

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Odorant vazebné proteiny včely medonosné

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Pavel Urva
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
Rok:	2023

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

V Olomouci dne

.....Podpis studenta

Poděkování

Touto cestou bych chtěl poděkovat zejména svému vedoucímu bakalářské práce Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, PhD. za starostlivé a spolehlivé vedení. Velmi děkuji Mgr. Zuzaně Žvátorové za její odborný a přátelský přístup při osvojování metod, které jsem použil v rámci praktické části této práce. Rovněž děkuji všem zaměstnancům katedry biochemie, kteří mi neváhali pomoci při řešení některých nečekaně nastalých potíží v laboratoři a stejně tak velmi děkuji členům rodiny a skupině přátel, jež byli velmi nápomocni při korekci diakritických a stylistických chyb.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora

Pavel Urva

Název práce

Odorant vazebné proteiny včely medonosné

Typ práce

Bakalářská

Pracoviště

Katedra biochemie

Vedoucí práce

Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.

Rok obhajoby práce

2023

Abstrakt

Včela medonosná je eusociální druh, jehož existence je zcela závislá na vzájemné kooperaci všech jedinců společenstva. Spolupráce a soudržnost celé kolonie je založena zejména na feromonální komunikaci a komunikaci zprostředkované odoranty nebo tzv. semiochemikáliemi, látkami jež jsou nositeli informace. Odoranty jsou hydrofobní látky a k tomu, aby mohly být tyto látky doručeny k cílovým čichovým neuronům, jsou zapotřebí odorant vazebné protein (OBP) nebo podobné chemosenzorické proteiny (CSP), název OBP vyplývá z role při pachové komunikaci (olfakce). V posledních letech však výzkumy naznačují, že tyto proteiny hrají důležitou roli nejen při olfakci ale také jako molekulové transportéry a kooperují s imunitním systémem i CNS.

Mnohá onemocnění, ať už bakteriální, virová či infestace roztoči, ovlivňují expresi těchto proteinů a tím narušují integritu hmyzích společenstev. Výsledky této práce potvrzují vliv varroózy na expresi vybraných OBP. Měření genové exprese OBP proběhlo na úrovni izolace mRNA z celých těl včel s následnou RT-qPCR.

Z výsledků měření genové exprese ověřených statistickým výpočtem t-testu bylo zjištěno, že v silně infestovaných včelstvech byla signifikantně zvýšena exprese *Obp3*, *Obp14*, *Obp17* a *Obp21* v porovnání s kontrolní skupinou.

Studium OBP přináší stále nové poznatky o významu těchto proteinů v pochopení biochemických a fyziologických procesů včely medonosné, jejíž činnost je celosvětově významná pro hospodářství.

Tato práce v žádném případě nevyčerpává problematiku OBP. Smyslem této práce je navázat na předchozí studie spojené s OBP a iniciovat další výzkumnou činnost zaměřenou na studium biochemických procesů závislých na OBP.

Klíčová slova

Odorant vazebné proteiny, odoranty, perirecepce, stresové reakce, včela medonosná, varroóza, semiochemikálie

Počet stran

49

Počet příloh

0

Jazyk

Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Pavel Urva
Title	Odorant binding proteins of <i>Apis mellifera</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstract	The honey bee is a eusocial species whose existence is entirely dependent on the mutual cooperation of all individuals in the community. The cooperation and cohesion of the whole colony is based mainly on pheromonal communication and communication mediated by odorants or so-called semiochemicals, substances that carry information. Odorants are hydrophobic substances, and odorant binding protein (OBP) or similar chemosensory proteins (CSP) are required to deliver these substances to target olfactory neurons; the name OBP derives from its role in olfactory communication (olfaction). In recent years, however, research suggests that these proteins play an important role not only in olfaction but also as molecular transporters and cooperate with the immune system and the CNS.

The honey bee is a eusocial species whose existence is entirely dependent on the mutual cooperation of all individuals in the community. The cooperation and cohesion of the whole colony is based mainly on pheromonal communication and communication mediated by odorants or so-called semiochemicals, substances that carry information. Odorants are hydrophobic substances, and odorant binding protein (OBP) or similar chemosensory proteins (CSP) are required to deliver these substances to target olfactory neurons; the name OBP derives from its role in olfactory communication (olfaction). In recent years, however, research suggests that these proteins play an important role not only in olfaction but also as molecular transporters and cooperate with the immune system and the CNS.

Many diseases, whether bacterial, viral or mite infestations, affect the expression of these proteins and thus disrupt the integrity of insect communities. The results of this work confirm the effect of varroosis on the expression of selected OBPs. OBP gene expression measurements were performed at the level of mRNA isolation from whole bee bodies followed by RT-qPCR.

From the results of gene expression measurements verified by statistical t-test calculation, it was found that the expression of Obp3, Obp14, Obp17 and Obp21 was

significantly increased in heavily infested colonies compared to the control group.

The study of OBPs is providing new insights into the importance of these proteins in understanding the biochemical and physiological processes of the honey bee, whose activities are of global economic importance.

This thesis is by no means exhaustive of OBPs issues. The purpose of this thesis is to build on previous studies related to OBP and to initiate further research activities aimed at studying OBP-dependent biochemical processes.

Keywords	Odorant binding proteins, odorants, perireception, stress reactions, honey bee, varroosis, semiochemicals
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1 Odoranty	2
2.2 Odorant vazebné proteiny hmyzu	3
2.3 Struktura OBP	3
2.3.1 Aminokyselinové složení OBP	4
2.3.2 Odlišnosti a podobnosti OBP hmyzu a obratlovců	4
2.3.3 Chemosenzorické proteiny (CSP).....	5
2.4 Funkce OBP	6
2.4.1 Transdukce signálu	6
2.4.2 Některé další funkce hmyzích OBP	7
2.5 Exprese OBP	8
2.5.1 Anatomie včely medonosné.....	10
2.5.2 Vliv vývojového stádia a pohlaví na expresi OBP	11
2.5.3 Tkáňová exprese OBP	12
2.5.4 Vliv infekce DWV na expresi OBP	12
2.6 OBP a hmyzí imunita	13
2.6.1 Imunitní systém včely medonosné.....	14
2.6.2 Včelí choroby	14
2.6.3 Hygienické chování	15
2.7 Biosenzory na bázi OBP	15
2.8 Metody výzkumu OBP	16
2.8.1 Primerový modeling	16
2.8.2 Izolace nukleových kyselin.....	16
2.8.3 Reverzní transkripce	16
2.8.4 Polymerázová řetězová reakce.....	17
2.8.5 Strukturní analýza OBP	18
2.8.6 Proteinová purifikace.....	18
2.8.7 Eleлектроantenografie (EAG)	19
3 PRAKTICKÁ ČÁST	20
3.1 Materiál a vybavení	20
3.1.1 Biologický materiál	20

3.1.2 Chemikálie.....	20
3.1.3 Materiál a přístrojové vybavení	21
3.1.4 Softwarové vybavení	22
3.2 Metody.....	22
3.2.1 Homogenizace biologického materiálu	22
3.2.2 Izolace nukleových kyselin.....	23
3.2.3 Stanovení koncentrace	24
3.2.4 Kontrola integrity RNA na 1,1% agarosovém gelu	24
3.2.5 Přepis RNA do cDNA	25
3.2.6 EndPoint PCR.....	26
3.2.7 Real-Time qPCR	26
3.2.8 Stanovení genové exprese.....	27
3.2.9 Statistické vyhodnocení	28
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	29
4.1 Zavádění a optimalizace qPCR.....	29
4.2 Stanovení genové exprese OBP	35
4.2.1 Stanovení exprese genu <i>Obp3</i>	36
4.2.2 Stanovení exprese genu <i>Obp14</i>	37
4.2.3 Stanovení exprese genu <i>Obp17</i>	38
4.2.4 Stanovení exprese genu <i>Obp21</i>	39
4.2.5 Potenciální vliv jiných stresorů na expresi OBP	40
5 ZÁVĚR.....	41
6 BIBLIOGRAFIE	43
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	49

CÍLE PRÁCE

Teoretická část

- zpracování literární rešerše o odorant vazebných proteinech hmyzu/včel
- zpracování poznatků o molekulárně-biologické a biochemické podstatě jejich funkčnosti a vlivu na imunitní reakce hmyzu/včel
- Zpracování informací aktuální vědecké literatury o významu odorant vazebných proteinů ve spojení s různými patogeny či parazity hmyzu/včel
- Vypracování literární rešerše o metodách výzkumu těchto proteinů (stanovení struktury, genové exprese, tvorby apod.)

