> (2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)). Zhasenie ABTS<sup>•+</sup> radikálu antioxidantmi je merané spektrofotometricky na základe zmien absorpčného spektra ABTS<sup>•+</sup> najčastejšie pri 734 nm. Kationový radikál ABTS<sup>•+</sup> v roztoku vzniká oxidáciou ABTS napr. pomocou zmesi methemoglobin/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Označenie TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) sa používa z toho dôvodu, že meraná antioxidantná kapacita vzorky je udávaná v ekvivalentoch definovaného množstva štandardu Troloxu (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-karboxylová kyselina, syntetický analóg vitamínu E). TEAC je definovaná ako milimolárna koncentrácia roztoku Troloxu s antioxidantnou kapacitou

ekvivalentnou  $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  roztoku skúmanej látky (Miller et al., 1993; Rice-evans et al., 1995).

### 3.3.2 Reakcia s difenylpikrylhydrazylom

1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl (DPPH) je pomerne stabilná radikálová zlúčenina s nespárovaným elektrónom vo valenčnej sfére jedného z dusíkových atómov. Metóda sa považuje za jednu zo základných pre posúdenie antioxidačnej aktivity čistých látok alebo zmesí. Princípom stanovenia je reakcia testovanej látky alebo reakčnej zmesi s DPPH, kedy dochádza k redukcii radikálu za vzniku difenylpikrylhydrazínu (DPPH-H) (Blois, 1958). Následne je meraný pokles absorbancie pri 517 nm po uplynutí konštantného času (Yokozawa et al., 1998) alebo je reakcia meraná kineticky (Espín et al., 2000). Radikálová aktivita zmesí môže byť vyjadrená po prepočte v jednotkách štandardu Troloxu alebo ekvivalentoch kyseliny askorbovej (du Toit et al., 2001).

### 3.3.3 Metóda ORAC

ORAC (oxygen radical absorbance capacity) je metóda, pri ktorej sú vo vzorke generované kyslíkové radikály  $\text{ROO}^{\bullet}$  pomocou AAPH (2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid) a  $\text{HO}^{\bullet}$  prostredníctvom reakcie  $\text{H}_2\text{O}_2$  s  $\text{Cu}^+$ . Sledovaný je úbytok fluorescencie  $\beta$ -fykoerytrínu po reakcii s radikálom. Následne sa hodnotí schopnosť testovanej látky spomaliť, resp. zastaviť radikálovú reakciu a čas, za ktorý k antioxidačnej reakcii došlo. Využíva sa porovnanie plochy pod krivkou fluorescenčného signálu, pričom plocha vzorky obsahujúcej antioxidanty je vyššia, ako plocha blanku. Kvôli presnejšiemu stanoveniu sú krivky vzoriek porovnávané s krivkami štandardu (Trolox). Táto metóda má široké uplatnenie a poskytuje informácie o antioxidačnej kapacite vzoriek rôzneho typu (Cao et al., 1993; Cao et al., 1996).

### 3.3.4 Metóda FRAP

Základným princípom metódy FRAP (ferric reducing antioxidant power) je redukcia komplexu tripyridyltriazínu železitého ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ) na sýto modrý železnatý komplex ( $\text{Fe}^{2+}$ -TPTZ) antioxidantom v kyslom prostredí. Antioxidant pôsobí ako donor elektrónov (redukovadlo) a  $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ ako akceptor elektrónov (oxidovadlo). Antioxidačná aktivita (ekvivalentná redoxnej kapacite) je zaznamenaná ako nárast absorbancie pri 593 nm (Benzie & Strain, 1999). Metóda však má svoje nevýhody, ako napríklad to,

že nedochádza k zachyteniu pomaly reagujúcich polyfenolických látok a thiolov a vznikajúci  $\text{Fe}^{2+}$  je jedným z reaktantov Fentonovej reakcie. Je teda možné tvrdiť, že meranie odráža iba schopnosť látok redukovať  $\text{Fe}^{3+}$  na  $\text{Fe}^{2+}$ , čo s celkovou antioxidačnou aktivitou vzorky nemusí súhlasiť (Ou et al., 2002).

V súčasnosti sa ako oxidovadlo využíva tiež hexakyanoželezitan draselný v prítomnosti  $\text{Fe}^{3+}$ , pričom produktom reakcie je hexakyanoželeznatan železitý (Pruská modrá). Táto modifikácia spolu s prídavkom SDS a optimalizáciou pH umožňuje detekciu širšieho spektra antioxidantov (Işıl Berker et al., 2010).

## 4 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Akrylamid (AA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Bisakrylamid (BIS) (MP Biomedicals, USA)
- Bromfenolová modrá (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) (Bio-Rad, USA)
- Dimethylformamid (DMF) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Dinitrofenylhydrazín (DNPH) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Dithiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Ethanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Glycín (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Hovädzí sérový albumín (BSA) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Chlorid horečnatý (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Kit pre chemiluminiscenčnú detekciu fenol-donorovej:peroxid vodíka oxidasy (chrenová peroxidasa, EC 1.11.1.7) Light Polaris (Serva, Nemecko)
- Kozia anti-kráľčia IgG protilátka s naviazanou fosfatasou-monoester fosfohydrolasou (alkalická fosfatasa (ALP), EC 3.1.3.1) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Kozia anti-kráľčia IgG protilátka s naviazanou chrenovou peroxidasou (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Kozia anti-myšia IgG protilátka s naviazanou chrenovou peroxidasou (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Kyselina fosforečná (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-ner, Česká republika)
- Kyselina octová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Marker molekulovej hmotnosti (SigmaMarker™ wide range 6500-200 000 Da) (Sigma-Aldrich, Nemecko)

- Methanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Monoklonálna myšia IgE protilátka proti dinitrofenylu s naviazanou alkalickou fosfatasou (anti-DNP) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Monoklonálna myšia IgG protilátka proti nitrotyrosínu (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA)
- *n*-butanol (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Nitrotetrazoliová modrá (NBT) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- N,N'-tetramethylendiamin (TEMED) (Carl Roth, Nemecko)
- Peroxid vodíka (Lach-Ner, Česká republika)
- Persíran amónny (APS) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Ponceau S (Merck, Nemecko)
- Polyklonálna králičia protilátka proti vitellogenínu (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- SAVO (Unilever, Spojené kráľovstvo)
- Sušené nízkotučné mlieko (Carl Roth, Nemecko)
- Tetranitromethan (TNM) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (MP Biomedicals, Francúzsko)
- Tween-20 (Carl Roth, Nemecko)

#### 4.1.2 Roztoky

- 10% (w/v) SDS
- 10% persíran amónny
- akrylamid-N,N'-methylbisakrylamid: 30 % (w/v) akrylamidu, 0,8 % bisakrylamidu (w/v) vo vode
- CBB farbiaci roztok: 0,1 % (w/v) CBB G-250 v 15% (v/v) kys. octovej a 45% methanole
- CBB odfarbovací roztok: 40% (v/v) methanol, 10% (v/v) kys. octová
- farbiaci roztok Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S v 10% (v/v) kys. octovej
- pufoer blotovací: 0,048 mol·l<sup>-1</sup> Tris, 0,039 mol·l<sup>-1</sup> glycín, 20 % (v/v) methanol (pH 8,3)
- pufoer do deliaceho gélu: 1,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 8,8)
- pufoer do zaostrovacieho gélu: 0,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 6,8)



- pufoer elektródový: 0,025 mol·l<sup>-1</sup> Tris, 0,192 mol·l<sup>-1</sup> glycín, 0,1% (w/v) SDS (pH 8,3)
- pufoer pre detekciu alkalickéj fosfatasy: 100 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl, 50 mmol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 100 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 9,5)
- pufoer Tris pre prípravu nitrovaných proteínov: 50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris (M<sub>r</sub> = 121,1) (pH 8,8)
- roztok BCIP: 5% BCIP v 100% DMF
- roztok NBT: 10% NBT v 70% DMF
- TBS pracovný pufoer pre imunodetekciu (5x TBS): 100 mmol·l<sup>-1</sup> Tris, 2,5 mmol·l<sup>-1</sup>, NaCl (pH 7,5)
- Tween v TBS (TBS-T): 0,15 ml Tween-20 a 300 ml 1x TBS
- vodou nasýtený *n*-butanol
- vzorkovací pufoer (2x Laemmli): 0,125 mol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl, 4% (w/v) SDS, 20% glycerol, 0,2 mol·l<sup>-1</sup> DTT, 0,02% (w/v) bromfenolová modrá (pH 6,8)
- zásobný roztok Coomassie Blue (50 mg Coomassie Blue G-250 rozpustiť v 25 ml ethanolu a 50 ml 85% kys. fosforečnej, doplniť ddH<sub>2</sub>O do 100 ml)
- zásobný roztok DTT: 20 mmol·l<sup>-1</sup> DTT v ddH<sub>2</sub>O
- zásobný roztok DNPH: 10 mmol·l<sup>-1</sup> DNPH v 2 M HCl

### 4.1.3 Biologický materiál

Hemolymfa včely medonosnej odobraná v septembri 2019 z dospelých robotníč, ktoré boli chované v pokusnom včelíne Výzkumného ústavu včelářského na Kývalce. Vzorka hemolymfy bola po odstřižení zadočku získaná z hrudnej časti včiel a pre uchovanie zamrazená do ďalšieho použitia.

### 4.1.4 Prístroje a pomôcky

- Analytické váhy Denver Summit (Denver Instrument, USA)
- Aparatúra pre Tank blot (Bio-Rad, USA)
- Aparatúra pre SDS-PAGE (Bio-Rad, USA)
- Automatické pipety (Eppendorf, Nemecko)
- Blotovacie zariadenie Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA)
- Blotovacia membrána nitrocellulosová Amersham Hybond-ECL, priemer pórov 0,2 μm (GE Healthcare, USA)

- Blotovacia membrána PVDF Immobilon-FL, priemer pórov 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation, USA)
- Blotovací papier ALBET (ScienceLab, USA)
- Centrifuga 5418 R (Eppendorf, Nemecko)
- Chemiluminiscenčný skener C-Digit (Li-Cor, USA)
- Inkubátor Dry Bath (Major Science, USA)
- Magnetická miešačka Big Squid (IKA, Nemecko)
- Mikrodoštička TPP, 96 jamiek (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Mikrodoštičkový spektrofotometer PowerWave XS (BioTek Instruments, USA)
- Mikroskúmvky (Eppendorf, Nemecko)
- Podložka pre zobrazenie gélov White Tray (Bio-Rad, USA)
- Predvážky (Ranwag, Česká republika)
- Trepačka Bio Shaker 3D (BioSan, Lotyšsko)
- Vortex V-1 plus (BioSan, Lotyšsko)
- Zdroj elektrického napätia PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)
- Zobrazovacie zariadenie pre gély Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)

## 4.2 Metódy

### 4.2.1 Stanovenie proteínov v hemolymfe Bradfordovou metódou

V prvom kroku boli pripravené pracovné roztoky Bradfordovho činidla a BSA. Pre roztok Bradfordovho činidla bol nariadený zásobný roztok Coomassie Blue pomocou ddH<sub>2</sub>O v pomere 1:4. Zásobný roztok BSA o koncentrácii 2 mg·ml<sup>-1</sup> bol pripravený rozpustením 2 mg BSA v 1 ml ddH<sub>2</sub>O. Z tohto roztoku boli pripravené štandardy kalibračnej rady BSA o koncentráciách 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750 a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Do jamiek v 96-jamkovej mikrotitračnej doštičke bolo postupne napipetovaných 45  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 5  $\mu\text{l}$  štandardu alebo 20x nariadenej vzorky hemolymfy a 200  $\mu\text{l}$  pracovného roztoku Bradfordovho činidla. Jednotlivé štandardy a vzorka boli pipetované po riadkoch v triplikáte. Ako blank bolo použitých 50  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O a 200  $\mu\text{l}$  pracovného roztoku Bradfordovho činidla.

Pred vlastným meraním bola doštička prikrytá viečkom, jemne pretrepaná a ponechaná 10 min inkubovať kvôli vývinu sfarbenia. Absorbancia bola zmeraná na spektrofotometri PowerWave XS pri vlnovej dĺžke 590 a 450 nm. Dáta boli zobrazené v programe Gen5 3.06 (Biotek). Následne bola koncentrácia proteínov vyhodnotená na

základe kalibračnej priamky závislosti pomeru absorbiancií 590/450 nm na koncentrácii proteínov. Rovnakým spôsobom bola zmeraná koncentrácia proteínov v 50x nariadenej vzorke hemolymfy.