Praktická část

- Zavedení a optimalizace PCR protokolu pro stanovení jejich genové exprese

1 ÚVOD

Odorant vazebné proteiny (OBP/OBPs z anglického odorant binding proteins) mají nezastupitelnou funkci ve vnímání pachu u všech suchozemských i vodních živočichů. V porovnání s vyššími živočichy, jakými jsou například obratlovci, hrají tyto proteiny u nižších organismů mnohem důležitější roli. Důvodem této odlišnosti je, že vyšší organismy mají daleko více možností, jak se orientovat v okolním světě. Při porovnání např. lidského vnímání světa s vnímáním hmyzím pomocí fyzikálních vlastností okolí, jakými jsou např. percepce světla a zvuku, je znatelný velký fylogenetický pokrok oproti bezobratlým. Je možné, že právě proto se u hmyzu vyvinula tak silná odezva na chemické signály v podobě čichových vjemů. Rozmanitost chemické komunikace založené na vnímání feromonů nebo obecných odorantů je u hmyzu několikanásobně rozsáhlejší i citlivější než u obratlovců (Pelosi & Maida, 1990; Pelosi, 1994).

OBP jsou malé (cca 13-16 kDa) hydrofilní molekuly, které jsou schopny přenášet polární i nepolární molekuly z lymfy v tykadlech k olfaktorickým neuronům, které signál přetransformují v konkrétní informaci (Pelosi, 1994).

Pro pochopení podstaty a funkce OBP je třeba objasnit roli odorantů v pachovém dorozumívání, látek schopných stimulovat čichové ústrojí (konkrétně olfaktorické neurony) organismu, jak ve vnitrodruhové (intraspecifické) a mezidruhové (interspecifické) komunikaci, tak ve všeobecné reakci na chemické podněty z vnějšího okolí, jakými může být například zdroj potravy nebo signalizace nějakého nebezpečí (Dahanukar et al., 2005).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V průběhu mnoha let studia OBP byly postupně popisovány nové typy OBP a na základě jejich strukturních a sekvenčních podobností/odlišností, v závislosti na úhlu pohledu, byla rodina OBP hmyzu do současnosti rozšířena z původních tří podrodin o další dvě, tedy do celkem pěti dalších podrodin, tj. na feromony vázající proteiny PBP (pheromone binding proteins), dvě podrodiny obecných odorant vazebných proteinů GOBP1 a GOBP2, a dvě podrodiny tykadlových vazebných proteinů (antennal binding proteins) ABP1 a ABP2 (Rihani et al., 2021). I přes rozmanité dělení sdílí však podrodiny OBP mnoho společného a v následujícím popisu jejich struktury a funkce jsou OBP probírány z hlediska objektivního pohledu jakožto komplexní skupiny.

2.1 Odoranty

Za odorant je považována každá nízkomolekulární látka schopna stimulovat olfaktorické neurony. Dále se musí jednat o látku schopnou prostoupit skrze pórovité otvory v kutikule, která obklopuje čichové orgány. A v neposlední řadě je potřeba, aby se daná látka vyskytovala v okolí v dostatečné koncentraci. Koncentrace jednotlivých odorantů potřebná pro vyvolání stimulu na daný vnější podnět se různí. Nicméně společnou vlastností těchto molekul je jejich schopnost stimulovat odezvu nervového systému již při velmi nízkých koncentracích (řádově od koncentrace $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ až po koncentrace nižší než $\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$), (Pelosi, 1994). Právě díky vysoké citlivosti OBP vůči chemickým signálům se také uvažuje o jejich širším využití v průmyslu v podobě biosenzorů (Persaud, 2012).

Pro odoranty není vždy snadné prostoupit ze vzduchu přímo k olfaktorickým neuronům, aniž by došlo k interakci s jinými proteiny obsaženými v takzvané sensilární lymfě, která obklopuje čichové řasinky s olfaktorickými neurony v tykadlech hmyzu. Tyto procesy byly již komplexně popsány jako perireceptorové procesy a zahrnují veškeré interakce odorantů s proteiny obsaženými v sensilární lymfě (Getchel et al., 1984).

Již v padesátých letech bylo zjištěno, že povrch tykadel hmyzu je pokryt kutikulou se specifickými strukturami. Další výzkum přinesl objev nano-pórových struktur. Nano-pórové struktury mají funkci jakéhosi síta a umožňují průchod odorantů přiměřené velikosti dovnitř čichových orgánů, přičemž zabráňují ztrátám vody v opačném směru a také neumožňují vniknutí větších molekul (Ando et al., 2019).

2.2 Odorant vazebné proteiny hmyzu

Jak bylo zmíněno hmyzí OBP byly nejprve řazeny do tří základních podrodin (PBP, GOBP1 a GOBP2), které sdílí některé konzervované aminokyselinové sekvence, což bylo prokázáno nalezením těchto sekvenčních struktur u několika různých druhů mūr a jejich existence se předpokládá i u ostatních hmyzích druhů z řádu motýli (*Lepidoptera*) a mimo jiné i blanokřídli (*Hymenoptera*), mezi které se řadí také včela medonosná (*Apis mellifera* L.) a až později byly popsány podrodiny ABP1 a ABP2. Podle uvedeného systému třídění dle aminokyselinových sekvencí jsou rozlišovány na základě místa exprese a na základě pohlaví jedince. Zatímco OBP obratlovců mohou interagovat s mnoha různými odoranty nezávisle na tom, zda se jedná o sexuální komunikaci či jiný podnět, OBP hmyzu jsou obecně charakterizovány spíše jako proteiny s významem pro sexuální komunikaci. Jako první z uvedených tří podrodin odorant vazebných proteinů byly popsány právě OBP vázající pohlavní hormony nebo též feromony vázající proteiny, zkráceně PBP/PBPs z anglického „Sex-pheromone binding proteins“. Přičemž PBP jsou pohlavně specifické pro samčí jedince a je možné pozorovat jejich zvýšenou expresi v samčích tykadlech. Tyto proteiny byly zprvu zkoumány u motýlů. První objevený protein ze skupiny PBP byl objeven u druhu *Antheaera polyphemus*. Dalšími významnými podrodinami jsou dvě skupiny všeobecných odorant vazebných proteinů, zkráceně GOBP1 a GOBP2 z anglického výrazu „general odorant binding proteins“. Tyto skupiny mají taktéž každá svou specifickou konzervovanou aminokyselinovou sekvenci (Vogt & Riddiford, 1981)

2.3 Struktura OBP

Jak bylo již zmíněno, OBP jsou malé hydrofilní proteiny schopné selektivně vázat určité odoranty odpovědné za čichový vjem či odoranty mající feromonální charakter (Pelosi, 1998). Tyto vlastnosti vycházejí právě ze struktury OBP, a především ze struktur vazebného místa. Terciární struktura OBP je tvořena šesti α -helixy. OBP hmyzu obsahují v naprosté většině případů 6 silně konzervovaných cysteinů, tvořících 3 disulfidické vazby, což lze považovat za typický biologický znak těchto proteinů. Sekvenční vzdálenosti mezi těmito cysteiny jsou 5 aminokyselinových residuí mezi Cys1 a Cys2, 8 aminokyselinových residuí mezi Cys3 a Cys4 a 20 aminokyselinových residuí mezi Cys5 a Cys6. Příkladem je struktura *Bombyx mori* PBP: Cys19-Cys54, Cys50-Cys108 a Cys97-Cys117, jehož struktura byla odhalena za pomoci krystalové rentgenové difrakce. Tyto disulfidické vazby zajišťují vzájemnou soudržnost dvou z šesti α -helix v rámci 3D struktury proteinu (Sandler et al., 2000).

Existuje skupina OBP s názvem „C-minus OBPs“, která obsahuje ve své struktuře pouze 4 cysteiny, tvořící dvě disulfidické vazby (Spinelli et al., 2012). V genomu včely medonosné se nachází také jeden OBP s výjimečným zastoupením 5 cysteinů, tvořících pouze dvě disulfidické vazby (*A. mellifera* OBP14) (Spinelli et al., 2012).

Díky struktuře stabilizované disulfidickými vazbami, vodíkovými můstky, hydrofobními interakcemi a tvorbě agregátů vykazují OBP výjimečnou tepelnou stabilitu. Jejich stabilitu taktéž posiluje vazba odorantů jakožto ligandů. Z tohoto důvodu se uvažuje o využití OBP v moderních biosenzorech, přičemž takovéto biosenzory již byly syntetizovány (Di Pietrantonio et al., 2013; Schwaighofer et al., 2014).

2.3.1 Aminokyselinové složení OBP

Pozoruhodným zjištěním je fakt, že sekvenční podobnost OBP v rámci jednoho druhu je velmi různorodá. Naopak podobnost byla objevena při porovnání aminokyselinových sekvencí OBP mezi jednotlivými hmyzími druhy. To ukazuje opět na již zmíněné zavedení OBP rodin – GOBP a PBP. U OBP obratlovců byly zase nalezeny znaky, které je řadí do rodiny transportních proteinů lipokalinů (Pelosi et al., 2018), což jsou malé hydrofilní proteiny se strukturou β -barelu obklopující vazebné místo pro hydrofobní ligandy (Flower, 1996). Vazebná místa obsahují několik konzervovaných aminokyselin, nepolárních aromatických (Phe, Trp, Tyr) a nepolárního Leu hydrofobně interagovat s nepolárními odoranty. Tyto aminokyseliny jsou konzervované v rámci OBP rodin i v rámci evolučně starších a funkčně i strukturně podobných chemosenzorických proteinů (chemosenzory proteins – CSPs) (Sandler et al., 2000).

Z hlediska aminokyselinového složení jsou také OBP děleny do tří skupin: OBP s dlouhým řetězcem (~160 aminokyselinových residuí), OBP se středně dlouhým řetězcem (~120 aminokyselinových residuí) a OBP s krátkým řetězcem (~100 aminokyselinových residuí) (Rihani et al., 2021).

2.3.2 Odlišnosti a podobnosti OBP hmyzu a obratlovců

Podobností mezi OBP hmyzu a OBP obratlovců není mnoho, snad jedinou významnou podobností je jejich role při vnímání pachu, zde však jejich krátký, de facto jednobodový, výčet podobnosti až na některé výjimky zakončuje. Rozdíly ve struktuře hmyzích OBP a OBP obratlovců jsou patrné už při porovnání molekulární struktury. Hmyzí OBP jsou

tvořeny šesti α -helixy, OBP obratlovců osmi β -listy a krátkým α -helix úsekem (Bianchet et al., 1996; Pelosi, 1998). Majoritním rozdílem ve struktuře je velikost, OBP obratlovců jsou typické velikostí okolo 18-20 kDa, zatímco hmyzí OBP jsou o něco lehčí a jejich velikost se pohybuje přibližně okolo 15 kDa (Pelosi & Maida, 1990; Pelosi, 1994).

Navzdory tomu, že jsou mezi OBP hmyzu a OBP obratlovců velké rozdíly, ať už se jedná o jejich terciární struktury, molekulovou hmotnost či aminokyselinové složení, jejich funkce reverzibilně vázat odoranty jsou totožné. Toto opět potvrzuje význam pachového vnímání organismů napříč celou evolucí a dokazuje to konvergentní vývoj OBP u hmyzu i obratlovců (Pelosi, 1998).

Jako podobnost mezi OBP obratlovců a hmyzu je možné považovat i místo jejich působení, neboť jsou i OBP obratlovců stejně jako OBP hmyzu produkovány nejvíce v orgánech spojených s vnímáním pachu. Tímto místem jsou postranní nosní žlázy, které se nachází ve velmi těsné blízkosti nosní dutiny, odkud jsou přiváděny k OBP odoranty, feromony a jiné semiochemikálie z vnějšího prostředí (Pevsner & Snyder, 1990).

2.3.3 Chemosenzorické proteiny (CSP)

Chemosenzorické proteiny jsou funkčně příbuzné, ale naopak strukturně odlišné od OBP hmyzu. Jedná se o evolučně starší třídu proteinů hrající roli ve vnímání pachu. Jejich velikost se pohybuje okolo 10-12 kDa (\approx 115 aminokyselin) (Tomaselli et al., 2006; Jia et al., 2021), jsou tedy menší než OBP. Objeveny byly v 80. letech 20. století a brzy po jejich objevu bylo zjištěno, že hrají roli nejen při pachové komunikaci, ale jejich exprese probíhá i mimo tkáň určené ke vnímání pachu (Picimbon et al., 2001).

Struktura CSP je složena z šesti α -helix a vazebné místo je tvořeno podobně jako u OBP nepolárními aminokyselinami s vysokou afinitou k odorantům (Lartigue et al., 2002). Ve struktuře CSP se vyskytují podobně jako u OBP silně konzervované aminokyseliny napříč celou touto proteinovou rodinou. Konzervované cysteiny jsou oproti šesti cysteinům v OBP u CSP pouze čtyři. V rámci primární struktury jsou tyto cysteiny dvě až osm aminokyselin vzdálené, a vytvářejí celkem dvě disulfidické vazby (Angeli et al., 1999). Na rozdíl od disulfidických vazeb v OBP tyto vazby v CSP nemají stabilizační charakter, ale stojí za formováním struktur, které dávají CSP jejich specifickou odlišnost oproti podrodinám GOBP a PBP z rodiny OBP (Angeli et al., 1999)

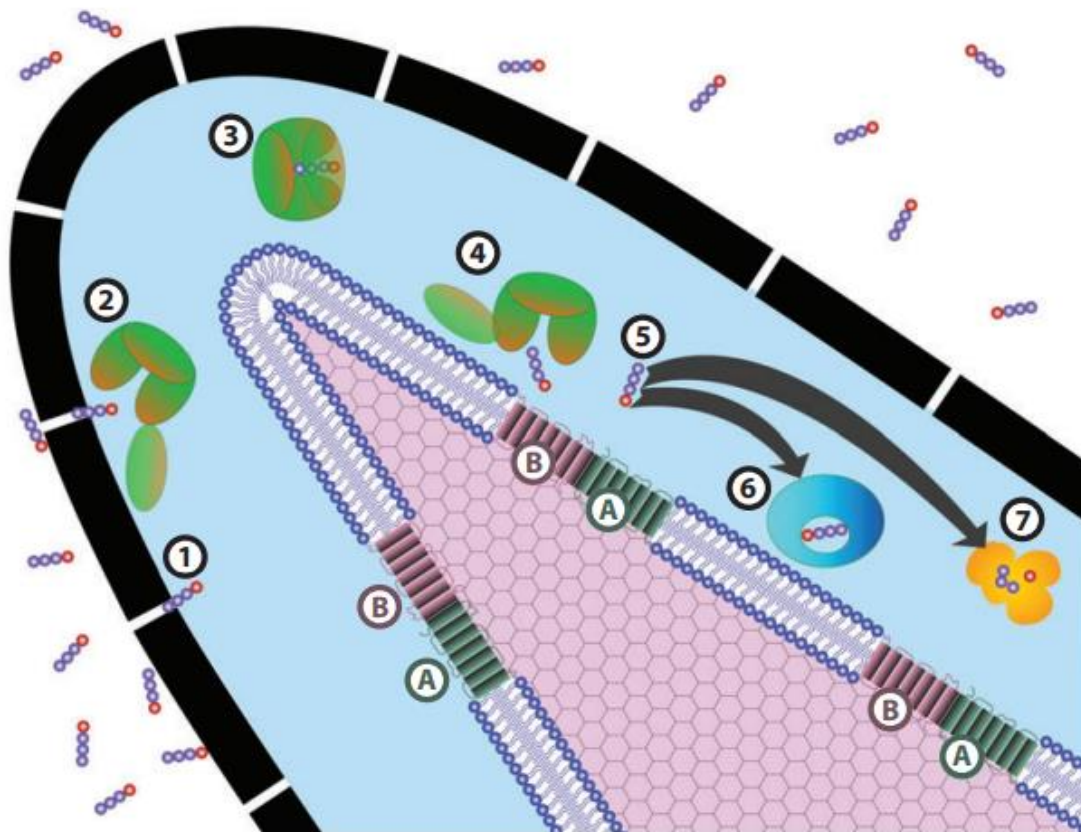
2.4 Funkce OBP

OBP mají v organismech roli transportních přenašečů. Transportovanými látkami jsou většinou hydrofobní molekuly odorantů. Cílovým místem této transportní dráhy jsou pachové receptory (zkráceně ORs z anglického olfactory receptors). Funkce OBP však zdaleka nezahrnuje jen pouhé zprostředkování pachové informace. OBP totiž hrají také významnou roli obecných transportérů i v různých vývojových a fyziologických procesech v životě včely medonosné. (Forêt & Maleszka, 2006).

2.4.1 Transdukce signálu

OBP fungují ve většině případů k transportu hydrofobních molekul. Prostředí v okolí olfaktorických neuronů je totiž obklopeno tzv. sensilární lymfou, ta má díky hlavní složce, kterou je voda, lipofobní charakter. To znemožňuje lipofilním částicím průchod k cílovým neuronům. Zprostředkování pachu OBP tedy probíhá formou transportu (Pelosi, 1996). Proces je založen na několika faktorech. Jedním z hlavních faktorů je hodnota pH. Při relativním porovnání pH může u OBP dojít při vyšším pH k navázání odorantu a vzniku komplexu odorant-OBP, při relativním nízkém pH dojde ke ztrátě afinity odorantu k proteinu, což způsobí jeho vyvázání z komplexu (Leal, 2005). Právě bezprostřední okolí čichových neuronů se vyznačuje kyselejším pH a v jejich okolí tedy dojde k disociaci odorantu a transdukci pachového signálu (Horst et al., 2001)

Prostředí hydrofilního charakteru v okolí čichových neuronů je společné jak obratlovcům, tak hmyzu, a dokonce i chemosenzorickým receptorům u bakterií, což naznačuje, že při vnímání pachu byly evolučně upřednostněny molekuly na bázi OBP, CSP a membránových olfaktorických receptorů, které selektivně váží jednotlivé odoranty či semiochemikálie a které jsou rozpustné ve vodě a váží zejména hydrofobní molekuly (Pelosi, 1996). Procesy popisující mechanismus transdukce pachových signálů byly pojmenovány jako tzv. „perireceptor events“. Tyto procesy zahrnují veškeré interakce mezi OBP v sensilární lymfě a odoranty přístupujícími z vnějšího okolí (Getchel et al., 1984). Procesy chemorecepce jsou stručně znázorněny schématem v obrázku č.1 dle Leal (2013).