#### **4.2.2 Príprava nitrovanej hemolymfy a BSA**

Nitrovaný BSA (použitý ako pozitívna kontrola nitrácie) bol pripravený rozpustením 100 mg BSA v 10 ml 50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris pufru (pH 8,8). K roztoku bolo pridaných 10 µl tetranitromethanu, čo odpovedá 50-násobnému molárnemu nadbytku činidla. Nitrovaná hemolymfa bola pripravená zmiešaním 10 µl hemolymfy a 1 µl tetranitromethanu. Takto pripravené vzorky boli inkubované cez noc pri 4 °C a pre uchovanie a ďalšiu potrebu zamrazené.

#### **4.2.3 Príprava oxidovanej hemolymfy a modifikácia s DNPH**

Oxidácia hemolymfy prebiehala pomocou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alebo roztoku SAVA (5% chlórnan sodný). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bol pridaný tak, aby jeho celková koncentrácia vo vzorke bola 10 mmol·l<sup>-1</sup> (na 15 µl vzorky bolo zmiešaných 0,15 µl 1 mol·l<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 14,85 µl 10x riedenej hemolymfy). Koncentrácia SAVA vo výslednej vzorke bola 1 % (na 15 µl vzorky boli zmiešané 3 µl 5% SAVA a 12 µl 10x riedenej hemolymfy). Ako negatívna kontrola bola použitá vzorka s prídavkom 10 mmol·l<sup>-1</sup> denaturačného činidla (DTT) (na 15 µl vzorky bolo zmiešaných 7,5 µl 20 mmol·l<sup>-1</sup> roztoku DTT a 7,5 µl 10x riedenej hemolymfy). Vzorky boli s činidlami inkubované 30 min pri laboratórnej teplote. Po inkubácii bol ku každej oxidovanej vzorke a tiež k 15 µl neoxidovanej vzorky hemolymfy pridaný dvojnásobok 10 mmol·l<sup>-1</sup> roztoku DNPH (30 µl) a vzorky boli opäť ponechané inkubovať pri 25 °C 10 min.

#### **4.2.4 SDS-PAGE**

##### **4.2.4.1 Elektroforéza nemodifikovanej hemolymfy**

Vzorka bola pripravená zmiešaním 100 µl 10x nariadenej včelej hemolymfy (10 µl hemolymfy a 90 µl ddH<sub>2</sub>O) a 100 µl 2x vzorkovacieho pufru podľa Laemmliho. Po premiešaní na vortexe bola vzorka zahrievaná na 70 °C po dobu 15 min v inkubátore. Následne bola vzorka ochladená na ľade a centrifugovaná 5 min pri 15 000 g a 4 °C.

Pre elektroforézu boli najprv pripravené roztoky na deliaci a zaostrovací gél napipetovaním jednotlivých komponentov okrem APS do príslušných kadičiek podľa nasledujúcej tabuľky (Tab. 1):

Tab. 1: Zloženie deliaceho a zaostrovacieho gélu. Objemy sú uvedené v ml.

Typ gélu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris HCl (1,5 mol·l <sup>-1</sup> , pH 8,8)	Tris HCl (0,5 mol·l <sup>-1</sup> , pH 6,8)	ddH <sub>2</sub> O	SDS	TEMED	APS (štart)
Deliaci 7%	2,3	2,5	-	5,1	0,1	0,01	0,07
Zaostrovací 4%	1,3	-	2,5	5,9	0,2	0,02	0,12

Ako prvý bol nanosený deliaci gél. Po premiešaní komponentov pre deliaci gél a pridaní čerstvo pripraveného roztoku APS bola zahájená polymerizačná reakcia, preto bol roztok okamžite aplikovaný pomocou Pasteurovej pipety medzi sklíčka elektroforetickej aparatúry (cca 1 cm od zubov hrebienka). Na povrch gélu bola nanosená tenká vrstva vodou nasýteného *n*-butanolu. Po stuhnutí deliaceho gélu (cca 30 min) bol *n*-butanol odstránený, priestor medzi sklami bol premytý ddH<sub>2</sub>O a vysušený filtračným papierom. Rovnakým spôsobom bol pripravený zaostrovací gél, ktorý bol nanosený na stuhnutý deliaci gél. Do gélu bol ihneď opatrne vložený 10-jamkový hrebienok a gél bol ponechaný tuhnúť cca 30 min. Takto boli pripravené celkom dva gély. Po stuhnutí boli pripravené sklá s gélom vložené do elektroforetickej komôrky. Pomocou fixky boli na vonkajšej strane hrubých skiel vyznačené zuby hrebienka. Hrebienok bol opatrne vytiahnutý a do elektroforetickej komôrky bol naliaty elektródový pufor tak, aby pretiekol do jamiek gélu. Do jamiek boli tenkou špičkou aplikované vzorky nasledovne: jamky č. 2 a 9 obsahovali 1 µl proteínového markeru, v jamkách č. 3 – 8 sa nachádzala pripravená vzorka v postupnosti 5 µl, 10 µl, 15 µl, 5 µl, 10 µl, 15 µl. Aparatúra bola umiestnená do chladničky a napojená na zdroj elektrického napätia. Elektroforéza prebiehala najprv pri konštantnom napätí 100 V a po zaostrení bolo napätie zvýšené na 200 V, kým zóna bromfenolovej modrej nevystúpila z gélu.

Po ukončení elektroforézy bola aparatúra odpojená od zdroja napätia, pufor bol odstránený a gély boli pomocou plastovej špachtle oddelené od skiel. Každý gél bol rozdelený na polovicu. Pre lepšiu orientáciu bola z gélov odkrojená časť pravého dolného rohu. Zaostrovací gél bol odstránený do odpadu. Jedna polovica deliaceho gélu bola farbená roztokom CBB v plastovej krabicičke na trepačke cez noc. Následne bol tento gél 4x po 20 min premytý pomocou odfarbovacieho roztoku. Gél po odfarbení bol vyfotený pomocou prístroja Gel Doc EZ Imager a spracovaný v programe Image Lab. Zvyšné tri polovice gélu boli ihneď použité na analýzu metódou Western blot.

#### **4.2.4.2 Elektroforéza nitrovaných proteínov**

Obe pripravené vzorky (nitrované BSA aj nitrovaná hemolymfa) boli nariedené 10x (10 µl vzorky a 90 µl 50 mmol·l<sup>-1</sup> Tris pufru). Pre kontrolu bola pripravená aj vzorka nemodifikovanej hemolymfy, ktorá bola 10x zriedená ddH<sub>2</sub>O. Ku každej vzorke bolo pridaných 100 µl 2x vzorkovacieho pufru podľa Laemmliho. Po premiešaní na vortexe

boli roztoky zahrievané na 70 °C po dobu 15 min v inkubátore. Následne boli ochladené na ľade a centrifugované 5 min pri 15 000 g a 4 °C.

Príprava gélov prebiehala rovnako, ako v predchádzajúcom prípade (pripravený bol 7% deliaci gél a 4% zaostrovací gél). Na polovicu gélu (od jamky číslo 2 po jamku číslo 5) boli nanesené vzorky nitrovanej hemolymfy a nitrovaného BSA, vždy vedľa seba v duplikátoch (5 µl a 10 µl). Do jamiek od čísla 6 po 9 boli rovnako v duplikátoch (5 µl a 10 µl) vedľa seba nanesené vzorky nitrovanej a nenitrovanej hemolymfy. Takýmto spôsobom boli vzorky aplikované na 2 gély. Podmienky pre elektroforézu boli totožné s prvou elektroforézou (konštantné napätie 100 V do zaostrenia, po zaostrení napätie zvýšené na 200 V). Po skončení elektroforézy bol jeden gél použitý pre Western blot analýzu a druhý farbený roztokom CBB cez noc na trepačke v plastovej krabičke. Odfarbenie prebiehalo odfarbovacím roztokom 4x po 20 min. Gél po odfarbení bol, rovnako ako v predchádzajúcom prípade, vyfotený pomocou prístroja Gel Doc EZ Imager a spracovaný v programe Image Lab.

#### **4.2.4.3 Elektroforéza karbonylovaných proteínov**

Ku 15 µl každej vzorky s prídavkom DNPH bol pridaný rovnaký objem (vždy 15 µl) 2x vzorkovacieho pufru podľa Laemmliho. Následne boli vzorky zahrievané pri 70 °C 15 min v inkubátore. Po denaturácii prebiehalo ochladenie na ľade a centrifugácia 5 min pri 15 000 g a 4 °C. Vzorky boli nanesené na 2 gély pripravené rovnakým spôsobom, ako v predchádzajúcich dvoch prípadoch (4% zaostrovací gél a 7% deliaci gél) vždy v duplikáte (5 µl a 10 µl). Elektroforéza prebiehala pri 100 V do zaostrenia, a potom bolo napätie zvýšené na 200 V. Po ukončení elektroforézy bol 1 gél farbený roztokom CBB cez noc na trepačke v plastovej krabičke. Odfarbenie prebiehalo pomocou odfarbovacieho roztoku po CBB 4x po 20 min. Odfarbený gél bol vyfotený pomocou prístroja Gel Doc EZ Imager a spracovaný v programe Image Lab. Gél číslo dva bol použitý pre Western blot.

#### **4.2.5 Western blot**

Kvôli optimalizácii identifikácie Vg pomocou metódy Western blot a možnosti porovnania výsledkov boli použité dve možné usporiadania tejto metódy (Semi-dry blot a Tank blot). Pre Semi-dry blot bola použitá nitrocellulosoová aj PVDF membrána, pre Tank blot iba PVDF membrána.

#### **4.2.5.1 Semi-dry blot pre detekciu vitellogenínu**

Obe membrány (nitrocellulosová a PVDF) boli vystrihnuté tak, aby odpovedali veľkosti gélu (4,5 cm x 4 cm). Tak isto boli vystrihnuté 2 ks hrubých filtračných papierov o rovnakej veľkosti pre každú membránu.

PVDF membrána bola najskôr umiestnená na 5 min do metanolu. Následne boli gély, filtračné papiere aj obe membrány inkubované v blotovacom pufri 20 – 60 min. Po inkubácii boli komponenty zostavené do tzv. sendviča v poradí: filtračný papier, membrána, gél, filtračný papier. Pomocou valčeka boli odstránené vzduchové bubliny medzi gélom a membránou. Takto boli pripravené dva sendviče – jeden s nitrocellulosovou a druhý s PVDF membránou. Komponenty boli vložené do blotovacej komôrky Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell na anódovú elektródu a uzavreté pomocou katódovej elektródy a veka. Blotovacie zariadenie bolo pripojené k zdroju napätia, kde bol nastavený konštantný prúd tak, aby hodnota zodpovedala  $5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  plochy gélu. Blotovanie prebiehalo 1 h.

Po ukončení blotovania a odpojení aparatury od zdroja napätia boli membrány opatrne pomocou pinzety umiestnené do plastovej krabičky s farbiacim roztokom Ponceau S na približne 5 min. Po zvýraznení proteínových zón boli prepláchnuté ddH<sub>2</sub>O a ďalej použité pre imunochemickú detekciu proteínov.

#### **4.2.5.2 Tank blot pre detekciu vitellogenínu**

Pre túto metódu bola použitá PVDF membrána o rozmeroch gélu (4,5 cm x 4 cm). Rovnako, ako v prípade usporiadania Semi-dry blot bola membrána najskôr umiestnená na 5 min do metanolu a potom spolu s 2 ks hrubých filtračných papierov o veľkosti gélu, gélom a poréznymi hubkami inkubovaná cca 20 – 60 min v blotovacom pufri. Následne boli do blotovacej kazety naskladané jednotlivé komponenty tak, že na čiernu dosku kazety bola umiestnená porézna hubka, na ňu filtračný papier, gél, membrána, filtračný papier a porézna hubka. Kazeta bola prikrytá priesvitnou stranou. Vzduchové bubliny medzi gélom a membránou boli odstránené pomocou valčeka. Kazeta bola uzavretá a umiestnená do blotovacej komôrky, pričom čierna strana kazety smerovala k čiernej strane komôrky (katóda). Po naliatí blotovacieho pufru bola komôrka uzavretá viečkom, umiestnená do chladničky a pripojená k zdroju. Na základe veľkosti gélu bol nastavený konštantný prúd 14 mA (prúd nesmie presiahnuť  $0,8 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  plochy gélu). Blotovanie prebiehalo cez noc (cca 17 h).

Po ukončení blotovania bol pufor z komôrky odstránený. Membrána bola opatrne pomocou pinzety vyňatá a farbená roztokom Ponceau S rovnako, ako v predchádzajúcom prípade.