Obrázek 1: Schematické znázornění mechanismu olfakce (Leal, 2013): 1) Vstup odorantu skrze póry kutikuly, 2) Vazba odorantu odorant vazebným proteinem, 3 a 4) Přenos vázaného odorantu čichovému receptoru (B + A), 5) Volné odoranty jsou odstraněny dvěma cestami (6) / (7), 6) Odbourávání molekul odorantů cestou odorantové pastí, 7) odorant degradujících enzymů

2.4.2 Některé další funkce hmyzích OBP

OBP nehrají roli jen ve vazbě odorantů či feromonů. Jejich velmi důležitá funkce je např. zachování soudržnosti celého včelího společenstva. Eusociální společenstva si udržují svou integritu právě díky molekulám, jakými jsou OBP a již zmíněné CSP. Mimo včelí společenstvo byly tyto funkce prokázány u dalších eusociálních živočichů, jako jsou např. druhy: mravenci (*Solenopsis invicta*) (Zhang et al., 2016) nebo termity z rodu všekazů (*Reticulitermes speratus*) (Mitaka et al., 2016). Důležité jsou také funkce, které se netýkají čistě pachové komunikace. Mezi tyto funkce náleží zejména vliv na fyziologii jedince v průběhu života, což hraje roli při rozdělení jednotlivých úkolů v rámci kastovního systému. A dále pak také funkce transportních proteinů interagujících s čichovými senzory spřaženými s G-proteinem, jako součást signálních drah (Broeck, 2001).

V rámci genomu *Drosophila melanogaster* byly objeveny geny kódující OBP spřažené s G-proteinem, které jsou exprimovány jednotlivými olfaktorickými neurony, přičemž exprese těchto proteinů je tkáňově specifická. Tyto proteiny mají charakter 7-transmembránových receptorů (tzv. 7TMs z anglického seven-transmembrane proteins), což vyjadřuje jejich strukturu tvořenou sedmi α -helix. K expresi těchto OBP dochází v tykadlech nebo v čelistních makadlech (*palpus maxillaris*). Aktivaci těchto receptorů dochází k aktivaci signální dráhy založené na disociaci α , β a γ podjednotek G-proteinu. Na jednotce α dochází k hydrolyze GTP na GDP, v důsledku čehož disociuje jednotka G_α a $G_{\beta\gamma}$ z původního receptorového komplexu. Disociované podjednotky poté indukují signály vysílající informaci o daném pachu do mozku (Broeck, 2001).

2.5 Exprese OBP

Geny zodpovědné za expresi OBP se u různých druhů hmyzu značně odlišují. Obecně lze ale říct, že u hmyzu je zastoupení genů kódujících OBP značně rozmanitější než u obratlovců a zastoupení CSP je oproti tomu ve většině případů skromnější. Genom obratlovců naopak obsahuje malý počet genů kódujících OBP, ale naopak velké množství CSP. (Steinbrecht, 1998). Zastoupení OBP u některých hmyzích druhů je znázorněno v tabulce č. 1.

Tabulka 1: Zastoupení OBP a CSP u některých druhů hmyzu

Druh	OBP	CSP	Zdroj
<i>Drosophila melanogaster</i>	51	4	(Hekmat-Scafe et al., 2002)
<i>Anopheles gambiae</i>	69	8	(Mastrobuoni et al., 2013)
<i>Apis mellifera</i>	21	6	(Forêt & Maleszka, 2006)
<i>Solenopsis invicta</i>	12	18	(González et al., 2009)
<i>Bombyx mori</i>	44	20	(Gong et al., 2009); (Gong et al., 2007)
<i>Reticulitermes aculabialis</i>	10	6	(Saba et al., 2022)

V rámci genomu *A. mellifera* bylo identifikováno celkem 21 genů kódujících OBP, jejichž značení a identifikační kódy dle databáze NCBI (National Center for Biotechnology Information – Národní centrum pro biotechnologické informace) jsou uvedeny v tabulce č. 2. Díky znalosti celkového genomu *A. mellifera*, který byl rozklíčován v roce 2006, bylo také objeveno 6 genů kódujících CSP u včely medonosné ("Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*", 2006). Vzhledem k tomu, že pro identifikaci těchto genů byly použity primery specifické pro OBP geny naprogramované na základě znalosti celého genomu, nepředpokládá se, že by došlo k objevu dalších OBP kódujících genů (Forêt & Maleszka, 2006).

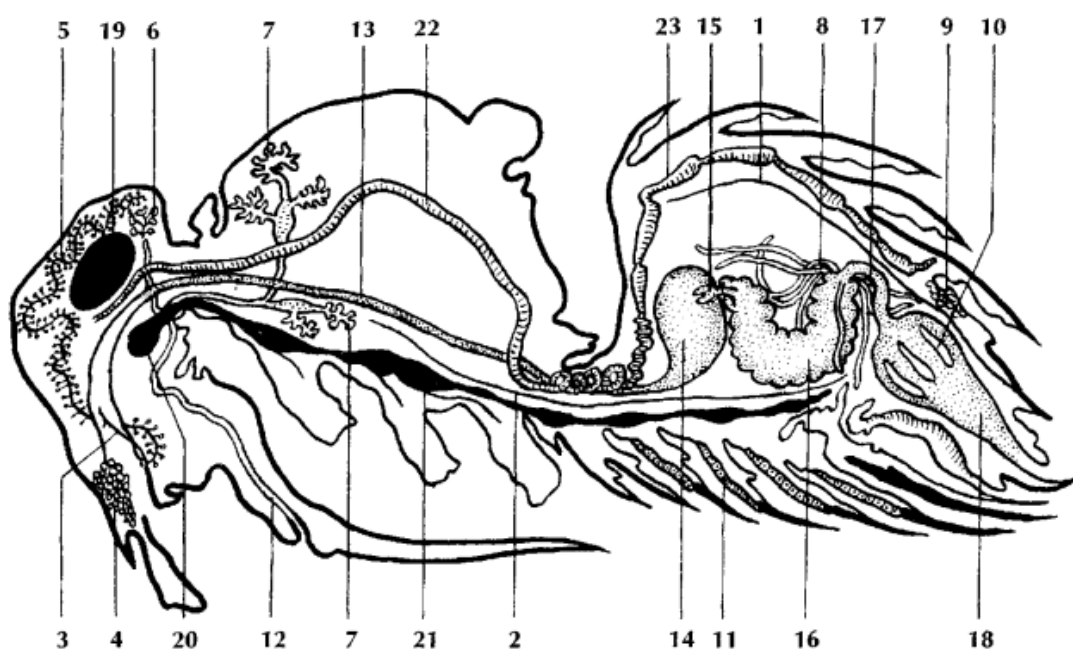
Tak jako každý protein, jsou i OBP exprimovány proteosyntetickým aparátem buňky s ohledem na její příslušnost k určité tkáni v rámci organismu. Geny kódující OBP jsou, až na výjimky *Obp1*, *Obp9* a *Obp12*, které jsou umístěny samostatně, uložené v DNA v klastrech poblíž sebe (Forêt & Maleszka, 2006; Yuan et al., 2015), podobně jako u *Drosophila melanogaster*, což usnadňuje buňce cíleně exprimovat více různých specifických OBP v případě, že organismus reaguje např. na pachový podnět (Hekmat-Scafe et al., 2002).

Tabulka 2: Geny kódující včelí OBP dle (Forêt & Maleszka, 2006) a databáze NCBI

Gen	ID dle NCBI	Gen	ID dle NCBI	Gen	ID dle NCBI
<i>Obp1</i>	406102	<i>Obp8</i>	100328592	<i>Obp15</i>	677664
<i>Obp2</i>	406103	<i>Obp9</i>	677675	<i>Obp16</i>	551719
<i>Obp3</i>	677671	<i>Obp10</i>	410068	<i>Obp17</i>	552478
<i>Obp4</i>	406101	<i>Obp11</i>	677676	<i>Obp18</i>	677677
<i>Obp5</i>	406100	<i>Obp12</i>	677678	<i>Obp19</i>	677665
<i>Obp6</i>	406109	<i>Obp13</i>	677674	<i>Obp20</i>	677672
<i>Obp7</i>	677668	<i>Obp14</i>	677673	<i>Obp21</i>	551935

2.5.1 Anatomie včely medonosné

Tělo včely medonosné je složeno z mnoha orgánů a různých typů tkání. Vnitřní orgány jsou kryty odolnou kutikulou zvnějšku hustě porostlou chlupy. Kutikula včely je mimo to, že formuje skelet včely, také součástí nespecifické imunity a zabraňuje vstupu patogenů dovnitř těla. Tělo je členěno na tři hlavní části – hlavu (*caput*), hrud' (*thorax*) a zadeček (*abdomen*). Na hlavě jsou umístěny orgány související zejména s vnímáním okolního světa prostřednictvím chemorecepce např. formou studovaných OBP (tykadla a ústa) a ostatní orgány, jako složené oči nebo senzitivní trichomy. Hrud' včely je dále členěna na tři části, z nichž každá nese jeden pár nohou. Druhý a třetí pár nohou jsou speciálně uzpůsobeny pro sběr pylu. Dvě zadní části hrudi nesou každá jeden pár blanitých křídel ovládaných křídelními svaly (Obr. č. 2)(Veselý, 2003). V těchto svalech dokáže včela intenzivně spalovat energii bez konání práce a produkuje tak teplo, což je důležité zejména pro přezimování včelstva v průběhu zimního období (Esch, 1960). Většina důležitých orgánů je pak uložena v zadečku, kde se nachází pro život nezbytné orgánové soustavy. Skelet zadečku je tvořen propojenými tergity (Veselý, 2003).