#### **4.2.5.3 Semi-dry blot pre detekciu nitrovaných proteínov**

Gél, nitrocellulosoá membrána (rozmer 8 cm x 5 cm) a 2 ks hrubých filtračných papierov (rozmer 8 cm x 5 cm) boli inkubované v blotovacom pufri približne 20 – 60 min. Potom bol zostavený sendvič v poradí filtračný papier, membrána, gél, filtračný papier. Pomocou valčeka boli odstránené vzduchové bubliny medzi gélom a membránou. Sendvič bol vložený do blotovacej komôrky Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell na anódovú elektródu a uzavretý pomocou katódovej elektródy a veka. Blotovanie prebiehalo 1 h pri konštantnom prúde ( $5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  plochy gélu). Po skončení bola membrána farbená roztokom Ponceau S (cca 5 min) a po zvýraznení proteínových zón bola rozdelená na dve polovice (jedna obsahovala nitrované vzorky a druhá nitrovanú a ninitrovanú hemolymfu). Farbivo bolo odstránené premytím v ddH<sub>2</sub>O a obe membrány boli podrobené imunodetekcii.

#### **4.2.5.4 Semi-dry blot pre detekciu karbonylovaných proteínov**

Postup bol totožný, ako pri detekcii nitrovaných proteínov. Všetky komponenty (gél, nitrocellulosoá membrána, 2 ks filtračných papierov) o rozmere 8 cm x 5 cm boli inkubované v blotovacom pufri približne 20 – 60 min. Následne boli zostavené do sendviča a vložené do blotovacej komôrky Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell. Blotovanie prebiehalo opäť 1 h pri konštantom prúde ( $5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  plochy gélu). Po ukončení blotovania boli proteíny zvýraznené roztokom Ponceau S a následne podrobené imunochemickej detekcii.

### **4.2.6 Imunochemická detekcia proteínov na membráne**

#### **4.2.6.1 Pôvodný protokol pre detekciu vitellogenínu**

V pôvodnom protokole bola uvedená najskôr 2 h inkubácia membrány v 20 ml roztoku 5% sušeného mlieka v TBS. Nasledovalo premytie roztokom 50 ml Tweenu v TBS (TBS-T) 2x po dobu 10 min. Potom bola membrána inkubovaná 2 h s roztokom primárnej protilátky (koncentrácia 1:1000 v 10 ml roztoku 1% sušeného mlieka v TBS). Po tejto inkubácii nasledovalo opäť 2x premytie 50 ml roztoku TBS-T po 10 min. Ďalej prebiehala



inkubácia so sekundárnou protilátkou (koncentrácia 1:10 000 v 10 ml roztoku 1% sušeného mlieka). Po tejto inkubácii bola membrána poslednýkrát premytá 50 ml TBS-T 2x po 10 min a proteíny boli detegované farbiacim roztokom NBT-BCIP (10 ml pufru pre ALP, 33  $\mu$ l roztoku NBT a 33  $\mu$ l roztoku BCIP).

#### **4.2.6.2 Optimalizovaný postup detekcie vitellogenínu po Semi-dry blot**

Nitrocellulosová a PVDF membrána boli inkubované v 20 ml roztoku 5% sušeného mlieka v TBS cez noc na trepačke pri 4 °C. Následne boli 2x po 10 min premyté 50 ml roztoku TBS-T. Inkubácia s primárnou protilátkou prebiehala 2 h pri 4 °C v roztoku, ktorý obsahoval 5  $\mu$ l primárnej protilátky v 10 ml 1% sušeného mlieka v TBS (riedenie 1:2000). Následne boli membrány opäť premyté 2x 50 ml roztoku TBS-T po 10 min. Inkubácia so sekundárnou protilátkou prebiehala podľa pôvodného protokolu pri 4 °C. Po opätovnom premytí 2x 50 ml TBS-T boli proteíny na membránach zobrazené farbiacim roztokom, ktorý obsahoval 5 ml pufru pre ALP, 16  $\mu$ l roztoku NBT a 16  $\mu$ l roztoku BCIP.

#### **4.2.6.3 Optimalizovaný postup detekcie vitellogenínu po Tank blot**

PVDF membrána bola inkubovaná v 20 ml roztoku 5% sušeného mlieka v TBS po dobu 3 h v chladničke. Potom bola 2x po 10 min premytá 50 ml roztoku TBS-T. Inkubácia s primárnou protilátkou prebiehala cez noc pri 4 °C v roztoku, ktorý obsahoval 5  $\mu$ l primárnej protilátky v 10 ml 1% sušeného mlieka v TBS. Ďalší postup bol totožný, ako v prípade detekcie pre membrány blotované metódou Semi-dry blot.

#### **4.2.6.4 Detekcia nitrovaných proteínov**

Nitrocellulosová membrána s obsahom nitrovaného BSA a nitrovanej hemolymfy bola po preblotovaní umiestnená do blokovacieho roztoku 5% sušeného mlieka cez noc na trepačke v chladničke. Následne bola membrána 2x po 10 min premytá 50 ml roztoku TBS-T a inkubovaná v 10 ml roztoku obsahujúceho 1% sušené mlieko v TBS a monoklonálne myšie protilátky proti nitrotyrosínu (riedenie 1:250). Doba inkubácie bola 4 hod pri 4 °C. Potom bola membrána opäť premytá 2x po 10 min roztokom TBS-T a inkubovaná so sekundárnymi kozími anti-myšími protilátkami značenými chrenovou peroxidasou (riedenie 1:1000 v 10 ml 1% sušeného mlieka v TBS) 1 hod pri laboratórnej teplote. Po inkubácii nasledovalo poslednýkrát premytie 50 ml roztoku TBS-T (2x po

10 min). Na detekciu bol použitý kit pre chemiluminiscenčnú detekciu chrenovej peroxidasy Light Polaris, ktorý pozostáva z reagentu A (roztok luminolu) a reagentu B (roztok peroxidu). Reagent A a reagent B boli zmiešané v pomere 1:1 tak, aby výsledný objem činil 4 ml. Membrána bola pokrytá vzniknutým roztokom a inkubovaná 5 min pri laboratórnej teplote. Detekcia chemiluminiscencie prebiehala v chemiluminiscenčnom skeneri C-Digit po dobu 5 min a pre zobrazenie bol použitý program Image Studio Digits.

Pre porovnanie výsledkov paralelne prebiehala aj detekcia vitellogenínu v nitrovanej a nenitrovanej hemolymfe. Membrána s obsahom týchto vzoriek bola detegovaná rovnakým spôsobom s tým rozdielom, že použitá primárna protilátka bola králičia IgG proti vitellogenínu riedená 1:2000 v 10 ml roztoku 1% sušeného mlieka v TBS a inkubácia trvala 2 hod pri 4 °C. Ako sekundárna protilátka bola použitá kozia anti-králičia protilátka značená chrenovou peroxidasou (riedenie 1:5000) a inkubácia trvala 1 hod pri laboratórnej teplote. Detekcia prebiehala opäť pomocou kitu pre chemiluminiscenčnú detekciu chrenovej peroxidasy Light Polaris a chemiluminiscencia bola zobrazená pomocou skenera C-Digit (5 min detekcia) v programe Image Studio Digits.

#### **4.2.6.5 Detekcia karbonylovaných proteínov**

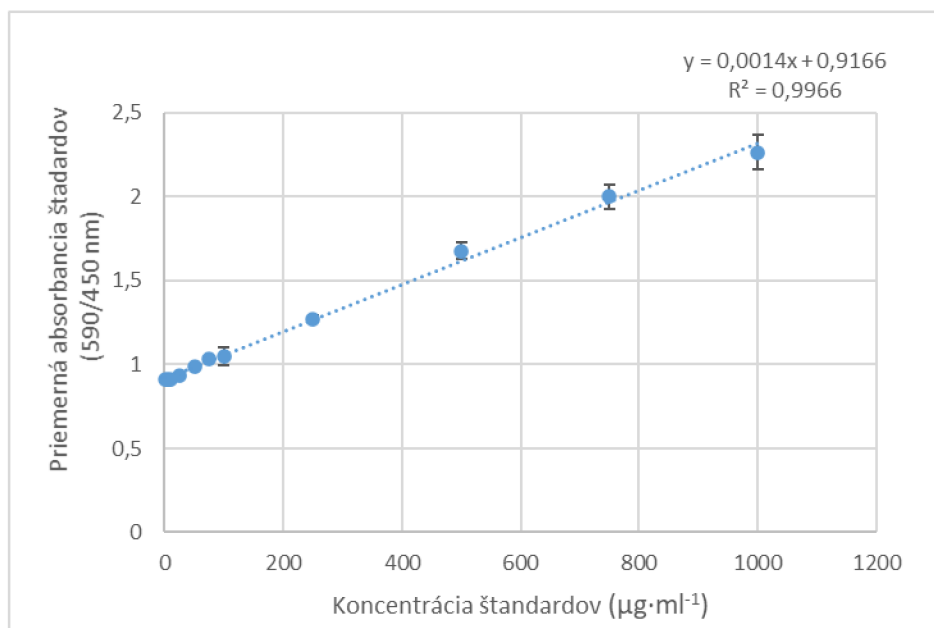
Membrána s obsahom karbonylovaných proteínov bola cez noc blokována v 5% roztoku sušeného mlieka na trepačke pri 4 °C. Potom bola 2x po 10 min premytá 50 ml roztoku TBS-T a inkubovaná s roztokom primárnej anti-DNP protilátky značenej alkalickou fosfatasou (riedenie 1:100 000 v 1% roztoku sušeného mlieka). Po opätovnom premytí 2x 50 ml roztoku TBS-T prebiehala detekcia proteínov na membráne roztokom NBT-BCIP (5 ml pufru pre ALP a 16 µl roztoku NBT a 16 µl roztoku BCIP).

## 5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 5.1 Stanovenie proteínov v hemolymfe Bradfordovou metódou

Koncentrácia celkových proteínov vo včelej hemolymfe bola stanovená optimalizovanou metódou podľa Bradforda. Princípom tejto metódy je určenie koncentrácie proteínov v neznámej vzorke na základe rovnice lineárnej regresie, ktorá vyplýva z kalibračnej priamky danej pomerom absorbancií  $A_{590}/A_{450}$  a známych koncentrácií proteínových štandardov. V kalibračnej rade proteínových štandardov (najčastejšie BSA) sa využíva väzba farbiva Coomassie brilliant blue G-250 na proteín. Koncentrácia štandardu je priamo úmerná intenzite modrého sfarbenia roztoku po pridaní CBB G-250. Absorbčné maximum komplexu CBB G-250 s proteínom je pri 595 nm. Meranie pomeru absorbancií  $A_{590}/A_{450}$  predstavuje optimalizáciu, vďaka ktorej je stanovenie presnejšie. Pri 450 nm je meraný pokles koncentrácie nenaviazaného farbiva a pri 590 nm nárast koncentrácie komplexu farbivo-proteín (Bradford, 1976; Zor & Selinger, 1996).

Podľa rovnice lineárnej regresie vyplývajúcej z grafu kalibračnej priamky štandardov BSA o koncentráciách 1 – 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  (Obr. 5) bola stanovená koncentrácia celkových proteínov v 20x a 50x nariadených vzorkách včelej hemolymfy. Riedenie bolo použité kvôli predpokladanému vysokému obsahu proteínov v neriedenej hemolymfe, kedy by absorbanca neriedenej vzorky nespádala do rozmedzia absorbancií štandardov a stanovenie by tak nebolo presné. Keďže meranie každej vzorky prebiehalo v triplikáte, z hodnôt absorbancie pre jednotlivé vzorky bola vypočítaná priemerná hodnota, ktorá bola dosadená do grafu kalibračnej závislosti a použitá pre výpočet koncentrácie celkových proteínov vo vzorke hemolymfy. Absorbanca bola stanovená ako pomer vlnových dĺžok 590/450 nm.



Obr. 5: Kalibračná priamka štandardov BSA zostavená na základe pomeru priemernej hodnoty absorbancie a koncentrácie ( $n = 3$ ). Chybové úsečky znázorňujú smerodajnú odchýlku hodnôt od priemeru.

Z rovnice regresnej závislosti bol stanovený obsah proteínov v 20x a 50x riedenej vzorke hemolymfy (Tab. 2). Pre zistenie koncentrácie proteínov v neriedenej vzorke bola nariedená vzorka vždy vynásobená príslušným riedením.

Tab. 2: Priemerná absorbancia a obsah proteínov v hemolymfe stanovený na základe rovnice lineárnej regresie štandardov BSA. Koncentrácia v neriedenej vzorke bola stanovená vynásobením koncentrácie v nariedenej vzorke a príslušného riedenia.