Obrázek č. 2: Anatomie včelího těla (Veselý, 2003) str. 16: 1-dorzální diafragma, 2-ventrální diafragma, 3-vnitřní dolní pysk, 4-kusadlová žláza, 5-hltanová žláza, 6-slinná žláza, 7-slinná žláza v hrudi, 8-Malpighiovy trubice, 9-Nasonova žláza, 10-rektální žlázy, 11-voskové žlázy, 12-vývod slinné žlázy, 13-jícen, 14-medný váček, 15-česlo, 16-žaludek, 17-tenké střevo, 18-konečník, 19-mozek, 20-podjícnová ganglia, 21-hrudní ganglia, 22-aorta, 23-srdce

Včela medonosná je eusociální hmyzí druh s kastovním systémem, v němž je dodržování rolí každým z jedinců hlavní podmínkou pro přežití celého včelstva. Klíčovým jedincem pro přežití je včelí matka, za ní stojí tisíce dělnic, na nichž je postaven osud celé kolonie, a v poslední řadě neméně důležití trubci zodpovědní především za předání genetické informace při páření s matkou. Vývoj včely začíná vajíčkem. Z oplozených vajíček se vyvíjejí samice (sterilní dělnice nebo produktivní matky v závislosti na typu stravy larvy) a z neoplozených haploidní samci (trubci). Z vajíčka vyrůstá larva, předkukla, kukla a nakonec dospělec (imago) (Veselý, 2003).

2.5.2 Vliv vývojového stádia a pohlaví na expresi OBP

Vývojové stádium včely medonosné (*A. mellifera*) hraje roli v expresi OBP stejně tak jako pohlaví či kastovní příslušnost v rámci včelstva. Při studiu několika druhů hmyzu bylo objeveno, že samci disponují mnohonásobně větším počtem OBP ze třídy feromony vázajících proteinů a specifických olfaktorických neuronů (Shanbhag et al., 2001). Naopak včelí matky mají z celého včelstva nejmenší počet čichových receptorů oproti velkému množství produkovaných hormonů. Tento rozchod v chemoreceptci mezi pohlavími je vysvětlován vysokou potřebou trubce vypátrat včelí matku při snubním letu, a naopak redukce čichového ústrojí u matky vyplývá z významnosti jejího postavení, jelikož matka je producentem feromonů udržujících pospolitost včelstva a zároveň není díky sníženému množství olfaktorických receptorů vystavena příliš velkému chemoreceptivnímu tlaku ze svého okolí (Abdelmegeed & G., 2015).

V průběhu života dochází ke změnám v expresi OBP. Ve stádiu vajíčka je exprese OBP minimální. V larválním stádiu vývoje dochází k nejsilnější expresi u OBP14, v menší míře jsou produkovány OBP13 a OBP15. U včelích dělnic dochází k expresi téměř všech OBP s výjimkou OBP13 a OBP15 a relativní exprese OBP14 je mnohem menší, než tomu je u larvy. Toto minimálně poukazuje na skutečnost, že OBP13, OBP14 a OBP15 hrají důležitou roli v životě larvy. Mladé matky a dělnice sdílejí rovněž silnou expresi OBP13 a některých dalších OBP. U létavek, 2 roky starých matek a trubců dochází k výrazné expresi OBP21 a některých CSP a dalších OBP (Iovinella et al., 2011).

Trubci a dělnice produkují v tykadlech také tykadlově specifické proteiny (Antennal-Specific Proteins – ASP) z podrodiny feromony vázajících proteinů (PBP), které se vyznačují afinitou k mateřským feromonům. Vyšší míru exprese těchto PBP vykazují trubci. Jejich role je důležitá v udržení jednoty včelího společenství, ale také v procesu dospívání jedince (Danty et al., 1999; Pesenti et al., 2008).

2.5.3 Tkáňová exprese OBP

OBP jsou exprimovány v největší míře v okolí dendritů olfaktorických neuronů do sensilární lymfy. Nejčastějším místem exprese OBP jsou orgány zaměřené na vnímání pachu, u včel a všech ostatních druhů hmyzu jsou to tedy primárně tykadla (Vogt & Riddiford, 1981; Silva et al., 2021). Z celkových 21 genů kódujících OBP je v tykadlech v signifikantně větší míře exprimováno devět z nich (*Obp1*, *Obp2*, *Obp4*, *Obp5*, *Obp8*, *Obp11*, *Obp12*, *Obp15* a *Obp21*). Při uvážení, že se do procesů vnímání pachu zapojují i ostatní proteiny, které nejsou specifické jen pro tykadla, ale exprimují se i v ostatních tělních částech, se na procesu vnímání pachu podílí celkem 16 OBP (Forêt & Maleszka, 2006). Ostatní OBP exprimovány mimo tykadla, tedy exprimované v jiných místech než v místech spojených s vnímáním pachu, jsou k nalezení v tělních částech jako např. v zažívacího systému, ve kterém mohou dle předpokladů OBP hrát roli při přenosu hydrofobních molekul. Chuťové buňky fungují, podobně jako buňky čichové, na základě chemorecepce. Role OBP při vnímání chuti byla pozorována u *D. melanogaster* v labellu a některých částech noh, křídel, hlavy nebo zadečku (Yasukawa et al., 2010; Yuan et al., 2015). OBP exprimované ve všech tělních částech dospělých včel jsou: OBP3 (mimo tykadla), OBP16, OBP17, OBP18, OBP19, OBP20 a OBP21 (Forêt & Maleszka, 2006).

Tykadla, jež jsou hlavním místem exprese OBP obsahují velké množství čichových neuronů. Tyto neurony jsou umístěny v sensilách (jemných vláskovitých strukturách čichového epitelu) a skrze axony vedoucí až do mozku tak propojují nervový systém s okolním světem. Prostor mezi dlouhými výběžky čichových neuronů a kutikulou oddělující vnitřní prostředí od okolního světa je vyplněn sensilární lymfou. Tyto neurony jsou obklopeny podpůrnými buňkami (Trichogen, Tormogen a Thecogen) v nichž rovněž probíhají perireceptorové jevy (Ha & Smith, 2022)

2.5.4 Vliv infekce DWV na expresi OBP

V posledních letech byly zaznamenány hromadné kolapsy včelstev vlivem infekčního onemocnění varroózy, přičemž toto onemocnění je kombinací napadení včelích kolonií roztoči a virovými onemocněními, zároveň také náleží podíl na kolapsech včelstev negativním účinkům některých používaných pesticidů (Neumann & Carreck, 2015; Goulson et al., 2015; Sánchez-Bayo et al., 2016; Brodschneider et al., 2016). Virus deformovaných křídel (Deformed Wing Virus – DWV) je, zejména vinou roztoče kleštíka včelího (*Varroa destructor*), jednou z hlavních příčin kolapsu včelstev (Bowen-Walker et al., 1999).

Roztoč *V. destructor* napadá včelí larvy a živí se sáním jejich hemolymfy. Tímto roztoč včelí larvu nejen oslabuje, ale zároveň také umožní mnoha patogenům dostat se právě skrze narušené místo v kutikule do včelího organismu. Většina případů vzniku infekce DWV má příčinu právě v přímém přenosu z roztoče na včelu. Existují však jiné způsoby, jakými virus DWV infikuje včelí organismus. Takovým způsobem je např. infekce přenášená se při trofalaxi, což je specifické chování eusociálního hmyzu a jde o vzájemné předávání potravy mezi jedinci určité komunity (Posada-Florez et al., 2020). Mimo kleštíka včelího parazitují na včele medonosné i ostatní druhy tohoto roztoče, jako např. kleštík Jakobsonův (*Varroa jacobsoni*) (Fries et al., 2015).

Virus deformovaných křídel indukuje ve fyziologii včely negativní změny v proteomickém složení. Mezi takové změny se řadí i ovlivňování genetické exprese OBP, které byly pozorovány zejména u OBP2, OBP5, OBP11 a OBP12, jejichž relativní exprese u cíleně infikovaných včelstev virem deformovaných křídel významně poklesla ve srovnání s kontrolní skupinou. (Silva et al., 2021). Na expresi mnoha dalších genů kódujících jiné proteiny má onemocnění včelstva taktéž znatelný dopad. Bylo zjištěno, že různá onemocnění mají různě devastující charakter na včelí fyziologii. Nejzávažnější se však jeví právě kombinace infestace roztočem *V. destructor* (varroózou) a nákazy DWV (Erban et al., 2019).

2.6 OBP a hmyzí imunita

Hmyzí imunita je ve srovnání s imunitou obratlovců mnohem jednodušším systémem. Zakládá se pouze na vrozené (nespecifické) složce imunitního systému, kdežto imunita obratlovců se skládá jak z imunity vrozené, tak i z imunity získané (specifické), která reaguje velmi specificky na konkrétní patogeny, a i přes některá svá negativa (např. autoimunitní onemocnění, alergie apod.) představuje velmi účinný a silný nástroj při boji proti patogenům (Iriti & Faoro, 2007). Hmyz je však evolučně méně vyspělý, a musí se proto spoléhat pouze na imunitu vrozenou, kterou je možné dále dělit na látkovou (humorální) a buněčnou.

Role imunitního systému začíná již na rozhraní vnějšího prostředí a vnitřního prostředí organismu rozděleného fyzikální bariérou (Tsakas & Marmaras, 2010). U hmyzu reprezentuje tuto bariéru odolná kutikula, která je složena především z polysacharidu chitinu, proteinů, polyfenolů a lipidů (Vincent & Wegst, 2004). Buněčná imunita je zprostředkována hemocyty, které jsou zastoupeny různě specializovanými typy buněk s odlišnými funkcemi, které např. fagocytují cizorodé částice (Ribeiro & Brehélin, 2006).

2.6.1 Imunitní systém včely medonosné

Komplexní systém vrozené imunity včel je založen na několika signálních drahách (Toll-dráha, Imd-dráha a JAK/STAT – dráha), jimiž hmyz, a tedy i včely, mobilizují složky imunitního systému. Toll-dráha funguje na principu transmembránových receptorů, na které se váží cytokinům příbuzné molekuly. Reaguje různě na bakteriální a plísňové patogeny a jejím výsledkem je spuštění transkripce některých antimikrobiálních peptidů. Imd-dráha indukuje transkripci všech antimikrobiálních peptidů (apidaecin 1a, apidaecin 1b, apidaecin 2, abaecin, defensin 1, defensin 2, hymenoptaecin). JAK/STAT-dráha indukuje nadměrnou proliferaci fagocytujících hemocytů (Evans et al., 2006).

Nedílnou složkou včelí imunity je obrana vůči patogenům na úrovni celého sociálního společenstva. To se týká „groomingu“ (vzájemná péče jedinců jednoho společenství nebo kolonie), hygienického chování, což v principu vyjadřuje chování, při kterém jsou včely schopny na základě olfakce vycítit mrtvé či nemocné jedince, ať už se jedná o bakteriální či parazitickou nákazu nebo i jedince, jehož smrt nastala z důvodu podlehnutí infekční nákaze, a v rámci eliminace případné infekce toto tělo odstraní z úlu, a to i v případě již zavíčkované larvy (Milne, 1983).

2.6.2 Včelí choroby

Existuje mnoho nemocí, ohrožujících přežití včelstva. Původci nemocí mohou být viry, bakterie, prvoci, houby a roztoči. V posledních letech se zejména viry řadí mezi nejzávažnější patogeny devastující včelstva. Mezi ty nejzávažnější viry se řadí virus deformovaných křídel (DWV), Kashmir Bee Virus (KBV), virus černání matečniců (BQCV – Black Queen Cell), Sacbrood virus (SBV), způsobující „pytlíčkovitost včelího plodu“, virus akutní včelí paralýzy (ABPV) a mnohé další (Chen & Siede, 2007). Dalšími neméně závažnými onemocněními jsou nosematóza, jejímž původem je houba *Nosema ceranae* (Fries, 2010), mor včelího plodu, jehož původem je bakterie *Paenibacillus larvae* (AFB – American Foulbrood) (Ratnieks, 2015), akarapidóza způsobená roztočikem včelím (*Acarapis woodi*) (Garrido-Bailón et al., 2012) a v neposlední řadě asi nejzávažnější již zmiňovaná varroóza způsobená roztoči *V. destructor* nebo *V. jacobsoni* (Wegener et al., 2016).

Včely si dokázaly vůči některým onemocněním vyvinout rezistenci samy, v jiných případech zase přispělo k vybudování rezistence šlechtění. Šíření chorob také prospěla globalizace, což usnadnilo patogenním původcům infikovat včelstva hojně rozšířená po celém světě vlivem hospodářské činnosti (Ellis & Munn, 2015).

2.6.3 Hygienické chování

U včelstev vyznačujících se hygienickým chováním, které lze prokázat pomocí uznávaného šlechtitelského testu „Mrazem usmrcený plod“, byla pozorována zvýšená změna v expresi OBP (Le Conte et al., 2011). Uvedený šlechtitelský test je prováděn přímo na včelnici, kdy je plást se zavíčkovaným včelím plodem náhle zamražen tekutým dusíkem a následně vrácen zpět do úlu. Po 24 hod je vyhodnocen poměr vyčištěných buněk (zbavených mrtvého plodu) a buněk zavíčkovaných (Spivak & Gilliam, 2015).

Spouštěčem hygienického chování u mnoha eusociálních i samotářských druhů hmyzu jsou, jak bylo zjištěno již dříve, netěkavé nenasycené mastné kyseliny olejová (9(Z)-oktadec-9-enová kyselina) a linoleová ((cis, cis, cis)-oktadeca-9, 12, 15-trienová kyselina) (Gordon, 1983). Tyto látky se neřadí mezi obecné odoranty, ale jedná se o specifické semiochemikálie, látky, jež jsou nositeli specifických informací. Mezi těkavé odoranty silně indukující hygienické chování včel se řadí např. fenylacetát, který je produkován během infekce zvápenatění včelího plodu nebo (Z)-6-pentadekan související s infestací roztočem *V. destructor* (Wagoner et al., 2019).

2.7 Biosenzory na bázi OBP

Vzhledem k vysoké teplotní stabilitě OBP a jejich velmi vysoké citlivosti rozpoznat malá množství látek rozptýlených ve vzduchu se tyto proteiny nabízí jako ideální řešení v otázce nahrazení senzorů na anorganické bázi (oxidy kovů či vodivé polymery), které se svou citlivostí OBP těžce vyrovnají. Použití takovýchto biosenzorů by mohlo uspišit diagnózu závažných onemocnění, ověřit kvalitu potravin nebo jednoduše a rychle měřit úroveň znečištění ovzduší (Barbosa et al., 2018).

Za vazbu odorantu je v molekule OBP odpovědné specifické vazebné místo. To obsahuje jednotky, maximálně nižší desítky aminokyselin interagujících s molekulami odorantů a lze je „vystříhnout“ z proteinu a imobilizovat na vodivý povrch, jako funkční peptid použitelný napří v biosenzorech detekujících plyny (Wu, 2000). Jiné biosenzory mohou nabízet také řešení včasné a rychlé detekce případné kontaminace vody (Dimitratos et al., 2019).

2.8 Metody výzkumu OBP

Studium OBP je založeno na kombinaci několika biochemických, chemických a genetických metod, které ve spojení poskytují komplexní obraz o podstatě a fungování OBP.

2.8.1 Primerový modeling

Tyto metody umožňují elegantní cestou odhalit kvantitativní i kvalitativní zastoupení OBP v rámci živočišných druhů, jedinců či konkrétních tkání. Při pátrání po nových doposud neobjevených OBP se využívá znalosti zmapovaného genomu organismu. U živočišných druhů, jejichž genom byl kompletně zmapován lze pomocí bioinformatických technik selektovat určité sekvence na základě navržených STS (Sequence Tagged Site – sekvenčně označené místo) markerů, cDNA a EST (expressed sequence tags – značky exprimovaných sekvencí) markerů, u nichž se předpokládá výskyt daného genu (Forêt & Maleszka, 2006). EST markery nebo též single-pass cDNA sequences jsou krátké úseky DNA (primery) sekvenované z jednoho směru (ze směru 3' nebo 5') pro jeden gen či předpokládané místo výskytu genu (loci) na chromozomu DNA (Boguski et al., 1993). Od roku 1990 také existuje databáze BLAST (Basic Local Alignment Search Tool – Základní nástroj pro lokalizaci porovnání sekvencí), která funguje jako nástroj vyhledávání genetických sekvencí kódujících hledaný protein formou vytvoření primeru odpovídajícího místu předpokládaného výskytu genu či vyhledávání sekvence genu na základě primární struktury již známého proteinu (*National Library of Medicine*, n.d.).

2.8.2 Izolace nukleových kyselin

Aby mohla být stanovena exprese genů, je nutné zaměřit se na expresi mRNA molekul. Exprimovaná mRNA je nejprve izolována. K izolaci lze využít různých metod – fenol-chloroformová extrakce (Chomczynski & Sacchi, 1987; Toni et al., 2018), adsorpce na silikáty (Parida et al., 2006), izolace pomocí magnetických nanočástic (Min et al., 2014). Exprimovaná RNA je následně převedena pomocí enzymu reverzní transkriptasy (EC 2.7.7.49) na komplementární cDNA (Varmus, 1987).