Riedenie	Priemerná absorbancia (590/450 nm)	Smerodajná odchýlka	Obsah proteínov (mg·ml <sup>-1</sup> )	Obsah proteínov v neriedenej vzorke (mg·ml <sup>-1</sup> )
20x	1,797	0,024	629	12,6
50x	1,284	0,041	262	13,2

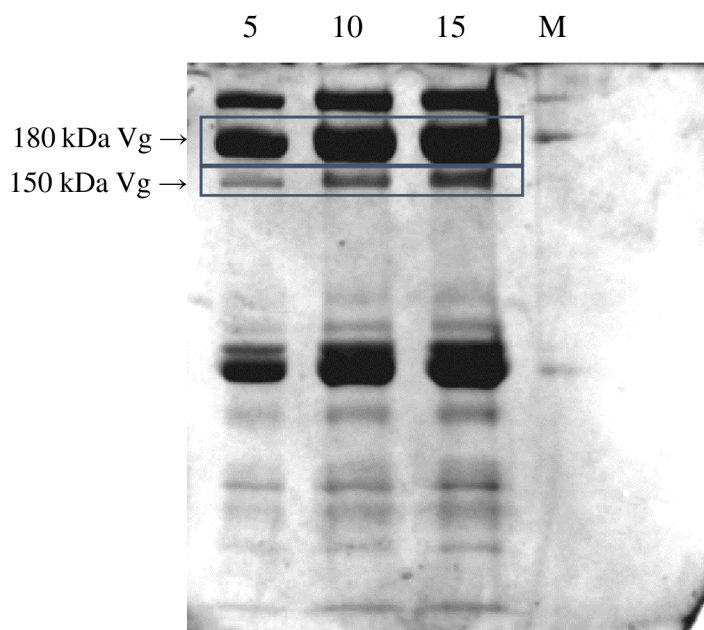
Keďže koncentrácia proteínov v dvoch stanovovaných vzorkách sa líši, bola z hodnôt vypočítaná priemerná hodnota. Približná koncentrácia celkových proteínov v použitej vzorke neriedenej hemolymfy je tak  $12,8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Zaznamenané odchýlky boli pravdepodobne spôsobené nesprávnym pipetovaním.

## **5.2 Detekcia vitellogenínu**

### **5.2.1 Separácia proteínov včelej hemolymfy metódou SDS-PAGE**

Pomocou metódy SDS-PAGE boli jednotlivé proteíny v 10x nariedenej vzorke hemolymfy rozdelené podľa molekulovej hmotnosti (Obr. 6). Marker molekulovej hmotnosti nie je na gély dostatočne viditeľný, čo je pravdepodobne spôsobené jeho príliš malým objemom ( $1 \mu\text{l}$ ) naneseným na gél, preto podľa neho nie je umožnené dostatočné rozlíšenie proteínov podľa molekulovej hmotnosti.

Na základe znalosti, že 180 kDa vitellogenín je v hemolymfe včelých robotníc jedným z najviac zastúpených proteínov (teda vytvára jednu z najsilnejších zón) (Chan et al., 2006) a kvôli vysokej molekulovej hmotnosti je jeho predpokladané umiestnenie na začiatku gélu. Jeho poloha bola zaznamenaná v hornej časti gélu. Zóna fragmentu Vg o veľkosti 150 kDa sa nachádza priamo pod 180 kDa proteínom. 40 kDa fragment sa kvôli slabej rozlíšiteľnosti nepodarilo na gély identifikovať. Prítomnosť a pozícia všetkých troch typov vitellogenínu na gély bola následne potvrdená analýzou Western blot.



Obr. 6: Rozdelenie proteínov 10x zriedenej vzorky včelej hemolymfy metódou SDS-PAGE s použitím 4% zaostrovacieho a 7% deliaceho gélu a farbené roztokom CBB. Čísla predstavujú objem vzorky ( $\mu\text{l}$ ) nanesej na gél. M značí 1  $\mu\text{l}$  proteínového markera. V rámkoch je označený 180 kDa Vg a 150 kDa Vg fragment.

## 5.2.2 Western blot a imunochemická detekcia proteínov

### 5.2.2.1 Detekcia vitellogenínu po Semi-dry blot

Pre Semi-dry blot boli použité dve rôzne membrány a bola porovnávaná účinnosť zachytenia Vg na oba povrchy. Membrány boli následne rovnako dlho (cez noc) inkubované v roztoku sušeného mlieka, a tak isto aj v roztoku s primárnou (2 h) a sekundárnou protilátkou (2 h).

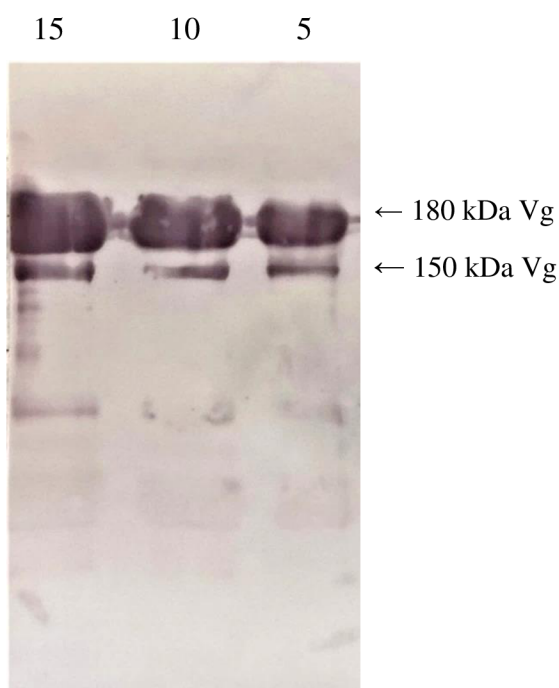
Nitrocellulosová membrána mala póry o veľkosti 0,2  $\mu\text{m}$ . Väzba proteínov na túto membránu prebieha na základe hydrofóbných interakcií. PVDF membrána bola použitá s pórmí o veľkosti 0,45  $\mu\text{m}$ , pričom na jej povrch sa proteíny viažu pomocou hydrofóbných a dipólových interakcií (Xiang et al., 2021).

Xiang et al. (2021) vo svojej štúdií porovnávali rozdiel vo väzbe proteínov na nitrocellulosovú a PVDF membránu v závislosti na molekulovej hmotnosti proteínu. Dospeli k záveru, že väčšie proteíny majú nižšiu afinitu k nitrocellulose ako tie s vyššou molekulovou hmotnosťou. Afinita proteínov k membráne je tiež závislá na veľkosti pórov. Vo všeobecnosti sa uvádza, že pre proteíny s molekulovou hmotnosťou nižšou ako 20 kDa je vhodnejšie použiť membránu s pórmí o veľkosti 0,2  $\mu\text{m}$ .

So stúpajúcou molekulovou hmotnosťou rastie aj afinita k membráne s pórmí o veľkosti 0,45  $\mu\text{m}$ . Tento predpoklad bol tiež potvrdený v štúdií od Xiang et al. (2021). Nitrocellulosová membrána s pórmí o veľkosti 0,2  $\mu\text{m}$  je tak na základe predchádzajúcich zistení najvhodnejšia pre nízkomolekulárne proteíny a PVDF membránu obsahujúcu 0,45  $\mu\text{m}$  póry je naopak lepšie použiť pre proteíny s vyššou molekulovou hmotnosťou.

Elektroforézu a Western blot identifikáciu včelieho Vg aplikovali vo svojej štúdií Havukainen et al. (2011), Amdam et al. (2003a) s využitím nitrocellulosovej membrány. Guidugli et al. (2005a) detegovali Vg na PVDF membráne.

Kvôli vlastnému porovnaniu výsledkov väzby vitellogenínu (180 kDa) a jeho fragmentov (150 kDa a 40 kDa) boli pre metódu Semi-dry blot použité oba typy membrán (Obr. 7, Obr. 8).



Obr. 7: Včelí Vg detegovaný na PVDF membráne (veľkosť pórov 0,45  $\mu\text{m}$ ) metódou Semi-dry blot pomocou polyklonálnych anti-králičích protilátok proti Vg. Čísla predstavujú objem ( $\mu\text{l}$ ) 10x nariedenej vzorky hemolymfy nanesenej na gél. Šípkami je označený 180 kDa a 150 kDa Vg.



Obr. 8: Včelí Vg detegovaný na nitrocellulosej membráne (veľkosť pórov 0,2  $\mu\text{m}$ ) metódou Semi-dry blot pomocou polyklonálnych anti-králičích protilátok proti Vg. Čísla predstavujú objem ( $\mu\text{l}$ ) 10x nariedenej vzorky hemolymfy nanesej na gél. Šípkami je označený 180 kDa proteín a oba jeho fragmenty.

Z výsledkov experimentu je možné vyvodit', že pre vizualizáciu Vg a jeho fragmentov metódou Semi-dry blot je lepšie použiť nitrocellulosovú membránu s veľkosťou pórov 0,2  $\mu\text{m}$ , ako PVDF membránu s veľkosťou pórov 0,45  $\mu\text{m}$ . Optimálna doba transferu pre nitrocellulosovú membránu bola v tomto pokuse približne 1 h pri prúde nie väčšom ako 5  $\text{mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  plochy gélu. Za týchto podmienok sa zo 7% SDS gélu na nitrocellulosovú membránu prenieslo dostatočné množstvo Vg a jeho fragmentov pre detekciu. Na PVDF membráne sa nepodarilo vizualizovať 40 kDa fragment, čo mohlo byť okrem zníženej afinity nízkomolekulárnych proteínov k tejto membráne spôsobené tiež krátkou dobou transferu, keďže pri usporiadaní Tank blot (viď. podkapitola 5.2.2.2) sa na PVDF membráne podarilo tento fragment zaznamenať.

Čo sa týka imunodetekcie, v rámci tohto usporiadania neboli robené rozdiely a obe membrány boli detegované rovnakým spôsobom. Blokácia v 5% roztoku sušeného mlieka prebiehala cez noc v chladničke (cca 17 h), avšak vzhľadom na výskyt nešpecifických interakcií protilátky na pozadí by bolo možné dobu blokácie ešte o pár hodín predĺžiť. Nešpecifické interakcie sa nachádzali na oboch membránach (viac na nitrocellulosej ako na PVDF) najmä v zónach, kde bolo nanesených 15  $\mu\text{l}$  vzorky.

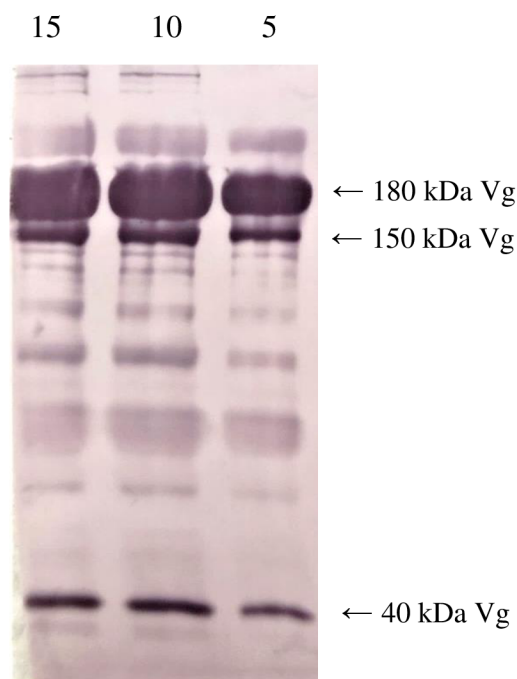


Inkubácia s primárnou protilátkou prebiehala 2 h pri 4 °C (riedenie 1:2000), pričom množstvo primárnej protilátky bolo oproti pôvodnému protokolu znížené na polovicu. Inkubácia so sekundárnou protilátkou značenou ALP (riedenie 1:10 000) prebiehala 2 h pri 4 °C. Pre odstránenie nešpecifickej interakcie by bolo možné otestovať ešte nižšiu koncentráciu sekundárnej protilátky v roztoku, avšak to v tejto bakalárskej práci z časových dôvodov nebolo možné uskutočniť. Proteíny boli vizualizované pomocou farbiaceho roztoku NBT-BCIP pre detekciu ALP. Množstvo farbiaceho roztoku bolo oproti pôvodnému protokolu znížené na polovicu (bolo použitých 16 µl NBT, 16 µl BCIP a 5 µl pufru pre ALP) a tento objem stačil na zafarbenie oboch membrán (4,5 x 4 cm).

### **5.2.2.2 Detekcia vitellogenínu po Tank blot**

Pre toto usporiadanie bola v pokuse použitá PVDF membrána, na ktorú sa pri konštantnom prúde 14 mA cez noc prenieslo dostatočné množstvo proteínov pre detekciu.

Po vizualizácii proteínov sa na membráne (Obr. 9) objavilo okrem zón patriacich Vg aj pomerne výrazné pozadie, čo zhoršuje identifikáciu cieľových proteínov. Tento nežiadúci jav mohol byť spôsobený príliš krátkou blokáciou membrány v roztoku sušeného mlieka (3 h), a tak isto dlhou inkubáciou s primárnou protilátkou (cez noc). Na membráne sú viditeľné takmer všetky proteíny hemolymfy, avšak Vg a jeho fragmenty je možné identifikovať ako najtmavšie zóny. Podarilo sa rozoznať 180 kDa proteín a oba jeho fragmenty (150 kDa a 40 kDa) na rozdiel od Semi-dry usporiadania, kedy na PVDF membránu nebol prenesený 40 kDa fragment.



Obr. 9: Včelí Vg detegovaný na PVDF membráne (veľkosť pórov 0,45  $\mu\text{m}$ ) metódou Tank blot pomocou polyklonálnych anti-králičích protilátok proti Vg. Čísla predstavujú objem ( $\mu\text{l}$ ) 10x nariedenej vzorky hemolymfy nanesej na gél. Šípkami je označený 180 kDa proteín a oba jeho fragmenty.

### 5.2.2.3 Zhrnutie optimalizácie metódy Western blot a imunodetekcie

Vo všeobecnosti je Semi-dry blot metóda v súvislosti s kvalitou získaného výsledku menej efektívna ako Tank blot, a to najmä pre veľké proteíny. Tank blot vďaka dlhšiemu priebehu, nižšiemu prúdu a prítomnosti veľkého množstva transferového pufru poskytuje ostrejšie, lepšie identifikovateľnejšie zóny a zvyšuje pravdepodobnosť optimálneho výsledku. Nevýhodou v porovnaní so Semi-dry blot je časová náročnosť a vysoká spotreba transferového pufru. V prípade dostatočného množstva proteínu vo vzorke, optimalizácie podmienok transferu a použitia vhodnej membrány je možné aj metódou Semi-dry blot dosiahnuť požadovaného výsledku.

Po zohľadnení všetkých aspektov (kvalita výsledku, čas, spotreba materiálu) sa ako najefektívnejšia metóda pre identifikáciu včelieho Vg a jeho fragmentov javí Semi-dry blot v dĺžke trvania 1 h pri konštantnom prúde, ktorý nepresiahne  $5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$  plochy gélu za použitia nitrocellulosovej membrány. PVDF membrána pri metóde Semi-dry blot neposkytovala uspokojivý výsledok, pretože na nej nebol detegovaný 40 kDa fragment. V usporiadaní Tank blot sa na PVDF membránu podarilo preniesť všetky tri typy

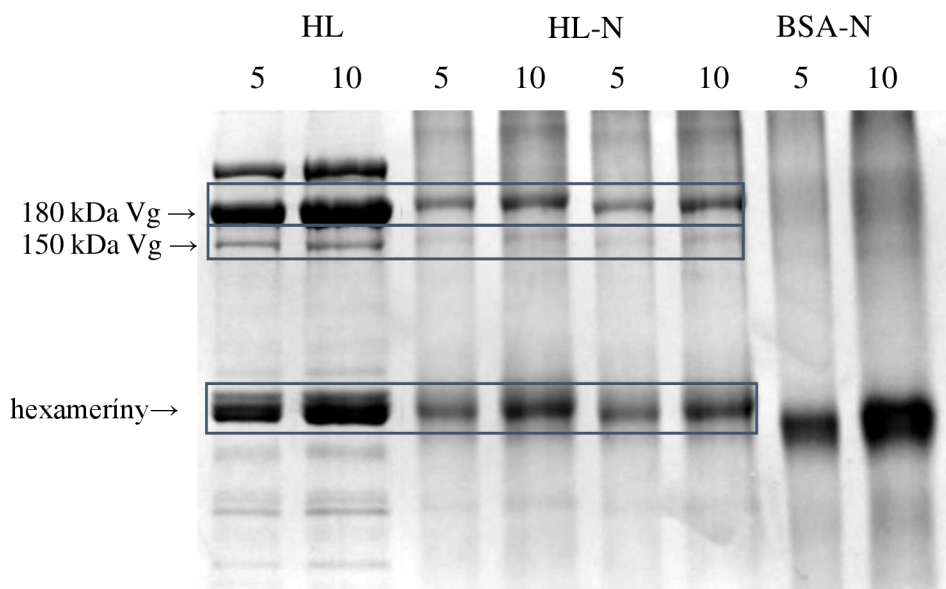
vitellogenínu, avšak vzhľadom na časovú náročnosť je efektívnejšie použiť usporiadanie Semi-dry blot.

Ideálna doba blokácie v 5% roztoku sušeného mlieka je najmenej 17 h. Inkubácia s roztokom primárnej protilátky po dobu 2 h v chladničke sa javí ako dostatočná a nie je potrebné túto dobu predlžovať, pretože s dlhšou inkubáciou sa zvyšuje počet nešpecifických interakcií protilátky s ostatnými proteínmi, čo následne sťažuje identifikáciu Vg. Riedenie primárnej protilátky 1:2000 v 1% roztoku sušeného mlieka je pre detekciu dostatočné. Nežiadúce pozadie môže byť do istej miery spôsobené krátkou dobou premývania, ktorá bola v tomto pokuse dodržiavaná podľa pôvodného protokolu (po každej inkubácii 2x 50 ml roztoku TBS-T po 10 min). V roztoku sekundárnej protilátky (1:10 000) je ideálne membránu inkubovať približne 2 h. Pre úplné odstránenie nešpecifických interakcií by bolo vhodné otestovať ešte nižšiu koncentráciu sekundárnej protilátky. Pre identifikáciu 2 membrán o veľkosti 4,5 x 4 cm stačí 5,32 ml roztoku NBT-BCIP (16 µl NBT, 16 µl BCIP a 5 ml pufru pre detekciu ALP).

### **5.3 Detekcia nitrovaných proteínov**

#### **5.3.1 Separácia proteínov metódou SDS-PAGE**

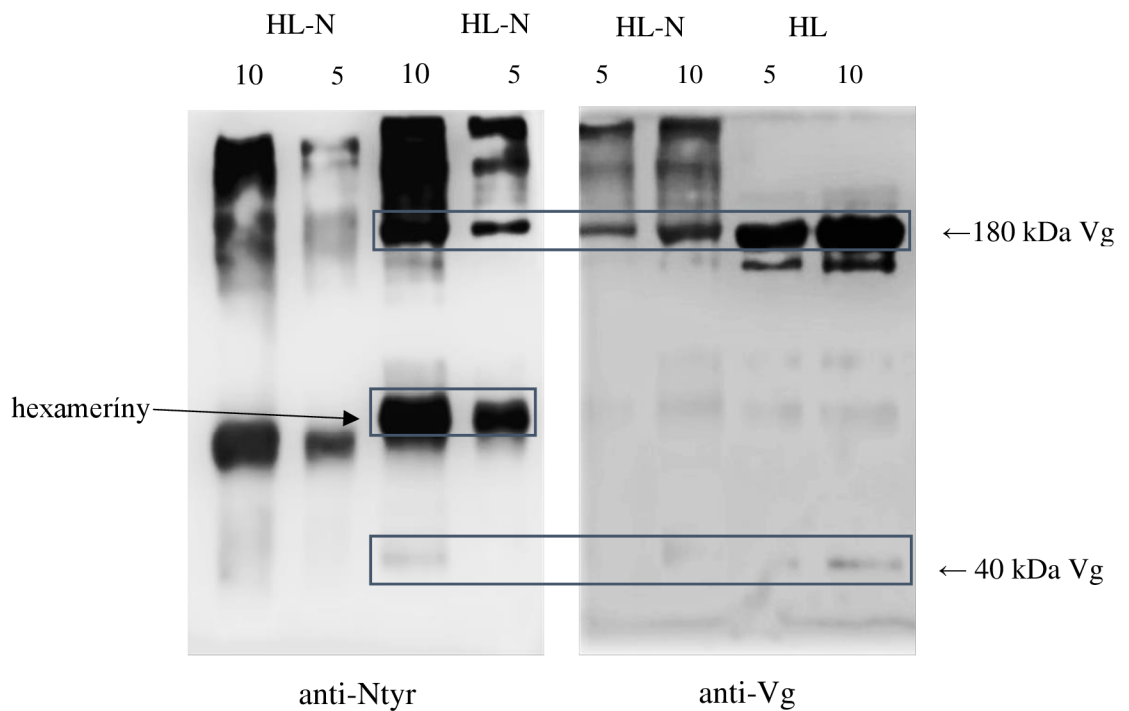
Vzorky nitrovanej hemolymfy, nitrovaného BSA (pozitívna kontrola nitrácie, nemodifikovaný BSA má približne 66 kDa) a nemodifikovanej hemolymfy boli rozdelené podľa molekulovej hmotnosti (Obr. 10). Nemodifikovaná hemolymfa primárne slúžila ako kontrola pre identifikáciu Vg pri následnej imunochemickej detekcii, ale využitá bola aj pre porovnanie vplyvu TNM na rozdelenie a zastúpenie proteínov v gély. Na prvý pohľad je viditeľná zmena vo vzhľade, počte a veľkosti zón medzi nitrovanou a nenitrovanou vzorkou hemolymfy. Oxidačné poškodenie pravdepodobne spôsobilo rozpad a stratu niektorých proteínov, čo sa prejavilo zúžením najvýraznejších zón (zníženie koncentrácie proteínu) a vznikom nešpecifických tmavých pásov v dráhe putovania vzorky. Z najviac zastúpených proteínov v hemolymfe (apoliproteín 1, vitellogenín, hexameríny) (Chan et al., 2006; Seehus et al., 2006b) boli po nitrácii identifikované iba Vg a hexameríny. V oboch typoch hemolymfy je možné zaznamenať aj 150 kDa fragment Vg.



Obr. 10: SDS-PAGE nitrovaných proteínov a nemodifikovanej hemolymfy (4% zaostrovací gél, 7% deliaci gél), farbené roztokom CBB. Všetky vzorky sú 10x zriedené. Čísla nad obrázkom znamenajú objem vzoriek nanosený v  $\mu\text{l}$ . Nenitrovaná hemolymfa (HL) je aplikovaná 2x; nitrovaná hemolymfa (HL-N) je aplikovaná 4x a nitrované BSA (BSA-N) je nanosené 2x. V rámkoch je zvýraznený 180 kDa Vg, 150 kDa Vg a hexameríny.

### 5.3.2 Imunochemická detekcia proteínov na membráne

Nitrované proteíny boli detegované na nitrocellulosovej membráne s použitím monoklonálnych myších protilátok proti nitrotyrosínu a kozích anti-myších protilátok značených chrenovou peroxidasou. Ako pozitívna kontrola nitrácie bol použitý nitrovaný BSA a pre overenie pozície vitellogenínu zároveň prebiehala detekcia Vg v nitrovanej a nenitrovanej vzorke hemolymfy (Obr. 11).



Obr. 11: Detekcia nitrovaných proteínov pomocou anti-Ntyr protilátok a detekcia vitellogenínu v nitrovanej a nenitrovanej vzorke hemolymfy pomocou anti-Vg protilátok metódou Semi-dry blot na nitrocellulosovej membráne o veľkosti pórov 0,2  $\mu\text{m}$ . Čísla nad obrázkom značia objem vzoriek nanesený v  $\mu\text{l}$ . Obrázok vľavo: nitrované BSA (BSA-N) a nitrovaná hemolymfa (HL-N). Obrázok vpravo: nitrovaná hemolymfa (HL-N) a nemodifikovaná hemolymfa (HL).

Na základe súbežnej detekcie nitrovaných proteínov a Vg bolo potvrdené, že tyrosinové zvyšky v štruktúre 180 kDa Vg podliehajú nitrácii *in vitro* pôsobením TNM. Včelí Vg obsahuje z celkového počtu 1770 aminokyselín celkom 49 tyr zvyškov (UniProtKB, 9.5.2022). Na membráne s detekciou nitrotyrosínu je tiež viditeľná slabá zóna, ktorá by mohla patriť 40 kDa fragmentu Vg. Vg však podľa výsledkov nie je jediným proteínom, ktorý je vo včelej hemolymfe nitrovaný. Ďalšia zóna, ktorá bola detegovaná pomocou anti-Ntyr protilátok má okolo 70 kDa (na základe porovnania s BSA, ktorý má približne 66 kDa) a pravdepodobne patrí hexamerínom. Hexameríny tvoria rodinu proteínov, ktoré pozostávajú zo šiestich podjednotiek a charakteristicky sa nachádzajú v hemolymfe hmyzu. U dospelých včelích robotníc boli nájdené tri hexameríny a ich molekulová hmotnosť sa pohybuje od 65 do 75 kDa. Majú prevažne zásobnú funkciu (Danty et al., 1998). U včiel bolo dokázané, že podliehajú oxidačnej karbonylácii, avšak v oveľa menšej miere ako Vg (Seehus et al., 2006b).