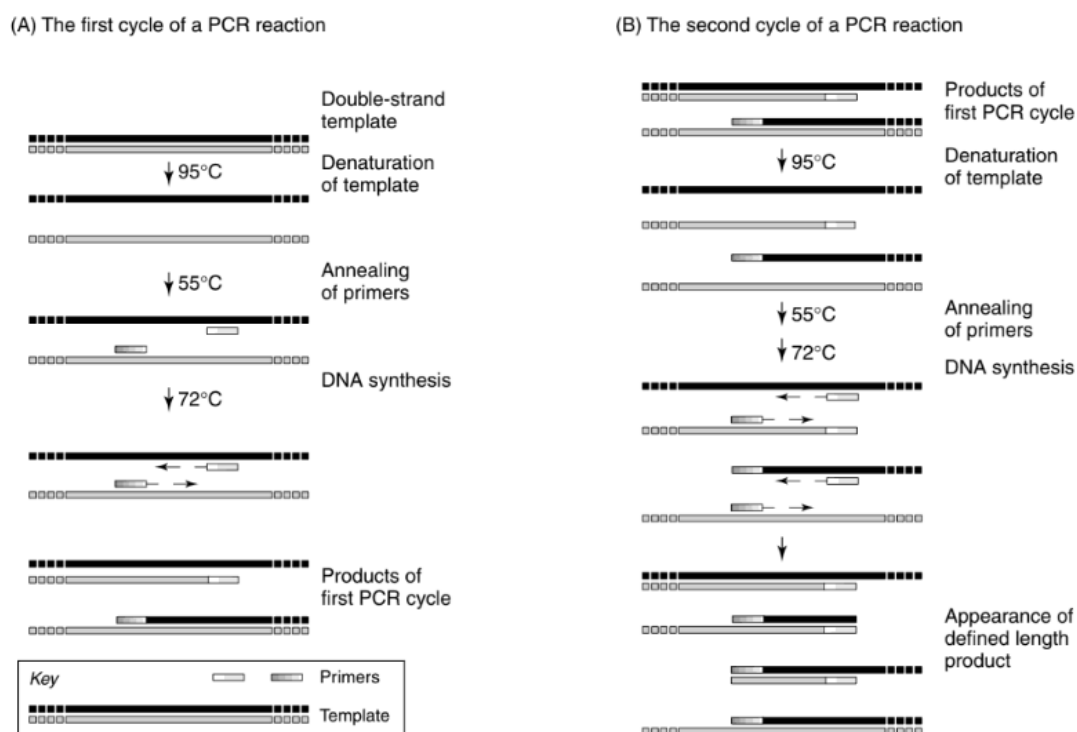
2.8.3 Reverzní transkripce

Při znalosti genových sekvencí jednotlivých OBP kódujících genů lze použít pro studium OBP kombinovanou metodu qRT-PCR (Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction – Kvantitativní reverzní transkripční polymerasová řetězová

reakce v reálném čase). Tato metoda je používána ke stanovení míry genové exprese a využívá popsané metody primerového modelingu (Dorak, 2006).

2.8.4 Polymerázová řetězová reakce

Princip metody využívá základních buněčných mechanismů replikace nukleových kyselin a v případě stanovení genové exprese předchází metody qRT-PCR. Na DNA jsou navázány primery komplementární k hledaným sekvencím. Kvantifikace se provádí značením amplifikovaných úseků (amplikonů). Značení je prováděno buď fluorescenčně formou primerů značených sondou nebo interkalačním barvivem, např. SyberGreen. Fáze qRT-PCR jsou následující: 1. denaturace při teplotě 95 °C (vznik dvou ssDNA z původního templátu dsDNA), 2. annealing (nasednutí primerů) a 3. polymerace. Proces probíhá opakovaně v termocykléru. Výhodami této metody je robustnost, vysoká citlivost a možnost automatizace a přizpůsobení se analyzovanému vzorku (Dorak, 2006; Wang, 2021). Grafické znázornění PCR je demonstrováno na obrázku č. 3 převzatém z knihy s názvem PCR (McPherson & Moller, 2006).



Obrázek č. 3: Mechanismus PCR dle (McPherson & Moller, 2006) – (A) první cyklus, sestupně: denaturace, annealing, polymerace; (B) druhý až 35. cyklus opakování prvního cyklu – při dostatečné koncentraci definovaného úseku je detekován produkt

2.8.5 Strukturní analýza OBP

Pro určení struktury proteinů již dnes existují rovněž velmi spolehlivé a elegantní metody, jako tomu je u molekulárně-biologických metod. Jednou z, v posledních letech nejrozšířenějších, analytických metod využívaných ke studiu proteinů, peptidů či jiných organických molekul je metoda hmotnostní spektrometrie (MS – Mass Spectroscopy) v kombinaci s kapalinovou chromatografií (HPLC – High Performance Liquid Chromatography), která umožňuje účinné rozdělení komplexních vzorků na jednotlivé složky, které lze separovaně analyzovat. Metoda hmotnostní spektrometrie umožňuje určit hmotnost, posttranslační modifikace nebo aminokyselinové složení analyzovaného proteinu. Existuje mnoho variant provedení MS, přičemž mezi základní rozdělení variant provedení se řadí způsob ionizace analytu: metoda ionizace elektrosprejem – ESI (Electro Spray Ionization) a metoda desorpce/ionizace s asistencí matrice – MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization). (Domon & Aebersold, 2006).

Mezi metody sloužící k rozklíčování prostorové struktury se řadí zejména rentgenová strukturní krystalografie. Metoda vyžaduje pracnou krystalizaci čistého proteinu. Po získání čistého krystalu proteinu je sledována difrakce RTG záření na soustavě atomových rovin v krystalu. K realizaci metody jsou používány Synchrony (Kratochvíl et al., 2008). Pomocí této metody bylo zmapováno již několik OBP a CSP (Lartigue et al., 2002; Spinelli et al., 2012; Ziembra et al., 2013; Drakou et al., 2017; Jia et al., 2021).

2.8.6 Proteinová purifikace

Purifikace proteinů je klíčová pro zjištění jejich prostorového uspořádání a funkce v rámci fyziologie organismu. Metod purifikace proteinů je celá řada, nejčastěji používanými jsou metody studia proteinů vyskytujících se ve svém přirozeném prostředí, metody studia proteinů produkovaných rekombinantním způsobem vnesením genů do vhodných mikroorganismů, anebo zkoumání celého proteomu neboli složitých směsí proteinů najednou s využitím znalosti genomů příslušných organismů (Ward & Swiatek, 2009).

Purifikace proteinů z jejich přirozeného prostředí bývá komplikovaná a používá se pro ni např. metoda tandemové afinitní purifikace (TAP). Tato metoda umožňuje získat velmi čistý vzorek proteinu a jak vyplývá z názvu, je tvořena dvěma kroky. V prvním kroku dojde k navázání proteinu na určitou částici s vysokou afinitou k danému proteinu, kterou je nejčastěji protilátka nebo jiný interakční partner. Volba

takovéto částice je závislá na strukturních a funkčních vlastnostech proteinu. Následně se směs proteinů promyje a celý komplex se ve druhém kroku naváže znovu na již specifickou vazebnou částici. Po provedení obou kroků se ke směsi přidá specifická TEV proteasa (Tobacco Etch Virus protease – proteasa viru tabákového leptání EC 3.4.22.44) (Raran-Kurussi et al., 2017), tím dojde k uvolnění cílového proteinu z komplexu s protilátkou nebo jiného interakčního partnera, produkt je následně inkubován s kuličkami potaženými kalmodulinem v přítomnosti vápníku, čímž dojde k odstranění TEV proteasy a po promytí je uvolněna i vazebná částice pomocí chelatačního činidla EGTA (ethylenglykol-bis-(2aminoethyl)tetraoctová kyselina) a je získán vzorek čistého proteinu (Rigaut et al., 1999).

Ze skupiny OBP již bylo purifikováno několik OBP obratlovců a OBP hmyzu. Tyto OBP jsou využívány ke studiu jejich struktur (BIGNETTI et al., 1985; Dal Monte et al., 1991). V jiných případech jsou tyto proteiny využívány ke konstrukci OBP-biosenzorů (Dimitratos et al., 2019)

2.8.7 Elektroantenografie (EAG)

Tato metoda byla vyvinuta speciálně pro výzkum pachových schopností hmyzu měřením potenciálu reagujících buněk hmyzích tykadel. Zpočátku byla tato metoda využívána hlavně pro analýzu hmyzích feromonů, v současné době se EAG hojně využívá ke stanovení citlivosti OBP na různé odoranty (Patricio et al., 2004). Princip spočívá v umístění tykadla včely mezi dvě duté skleněné elektrody naplněné elektrolytem. Referenční elektroda je připojena u kořene tykadla a elektroda zaznamenávající signál je umístěna u vrcholu tykadla, jehož špička bývá pro zlepšení síly signálu zastřižena. Zkoumaný odorant je pak rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle, nanesen na filtrační papír, ze kterého je hnacím plynem proháněn přes tykadlo. OBP v tykadle následně reagují s odoranty, v olfaktorických neuronech vzniká signál a vkládáním elektromotorického napětí do systému vzniká elektrofyziologická odpověď, která je zaznamenána (Patricio et al., 2004; Torto et al., 2015). Z výsledků je pak možné určit jednak schopnost různých odorantů či feromonů stimulovat fyziologickou odpověď reakcí s OBP (Zhao et al., 2021) anebo v případě, že je známa schopnost daného odorantu stimulovat čichové receptory, je možné sledovat změny v expresi OBP způsobené vlivem např. infekcí DWV, jak bylo demonstrováno za použití éterických olejů z máty a eukalyptu (Silva et al., 2021).