V líniách, kde boli nanosené nitrované vzorky došlo k vzniku nešpecifických pásov v hornej časti gélu nad 180 kDa vitellogenínom. Vysvetliť je to možné tým, že nitráciou často dochádza vplyvom krížových väzieb k vzniku dityrosínu a zosieťovaných modifikovaných proteínových agregátov, ktoré majú vyššiu molekulovú hmotnosť ako pôvodný proteín. V polyakrylamidovom gély sa tento jav prejaví ako nešpecifické pásy nad miestom výskytu pôvodného proteínu (Capeillère-Blandin et al., 2004).

Zóna patriaca Vg je vo vzorkách nitrovanej hemolymfy podstatne menšia v porovnaní s nemodifikovanou hemolymfou. Môže to byť spôsobené tým, že došlo k modifikácii iba niektorých tyr zvyškov, keďže nitrácii živých systémoch podlieha iba malý počet tyrosinových zvyškov v pomere k ich celkovej bilancii v organizme (približne jeden až päť na 10 000 tyr zvyškov). Reakciu ovplyvňuje typ radikálu, pH, vzájomná poloha tyr zvyškov (krátka vzdialenosť podmieňuje nitráciu), ale dôležitý je napríklad aj výskyt hydrofóbných aminokyselín v oblasti nitrácie. Nitrácii na proteíne podliehajú primárne miesta, do ktorých sa viažu kovové ióny (Radi, 2004; Abello et al., 2009).

Zmenšená Vg zóna bola však zaznamenaná aj pri použití protilátok proti Vg, a teda pravdepodobne došlo k degradácii a zníženiu celkovej koncentrácie tohto proteínu vplyvom TNM.

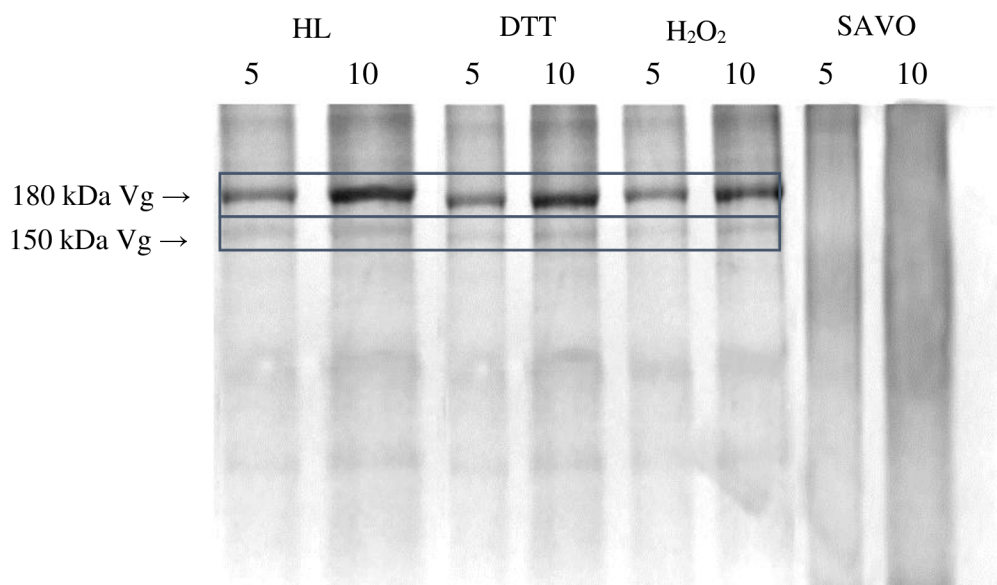
TNM je používaný ako mierne nitračné činidlo, ktoré reaguje s tyr zvyškami za vzniku Ntyr pri pH okolo 8. Pri pH 6 môže tiež reagovať s cys zvyškami, pričom vznikajú disulfidové väzby a  $\text{NO}_2^-$  (Sokolovsky et al., 1966). Zmena vlastností Ntyr v porovnaní s tyr súvisí hlavne s odlišnou hodnotou  $\text{pK}_a$  hydroxylových skupín (10,1 pre tyr a 7,2 pre Ntyr). Hydroxylová skupina Ntyr má za fyziologických podmienok pH približne v polovici prípadov negatívny náboj na rozdiel od -OH skupiny tyr, ktorá je neutrálna. V kyslom pH, kedy je -OH skupina nenabitá, je Ntyr hydrofóbnejší ako tyr. Naopak zásadité pH spôsobuje, že Ntyr má vyššiu tendenciu niesť záporný náboj a je tak oveľa hydrofilnejší ako tyr. Tieto efekty menia reaktivitu tyr zvyškov a bránia napríklad jeho fosforylácii (Abello et al., 2009).

Oxidačné poškodenie Vg vznikom nitrotyrosínu bolo v minulosti imunohistochemicky skúmané v mozgu včelích robotníč. Cieľom štúdie bolo zistiť, či sa herbicíd Parakvat podieľa na neurodegenerácii mozgu včiel, ako to bolo potvrdené u ľudí a *Drosophily melanogaster*. V mozgu včiel však nitrované proteíny neboli detegované (Seehus et al., 2006b).

## 5.4 Detekcia karbonylovaných proteínov

### 5.4.1 Separácia proteínov metódou SDS-PAGE

Proteíny v hemolymfe s prídavkom činidiel  $\text{H}_2\text{O}_2$ , SAVA a DTT boli modifikované pomocou roztoku DNPH a rozdelené podľa molekulovej hmotnosti (Obr.12). Na prvý pohľad je viditeľné, že proteíny v hemolymfe po prídavku DNPH v 2 M HCl podľahli degradácii. Prídavok 1% roztoku chlórnanu sodného (SAVO) spôsobil, že nedošlo k vizualizácii žiadnej proteínovej zóny. Pravdepodobne bola jeho koncentrácia príliš vysoká. Kyselina chlórna a jej soli predstavujú skupinu silných oxidačných činidiel, ktoré oxidujú väčšinu reaktívnych aminokyselinových zvyškov (thioly, sulfidy, amíny, amidy a pod). U proteínov tiež môže spôsobiť hydrolyzu peptidovej väzby, či vznik krížových väzieb a proteínových agregátov (Hawkins et al., 2003). V ostatných vzorkách je viditeľná zóna, ktorá by mohla patriť 180 kDa Vg a 150 kDa Vg. Ostatné proteínové zóny sa nepodarilo vizualizovať, čo by mohlo byť zapríčinené prídavkom silnej kyseliny (2 M HCl) a tým spôsobenou proteolýzou.



Obr. 12: Elektroforéza 10x riedenej vzorky hemolymfy derivatizovanej DNPH a vzoriek po prídavku činidiel pre oxidáciu (1% SAVO,  $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2$ ) a redukcii ( $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  DTT) po derivatizácii DNPH. V rámkoch je zaznamenaný pravdepodobný výskyt 180 kDa Vg a 150 kDa Vg.

### 5.4.2 Imunochemická detekcia proteínov na membráne

Nitrocellulosová membrána po inkubácii s anti-DNP protilátkami značenými ALP a po farbení roztokom NBT-BCIP je na obrázku 13. Karbonylované proteíny sa nepodarilo po oxidácii a derivatizácii s DNPH vizualizovať. Príčin, ktoré mohli tento jav spôsobiť, je viac. Mohlo sa jednať o nevhodnú metódu oxidácie, pri ktorej došlo k rozpadu proteínov. Rovnako by mohlo byť problémom riedenie protilátky alebo jej funkčnosť.



Obr. 13: Nitrocellulosová membrána (priemer pórov 0,2  $\mu\text{m}$ ) po detekcii karbonylovaných proteínov.



V priebehu experimentálnej práce bola testovaná aj derivatizácia oxidovaných vzoriek činidlom DNPH až po prenesení proteínov z gélu na membránu. Pred blokáciou v sušenom mlieku bola membrána inkubovaná 5 min v roztoku  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  DNPH v  $2 \text{ M HCl}$  a následne niekoľkokrát premytá metanolom a roztokom TBS-T a podrobená imunodetekcii. Ani v tomto prípade však nebol dosiahnutý pozitívny výsledok. Skúšaná bola tiež metóda oxidácie BSA (ako vzorového proteínu) podľa Guedes et al. (2009), kedy bol proteín oxidovaný 12 h pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  zmesou  $0,25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{FeCl}_2/\text{EDTA}$  v pomere 1:1 v prítomnosti  $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Následne bola testovaná derivatizácia oxidovaného BSA s DNPH v  $2 \text{ M HCl}$  pred elektroforézou, aj po prenesení proteínov na membránu. Ani v jednom prípade nedošlo k pozitívnemu výsledku, preto tieto postupy ani výsledky nie sú v bakalárskej práci podrobne uvedené. Použitie menšieho riedenia protilátok tiež nevedlo k žiadnemu detekovatelnému signálu (výrobcom odporúčané riedenie bolo 1:180 000, testované riedia boli 1:100 000 a 1:50 000), preto bolo nakoniec od tejto metódy upustené.

Metóda detekcie karbonylovaných proteínov s využitím DNPH je pomerne rozšírená a často používaná. Využili ju napríklad Kramer et al. (2021), ktorý detegovali oxidačné poškodenie u rôznych druhov hmyzu. Nakamura et al. (1999) použili ako modelový organizmus hlístovca *Caenorhabditis elegans* a pomocou Western blot analýzy, využitia DNPH a anti-DNP protilátok dokázali, že najväčší fragment Vg u tohto živočícha (vitellogenín-6) primárne podlieha oxidačnej karbonylácii. Podobne Seehus et al. (2006a) pomocou DNPH a Western blotu potvrdili, že včelí Vg podlieha karbonylácii najviac zo všetkých proteínov v hemolymfe. V nadväzujúcej štúdií Seehus et al. (2006b) dokázali, že množstvo a prítomnosť karbonylovaných proteínov v mozgu včiel je priamo úmerná príslušnosti ku kaste, pričom najrozšírejšie oxidačné poškodenie bolo zaznamenané v mozgu lietaviek.

## 6 ZÁVER

Táto bakalárska práca sa venuje proteínu vitellogenínu, jeho pôsobeniu a funkciám v organizme včely medonosnej. V teoretickej časti sú na základe stanovených cieľov zhrnuté doterajšie poznatky o štruktúre, biologických a antioxidačných vlastnostiach Vg a jeho vplyve na kastové usporiadanie či dlhovekosť včiel. Posledná kapitola literárnej rešerše je zameraná na oxidačné poškodenie makromolekúl a stručný popis metód používaných pre stanovenie antioxidačných vlastností nízkomolekulárnych látok a proteínov.

V úvode praktickej časti bola stanovená koncentrácia celkových proteínov vo vzorke včelej hemolymfy Bradfordovou metódou. Ďalej prebiehala detekcia Vg s využitím SDS-PAGE elektroforézy, Western blotu a imunochemickej detekcie. Z dôvodu optimalizácie boli porovnávané rôzne podmienky detekcie. Najlepší výsledok bol dosiahnutý s použitím usporiadania Semi-dry blot, nitrocellulosovej membrány (0,2  $\mu\text{m}$ ) a riedenia primárnej protilátky 1:2000 s inkubáciou 2 h pri 4 °C.

Skúmanie vplyvu RNS na Vg bolo realizované prostredníctvom nitrácie hemolymfy s tetranitromethanom a následnej imunochemickej detekcie nitrotyrosínu. Bolo potvrdené, že Vg podlieha nitračnej modifikácii s RNS za vzniku nitrotyrosínu. Okrem Vg boli v nitrovanej hemolymfe detegované aj hexameríny, ktoré tak tiež podliehajú nitrácii vplyvom TNM. Prednostná nitrácia týchto proteínov by mohla mať pozitívny vplyv na antioxidačnú ochranu ostatných molekúl pred poškodením spôsobeným RNS.

Oxidačné poškodenie bolo testované pomocou derivatizácie oxidovaných proteínov s DNPH a detekcie modifikovaných proteínov s anti-DNP protilátkami. Detekcia však nebola úspešná a je potrebné túto metódu do budúcnosti optimalizovať.

Doterajšie publikácie cielené na štúdium antioxidačných funkcií včelieho Vg využívali najmä metódu RNAi alebo detekciu karbonylovaných proteínov (vplyv ROS). Vznik nitrotyrosínu a oxidačné poškodenie Vg vplyvom RNS ešte nebolo dostatočne preskúmané. Výsledky dosiahnuté v tejto bakalárskej práci by preto mohli slúžiť ako podklad pre ďalší na antioxidačných vlastnosti včelieho Vg v stresových podmienkach vedúcich k zvýšenej tvorbe ROS a RNS.

Nadväzujúce pokusy by mali byť venované identifikácii nitrovaného Vg a jeho fragmentov napríklad pomocou hmotnostnej spektrometrie. Ďalej by bolo vhodné testovať a porovnať vplyv RNS a ROS na hladinu nitrácie a oxidácie Vg v rôznych častiach tela, či v rôznych vývinových štádiách včiel.

## 7 LITERATÚRA

- Abello, N., Kerstjens, H. A. M., Postma, D. S., & Bischoff, R. (2009). Protein Tyrosine Nitration: Selectivity, Physicochemical and Biological Consequences, Denitration, and Proteomics Methods for the Identification of Tyrosine-Nitrated Proteins. *Journal of Proteome Research*, 8(7), 3222-3238. <https://doi.org/10.1021/pr900039c>
- Amdam, G. V., & Omholt, S. W. (2002). The Regulatory Anatomy of Honeybee Lifespan. *Journal of Theoretical Biology*, 216(2), 209-228. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2002.2545>
- Amdam, G. V., & Omholt, S. W. (2003). The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*, 223(4), 451-464. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(03\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(03)00121-8)
- Amdam, G. V., Norberg, K., Hagen, A., & Omholt, S. W. (2003a). Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1799-1802. <https://doi.org/10.1073/pnas.0333979100>
- 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). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-1>
- 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(5), 767-773. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.02.010>
- Amdam, G. V., Aase, A. L. T. O., Seehuus, S. -C., Kim Fondrk, M., Norberg, K., & Hartfelder, K. (2005). Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology*, 40(12), 939-947. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.08.004>
- Amdam, G. V., Norberg, K., Page, R. E., Erber, J., & Scheiner, R. (2006a). Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behavioural Brain Research*, 169(2), 201-205. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.01.006>
- Amdam, G. V., Csondes, A., Fondrk, M. K., & Page, R. E. (2006b). Complex social behaviour derived from maternal reproductive traits. *Nature*, 439(7072), 76-78. [doi:10.1038/nature04340](https://doi.org/10.1038/nature04340)
- Amdam, G. V., Fennern, E., & Havukainen, H. (2012). Vitellogenin in Honey Bee Behavior and Lifespan. In C. G. Galizia, D. Eisenhardt, & M. Giurfa (Eds.), *Honeybee Neurobiology and Behavior* (pp. 17-29). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-2099-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-007-2099-2_2)
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. Methods for testing antioxidant activity (2001). *The Analyst*, 127(1), 183-198. <https://doi.org/10.1039/b009171p>  
AstroNuklFyzika. <https://astronuklfyzika.cz/DetekceSpektrometrie.htm#6> (26.3.2022).
- Awde, D. N., Skandalis, A., & Richards, M. H. (2020). Vitellogenin expression corresponds with reproductive status and caste in a primitively eusocial bee. *Journal of Insect Physiology*, 127. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2020.104113>
- 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), 1-8. <https://doi.org/10.1673/031.002.0101>
- Beckman, K. B., & Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 78(2), 547-581. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.2.547>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology* (pp. 15-27). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99005-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99005-5)
- Bielski, B. H., Arudi, R. L., & Sutherland, M. W. (1983). A study of the reactivity of HO<sub>2</sub>/O<sup>2-</sup> with unsaturated fatty acids. *The Journal of biological chemistry*, 258(8), 4759-4761. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)32488-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)32488-8)
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Capeillère-Blandin, C., Gausson, V., Descamps-Latscha, B., & Witko-Sarsat, V. (2004). Biochemical and spectrophotometric significance of advanced oxidized protein products. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1689(2), 91-102. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2004.02.008>
- 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*, 30(3), 277-286. <https://doi.org/10.1111/imb.12694>
- Cao, G., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3), 303-311. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90027-R](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90027-R)
- Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1996). Antioxidant Capacity of Tea and Common Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), 3426-3431. <https://doi.org/10.1021/jf9602535>
- 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(17), 7128-7133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701909104>
- Danty, E., Arnold, G., Burmester, T., Huet, J. -C., Huet, D., Pernollet, J. -C., & Masson, C. (1998). Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(5-6), 387-397. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(98\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(98)00011-3)
- Day, B. J., Patel, M., Calavetta, L., Chang, L. -Y., & Stamler, J. S. (1999). A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), 12760-12765. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.22.12760>
- DeGrandi-Hoffman, G., & Chen, Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.007>
- du Toit, R., Volsteedt, Y., & Apostolides, Z. (2001). Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology*, 166(1-2), 63-69. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00446-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00446-2)
- Eaton, S. L., Hurtado, M. L., Oldknow, K. J., Graham, L. C., Marchant, T. W., Gillingwater, T. H., Farquharson, C., & Wishart, T. M. (2014). A Guide to Modern Quantitative Fluorescent Western Blotting with Troubleshooting Strategies. *Journal of Visualized Experiments*, (93), 52099. <https://doi.org/10.3791/52099>
- Engelmann, F. (1979). Insect Vitellogenin: Identification, Biosynthesis, and Role in Vitellogenesis. In *Advances in Insect Physiology Volume 14* (pp. 49-108). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60051-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60051-X)
- Engels, W., & Imperatriz-Fonseca, V. L. (1990). Caste Development, Reproductive Strategies, and Control of Fertility in Honey Bees and Stingless Bees. In W. Engels (Ed.), *Social Insects* (pp. 167-230). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-74490-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-74490-7_9)
- Espín, J. C., Soler-Rivas, C., & Wichers, H. J. (2000). Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of Vegetable Oils and Oil Fractions Using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 648-656. <https://doi.org/10.1021/jf9908188>
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology & medicine*, 11(1), 81-128. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)
- Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J. -L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z., & Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 645-656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>

- Evans, J. D., & Spivak, M. (2010). Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S62-S72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.019>
- Guedes, S., Vitorino, R., Domingues, R., Amado, F., & Domingues, P. (2009). Oxidation of bovine serum albumin: identification of oxidation products and structural modifications. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(15), 2307-2315. <https://doi.org/10.1002/rcm.4149>
- Guidugli, K. R., Piulachs, M. -D., BelléS, X., LourençO, A. P., & Simões, Z. L. P. (2005a). Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 59(4), 211-218. <https://doi.org/10.1002/arch.20061>
- Guidugli, K. R., Nascimento, A. M., Amdam, G. V., Barchuk, A. R., Omholt, S., Simões, Z. L. P., & Hartfelder, K. (2005b). Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters*, 579(22), 4961-4965. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.085>
- 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(7), 1138-1147. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.04.021>
- Haddad, L. S., Kelbert, L., & Hulbert, A. J. (2007). Extended longevity of queen honey bees compared to workers is associated with peroxidation-resistant membranes. *Experimental Gerontology*, 42(7), 601-609. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2007.02.008>
- Hagedorn, H. H., & Kunkel, J. G. (1979). Vitellogenin and Vitellin in Insects. *Annual Review of Entomology*, 24(1), 475-505. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.24.010179.002355>
- Halliwell, B. (1995). How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposia*, 61, 73-101. <https://doi.org/10.1042/bss0610073>
- Hansen, I. A., Attardo, G. M., Rodriguez, S. D., & Drake, L. L. (2014). Four-way regulation of mosquito yolk protein precursor genes by juvenile hormone-, ecdysone-, nutrient-, and insulin-like peptide signaling pathways. *Frontiers in Physiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00103>
- Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298-300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Harwood, G. P., Ihle, K. E., Salmela (nee Havukainen), H., & Amdam, G. V. (2017). Regulation of Honeybee Worker (*Apis mellifera*) Life Histories by Vitellogenin. In *Hormones, Brain and Behavior* (pp. 403-420). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803592-4.00036-5>
- Havukainen, H., Underhaug, J., Wolschin, F., Amdam, G., & Halskau, Ø. (2012). A vitellogenin polyserine cleavage site: highly disordered conformation protected from proteolysis by phosphorylation. *Journal of Experimental Biology*, 215(11), 1837-1846. <https://doi.org/10.1242/jeb.065623>
- 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(39), 28369-28381. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465021>
- Hawkins, C. L., Pattison, D. I., & Davies, M. J. (2003). Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids*, 25(3-4), 259-274. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0016-x>
- Haydak, M. H. (1970). Honey bee nutrition. *Annual review of entomology*, 15(1), 143-156. <https://www.annualreviews.org/doi/pdf/10.1146/annurev.en.15.010170.001043>
- 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(1785). <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0454>
- Hsieh, Y. -S., & Hsu, C. -Y. (2011a). The changes of age-related molecules in the trophocytes and fat cells of queen honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 42(6), 728-739. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0085-x>

- Hsieh, Y. -S., & Hsu, C. -Y. (2011b). Honeybee trophocytes and fat cells as target cells for cellular senescence studies. *Experimental Gerontology*, 46(4), 233-240. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.10.007>
- Chan, Q. W. T., Howes, C. G., & Foster, L. J. (2006). Quantitative Comparison of Caste Differences in Honeybee Hemolymph. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(12), 2252-2262. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600197-MCP200>
- Ilyasov, R. A., Poskarykov, A. V., & Nikolenko, A. G. (2015). Nucleotide polymorphism of the gene Vg of honey bees. *Binomics*, 2015(7), 54-61. <https://doi.org/https://biomicsj.ru/upload/iblock/544/4.pdf>
- Işıl Berker, K., Güçlü, K., Tor, İ., Demirata, B., & Apak, R. (2010). Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method. *Food Analytical Methods*, 3(3), 154-168. <https://doi.org/10.1007/s12161-009-9117-9>
- Izumi, S., Yano, K., Yamamoto, Y., & Takahashi, S. Y. (1994). Yolk proteins from insect eggs: Structure, biosynthesis and programmed degradation during embryogenesis. *Journal of Insect Physiology*, 40(9), 735-746. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(94\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0022-1910(94)90001-9)
- Jay, S. C. (1963). The Development of Honeybees in their Cells. *Journal of Apicultural Research*, 2(2), 117-134. <https://doi.org/10.1080/00218839.1963.11100072>
- Jiang, J., Zhang, Y., Ma, L., Niu, T., Dong, T., Sheng, R., Li, L., Xu, Y., Xi, L., & Li, G. (2020). Molecular Characterization of Neoseiulus barkeri Vitellogenin Genes and Vitellogenin Receptor during Reproductive Diapause. *Insects*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/insects11040203>
- Johnson, B. R. (2003). Organization of work in the honeybee: a compromise between division of labour and behavioural flexibility. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1511), 147-152. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2207>
- Kramer, B. H., Nehring, V., Buttstedt, A., Heinze, J., Korb, J., Libbrecht, R., Meusemann, K., Paxton, R. J., Séguret, A., Schaub, F., & Bernadou, A. (2021). Oxidative stress and senescence in social insects: a significant but inconsistent link?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1823). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0732>
- Kunkel, J. G., & Nordin, J. H. (1985). Yolk proteins. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, 1, 83-111. <http://marlin.bio.umass.edu/biology/kunkel/pub/reprints/kn-1985.pdf>
- Lavine, M. D., & Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1295-1309. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00092-9](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00092-9)
- Leipart, V., Montserrat-Canals, M., Cunha, E. S., Luecke, H., Herrero-Galán, E., Halskau, Ø., & Amdam, G. V. (2022). Structure prediction of honey bee vitellogenin: a multi-domain protein important for insect immunity. *FEBS Open Bio*, 12(1), 51-70. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13316>
- Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.-G., Bong-Whan, A., Shaltiel, S., Stadtman, E. R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology*, 464-478. doi:10.1016/0076-6879(90)86141-h
- Li, H., & Zhang, S. (2017). Functions of Vitellogenin in Eggs. In M. Kloc (Ed.), *Oocytes* (pp. 389-401). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6_17)
- Li, Z., Zhang, S., Liu, Q., & May, R. C. (2008). Vitellogenin Functions as a Multivalent Pattern Recognition Receptor with an Opsonic Activity. *PLoS ONE*, 3(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001940>
- Li, Z., Zhang, S., Zhang, J., Liu, M., & Liu, Z. (2009). Vitellogenin is a cidal factor capable of killing bacteria via interaction with lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Molecular Immunology*, 46(16), 3232-3239. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.08.006>
- Liu, J., Qu, W., & Kadiiska, M. B. (2009). Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 238(3), 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.029>
- LoPachin, R. M., Gavin, T., Petersen, D. R., & Barber, D. S. (2009). Molecular mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal and acrolein toxicity: nucleophilic targets and adduct formation. *Chemical research in toxicology*, 22(9), 1499-1508. <https://doi.org/10.1021/tx900147g>

- 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(6), 721-733. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0596-9>
- Malencik, D. A., & Anderson, S. R. (2003). Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent probe. *Amino Acids*, 25(3-4), 233-247. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0014-z>
- Marco Antonio, D. S., Guidugli-Lazzarini, K. R., do Nascimento, A. M., Simões, Z. L. P., & Hartfelder, K. (2008). RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. *Naturwissenschaften*, 95(10), 953-961. <https://doi.org/10.1007/s00114-008-0413-9>
- Martin, N., Hulbert, A. J., Brenner, G. C., Brown, S. H. J., Mitchell, T. W., & Else, P. L. (2019). Honeybee caste lipidomics in relation to life-history stages and the long life of the queen. *Journal of Experimental Biology*, 24, 222. <https://doi.org/10.1242/jeb.207043>
- Maurizio, A., & Hodges, F. E. D. (1950). The Influence of Pollen Feeding and Brood Rearing on the Length of Life and Physiological Condition of the Honeybee Preliminary Report. *Bee World*, 31(2), 9-12. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1950.11094617>
- 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(4), 589-604. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(89\)90011-6](https://doi.org/10.1016/0040-8166(89)90011-6)
- McKenzie, S. J., Baker, M. S., Buffinton, G. D., & Doe, W. F. (1996). Evidence of oxidant-induced injury to epithelial cells during inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Investigation*, 98(1), 136-141. <https://doi.org/10.1172/JCI118757>
- Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A Novel Method for Measuring Antioxidant Capacity and its Application to Monitoring the Antioxidant Status in Premature Neonates. *Clinical Science*, 84(4), 407-412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>
- Mocchegiani, E., Muzzioli, M., & Giacconi, R. (2000). Zinc, metallothioneins, immune responses, survival and ageing. *Biogerontology*, 1(2), 133-143. <https://doi.org/10.1023/A:1010095930854>
- Møller, I. M., Rogowska-Wrzesinska, A., & Rao, R. S. P. (2011). Protein carbonylation and metal-catalyzed protein oxidation in a cellular perspective. *Journal of Proteomics*, 74(11), 2228-2242. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.004>
- 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(8), 2181-2193. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu171>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.08.001>
- Nakamura, A., Yasuda, K., Adachi, H., Sakurai, Y., Ishii, N., & Goto, S. (1999). Vitellogenin-6 Is a Major Carbonylated Protein in Aged Nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 264(2), 580-583. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1549>
- 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(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062>
- Nowakowski, A. B., Wobig, W. J., & Petering, D. H. (2014). Native SDS-PAGE: high resolution electrophoretic separation of proteins with retention of native properties including bound metal ions. *Metallomics*, 6(5), 1068-1078. <https://doi.org/10.1039/C4MT00033A>
- Omholt, S. W. (1987). Thermoregulation in the winter cluster of the honeybee, *Apis Mellifera*. *Journal of Theoretical Biology*, 128(2), 219-231. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(87\)80170-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(87)80170-4)
- Omholt, S. W., & Amdam, G. V. (2004). Epigenetic Regulation of Aging in Honeybee Workers. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2004(26). <https://doi.org/10.1126/sageke.2004.26.pe28>

- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002). Analysis of Antioxidant Activities of Common Vegetables Employing Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) and Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assays: A Comparative Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(11), 3122-3128. <https://doi.org/10.1021/jf0116606>
- Page, R. E., & Peng, C. Y. -S. (2001). Aging and development in social insects with emphasis on the honey bee, *Apis mellifera* L. *Experimental Gerontology*, 36(4-6), 695-711. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00236-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00236-9)
- Page, R. E., Rueppell, O., & Amdam, G. V. (2012). Genetics of Reproduction and Regulation of Honeybee (*Apis mellifera* L.) Social Behavior. *Annual Review of Genetics*, 46(1), 97-119. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155610>
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Riba, D., Ruiz, C., Prat, J., Bellmunt, M. J., & Barja, G. (1998). Mitochondrial membrane peroxidizability index is inversely related to maximum life span in mammals. *Journal of Lipid Research*, 39(10), 1989-1994. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)32497-4](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)32497-4)
- Pan, M. L., Bell, W. J., & Telfer, W. H. (1969). Vitellogenic Blood Protein Synthesis by Insect Fat Body. *Science*, 165(3891), 393-394. <https://doi.org/10.1126/science.165.3891.393>
- 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(2), 153-160. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00111-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00111-0)
- 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(4), 459-465. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00021-3)
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(12), 4003-4008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307446101>
- Raikhel, A. S., & Dhadialla, T. S. (1992). Accumulation of Yolk Proteins in Insect Oocytes. *Annual Review of Entomology*, 37(1), 217-251. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001245>
- Rice-evans, C. A., Miller, N. J., Bolwell, P. G., Bramley, P. M., & Pridham, J. B. (1995). The Relative Antioxidant Activities of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids. *Free Radical Research*, 22(4), 375-383. <https://doi.org/10.3109/10715769509145649>
- Robinson, G. E., Page, R. E., Strambi, C., & Strambi, A. (1992). Colony Integration in Honey Bees: Mechanisms of Behavioral Reversion. *Ethology*, 90(4), 336-348. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1992.tb00844.x>
- Rodriguez Messan, M., Page, R. E., & Kang, Y. (2018). Effects of vitellogenin in age polyethism and population dynamics of honeybees. *Ecological Modelling*, 388, 88-107. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2018.09.011>
- Roy-Zokan, E. M., Cunningham, C. B., Hebb, L. E., McKinney, E. C., & Moore, A. J. (2015). Vitellogenin and vitellogenin receptor gene expression is associated with male and female parenting in a subsocial insect. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1809). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0787>
- Sadd, B. M., Kleinlogel, Y., Schmid-Hempel, R., & Schmid-Hempel, P. (2005). Trans-generational immune priming in a social insect. *Biology Letters*, 1(4), 386-388. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0369>
- Salmela, H., Amdam, G. V., Freitag, D., & Schneider, D. S. (2015). Transfer of Immunity from Mother to Offspring Is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin. *PLOS Pathogens*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005015>
- Salmela, H., Stark, T., Stucki, D., Fuchs, S., Freitag, 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(3), 495-506. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw014>



- Seehuus, S. -C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., & Amdam, G. V. (2006a). Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 962-967. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502681103>
- Seehuus, S. -C., Krekling, T., & Amdam, G. V. (2006b). Cellular senescence in honey bee brain is largely independent of chronological age. *Experimental Gerontology*, 41(11), 1117-1125. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2006.08.004>
- Seehuus, S. C., 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* (Online), 7, 1-14. <https://doi.org/10.1673/031.007.5201>
- Sethuraman, M., McComb, M. E., Heibeck, T., Costello, C. E., & Cohen, R. A. (2004). Isotope-coded Affinity Tag Approach to Identify and Quantify Oxidant-sensitive Protein Thiols. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(3), 273-278. <https://doi.org/10.1074/mcp.T300011-MCP200>
- Shu, Y., Zhou, J., Tang, W., Lu, K., Zhou, Q., & Zhang, G. (2009). Molecular characterization and expression pattern of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) vitellogenin, and its response to lead stress. *Journal of Insect Physiology*, 55(7), 608-616. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.03.005>
- Schlegel, R. A., & Williamson, P. (2001). Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death & Differentiation*, 8(6), 551-563. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400817>
- Schmid, M. R., Brockmann, A., Pirk, C. 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(2), 439-444. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.11.002>
- Sohal, R. S., & Weindruch, R. (1996). Oxidative Stress, Caloric Restriction, and Aging. *Science*, 273(5271), 59-63. <https://doi.org/10.1126/science.273.5271.59>
- Sohal, R. S. (2002). Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(1), 37-44. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00856-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00856-0)
- Sokolovsky, M., Riordan, J. F., & Vallee, B. L. (1966). Tetranitromethane. A Reagent for the Nitration of Tyrosyl Residues in Proteins. *Biochemistry*, 5(11), 3582-3589. <https://doi.org/10.1021/bi00875a029>
- Štípek, S. (2000). *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci* (1. vydanie). Grada Publishing.
- Toth, A. L., & Robinson, G. E. (2005). Worker nutrition and division of labour in honeybees. *Animal Behaviour*, 69(2), 427-435. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.03.017>
- Trenczek, T., & Engels, W. (1986). Occurrence of vitellogenin in drone honeybees (*Apis mellifica*). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 10(3), 307-311. <https://doi.org/10.1080/01688170.1986.10510254>
- 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(6), 475-481. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(89\)90054-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(89)90054-1)
- Tufail, M., Nagaba, Y., Elgendy, A. M., & Takeda, M. (2014). Regulation of vitellogenin genes in insects. *Entomological Science*, 17(3), 269-282. <https://doi.org/10.1111/ens.12086>
- Tufail, M., Takeda, M. (2008). Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology*, 54(12), 1447-58. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.08.007>
- Tufail, M., & Takeda, M. (2009). Insect vitellogenin/lipophorin receptors: Molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *Journal of Insect Physiology*, 55(2), 88-104. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.11.007>
- UniProtKB. <https://www.uniprot.org/uniprot/Q868N5> (9.5.2022).
- Valle, D. (1993). Vitellogenesis in insects and other groups: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(1), 1-26. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761993000100005>
- 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(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002779>

- 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(2), 145-149. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2014.11.005>
- Wheeler, D. E., & Kawooya, J. K. (1990). Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 14(4), 253-267. <https://doi.org/10.1002/arch.940140405>
- Wu, Z., Yang, L., He, Q., & Zhou, S. (2021). Regulatory Mechanisms of Vitellogenesis in Insects. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593613>
- Xiang, Y., Zheng, Y., Liu, S., Liu, G., Li, Z., & Dong, W. (2021). Comparison of the sensitivity of Western blotting between PVDF and NC membranes. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91521-8>
- Yan, L. -J. (2009). Analysis of Oxidative Modification of Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 56(1). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1404s56>
- Yang, L. -H., Huang, H., & Wang, J. -J. (2010). Antioxidant responses of citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae), exposed to thermal stress. *Journal of Insect Physiology*, 56(12), 1871-1876. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.08.006>
- Yokozawa, T., Chen, C. P., Dong, E., Tanaka, T., Nonaka, G. -I., & Nishioka, I. (1998). Study on the Inhibitory Effect of Tannins and Flavonoids against the 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl Radical. *Biochemical Pharmacology*, 56(2), 213-222. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00128-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00128-2)
- Zhang, S., Wang, S., Li, H., Li, L. (2011). Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(3), 303-305. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.11.003>
- Zhang, W., Liu, Z., Zhu, M., Ma, L., Wang, Y., Wang, H., Guo, X., & Xu, B. (2017). Molecular cloning, expression and oxidative stress response of the vitellogenin Gene (AccVg) from *Apis cerana cerana*. *Apidologie*, 48(5), 599-611. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0503-9>
- Zor, T., & Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Analytical Biochemistry*, 236(2), 302-308. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0171>

## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AA	akrylamid
AAPH	2,2'-azobis(isobutyrimidamid)-dihydrochlorid
ABTS	2,2'-azinobis(3-ethyl-2,3-dihydrobenzothiazol-6-sulfonát)
APS	persíran amónny
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
BIS	bisakrylamid
BSA	hovädzi sérový albumín
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DMF	Dimethylformamid
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazín
DPPH	1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl
dsDNA	dvojvláknová DNA
DTT	dithiotreitol
DUF 1943	doména vitellogenínu s neznámou funkciou
FRAP	ferric reducing antioxidant power
HL	hemolymfa
JH	juvenilný hormón
MUFA	mononenасыtené mastné kyseliny
NBT	nitrotetrazoliová modrá
Ntyr	nitrotyrosin
ORAC	oxygen radical absorbance capacity
PUFA	polynenasыtené mastné kyseliny
PVDF	polivinylidénfluorid
RNAi	RNA interferencia
RNS	reaktívne dusíkové radikály
ROS	reaktívne kyslíkové radikály
SDS	dodecylsíran sodný
TBS-T	Tween-20 v TBS
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity
TEMED	N,N'-tetramethylendiamin
TNM	tetranitromethan
TPTZ	tripyridyltriazín
Vg	vitellogenín
Vg	gén vitellogenínu
Vg-like	vitellogenínu podobné proteíny
VgR	vitellogenínové receptory
Vn	vitellín
vWFD	von Willebrandov faktor typu D