3 PRAKTICKÁ ČÁST

Tato bakalářská práce si klade za cíl stanovit relativní genovou expresi genů kódujících některé OBP včely medonosné pomocí metod molekulární biologie. Práce se soustředí na změny v jejich expresi vyvolané infestací roztočem kleštíkem včelím (*V. destructor*).

3.1 Materiál a vybavení

Veškerý biologický materiál, chemikálie a přístrojové vybavení použité pro potřeby této bakalářské práce byly poskytnuty vedoucím práce a katedrou biochemie, stejně tak jako poučení o principu použitých metod.

3.1.1 Biologický materiál

Pro potřeby bakalářské práce byly použity vzorky ze včelstev vykazujících příznaky varroózy a vzorky kontrolních včelstev bez příznaků. Odběr včel proběhl 15. 8. 2019 na včelnici na Kývalce u Rosic. Včelstva kontrolní nevykazovala známky infestace kleštíkem včelím. Včely experimentální pocházely ze včelstva silně infestovaného kleštíkem včelím.

3.1.2 Chemikálie

100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Forward/Reverse primer (*EFl-alpha*) – SigmaAldrich (Německo)

100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Forward/Reverse primer (*Obp3/Obp14/Obp17/Obp21*) – nově navrhla Dr. Škrabišová, Katedra biochemie, PšF UP

GITC pufr – housemade

GoTaq® DNA Polymerase M3008 – Promega Corporation (USA)

Guanidine isothiocyanate 3720 – P-lab (Česká republika)

iScript cDNA Synthesis kit 1708891 – BioRad (USA)

Midori Greed Advance DNA Stain – Biotium (USA)

NucleoSpin RNA plus (250 preps) 74904 – Macherey Nagel (Německo)

PCR Markers – Promega Corporation (USA)

PCR voda – Macherey Nagel (Německo)

RNase-free voda – Macherey Nagel (Německo)

SeaKem® LE Agarose 50004 – Lonza (Švýcarsko)

SYBR™ Select Master Mix 4472908 – ThermoFisher scientific (USA)

TAE pufr – housemade

3.1.3 Materiál a přístrojové vybavení

1,5ml sterilní zkumavky (LoBind) – Eppendorf (Německo)
2ml sterilní zkumavky (LoBind) – Eppendorf (Německo)
Centrifuga 5424 R – Eppendorf (Německo)
Centrifuga MSC-6000 – Biosan (USA)
Centrifuga na PCR desky – VWR Corporation (USA)
DNA/RNA UV-Cleaner (UVC/T-M-AR) – Biosan (USA)
Dřevěné prkénko
Elektroforetická vana – BioRad (USA)
Erlenmeyerova baňka
Extraction Bags „Universal“ 430100 – Dynex Technologies (USA)
Gel DocTM EZ Imager – BioRad (USA)
Mikrovlánná trouba NN-E201 WM – Panasonic Corporation (Japonsko)
Minicentrifuga MPW-15 – MPW Med. Instruments (Polsko)
MiniMix 100 W CC – Interscience (Francie)
Nitrilové rukavice na jedno použití
NucleoSpin RNA plus kit – Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Německo)
Pinzeta
Pipety s nastavitelným objemem (Eppendorf)
Předvážky 440-35N – Kern (Německo)
Reader H1 – Synergy (USA)
Sealing Tape optically clear 95.1994 – Sarstedt AG & Co. KG (Německo)
Sterilní špičky bez filtru pro nastavitelné pipety – East Port Praha s.r.o. (Česká republika)
Sterilní špičky s filtrem pro nastavitelné pipety – East Port Praha s.r.o. (Česká republika)
Stripy – East Port Praha s.r.o. (Česká republika)
Svářečka plastových fólií KF 200 H – KUDA PACKAGING (Česká republika)
Take3 destička – Synergy (USA)
Thermal cycler CFX96TM Real-Time Systém – BioRad (USA)
Thermal Cycler T-100 – BioRad (USA)
Tlouček
Twin.tec PCR plate 96, skirted 0030129504 – Eppendorf (Německo)
Vortex mixer SA8 – Stuart (Velká Británie)
Vortex V1 – Biosan (USA)
Zdroj MBE-150 – Major Science (Tchaj-wan)

3.1.4 Softwarové vybavení

BioRad CFX Maestro – vyhodnocení qPCR

Gene 5 – měření koncentrace a čistoty RNA

JASP 0.17.1.0 – statistické vyhodnocení

Microsoft 365 (Office) – zpracování závěrečné práce

Statistica 14.0.0 EN – statistické vyhodnocení

3.2 Metody

Zpracování biologického materiálu probíhalo v laboratoři určené pro metody molekulární biologie v digestoři sterilizované UV zářením a za dodržení maximálně sterilních podmínek při aseptické práci s nukleovými kyselinami, zejména pak s RNA. Při práci s chemikáliemi bylo postupováno dle jejich bezpečnostních listů.

V rámci praktické části bylo provedeno několik biochemických metod počínaje izolací nukleových kyselin, přes spektrofotometrii, 2D elektroforézu na agarosovém gelu, reverzní transkripci až po polymerázovou řetězovou reakci, jejichž podrobné provedení včetně použitého přístrojového vybavení a použitých chemikálií je popsáno v následujících odstavcích. Vyhodnocení výsledků a matematické ověření jejich relevantnosti bylo provedeno pomocí statistických softwarů Statistica a JASP.

3.2.1 Homogenizace biologického materiálu

Před izolací RNA byly vzorky homogenizovány v přítomnosti GITC pufru, který díky obsahu chaotropní soli GITC (guanidinium isothiokyanát) usnadní precipitaci proteinů. Pufř byl připraven dle tabulky č. 3. a před použitím byl autoklávován (1% β -merkapt ethanol byl přidán po autoklávování).

Homogenizace byla provedena následovně: vždy 5 včelích dělnic odebraných z experimentálních a kontrolních včelstev (pro širší pokrytí biologické variability genové exprese v rámci včelstva) bylo vloženo do Extraction Bags „Universal“ a k biologickému materiálu byly přidány v digestoři 3 ml GITC pufru s obsahem β – merkapt ethanolu. Následně byly extrakční sáčky pečlivě uzavřeny pomocí svářečky plastových fólií a obsah byl homogenizován dvakrát 1 minutu pomocí přístroje MiniMix 100 W CC a tloučkou na dřevěném prkénku.

Tabulka č. 3: Chemikálie pro přípravu 200 ml GITC pufru

Chemikálie	Množství
5,25mol·l ⁻¹ guanidinium isothiokyanát (Mr = 118,12)	124,6 g
50mmol·l ⁻¹ Tris·HCl (Mr = 121,14)	100 ml 0,1mol·l ⁻¹ Tris·HCl
20mmol·l ⁻¹ EDTA	1,169 g
1,3% Triton X-100	2,6 ml
1% β-merkaptoethanol	2 ml
Deionizovaná voda	Doplnění do 200 ml celkového objemu

3.2.2 Izolace nukleových kyselin

Homogenizovaný biologický materiál byl v digestoři přenesen z extrakčních sáčků do 2ml sterilní zkumavky a centrifugován při 16 000×g po dobu 5 minut. Samotná izolace byla provedena pomocí komerčního kitu NucleoSpin RNA plus:

Do 2 ml sterilních zkumavek bylo napipetováno 150 μl *Lysis Buffer* (LBP – lysis buffer protein) a k tomu přidáno 300 μl vzorku v GITC pufru. Směs byla promíchána pipetováním a přenesena na *gDNA Removal Column* umístěnou v 2ml *Collection Tube*. Kolonka byla centrifugována při 11 000×g po dobu 30 s pro odstranění gDNA ze vzorku. Po centrifugaci byla kolonka odstraněna do odpadu a k eluátu bylo přidáno 100 μl *Binding Solution* (BS) a směs byla opět promíchána pipetováním. Celý objem z *Collection Tube* (2ml) byl přenesen na *RNA plus Column* umístěnou v *Collection Tube* (2 ml) a kolonka byla centrifugována při 11 000×g po dobu 30 s. Eluát byl odstraněn do odpadu a na membránu kolonky bylo nanášeno 200 μl *Wash Buffer 1* (WB1) a kolonka byla opět centrifugována 30 s při 11 000×g. Opět byl odstraněn eluát do odpadu a na membránu kolonky bylo napipetováno 600 μl *Wash Buffer 2* (WB2) a kolonka byla znovu centrifugována 30 s při 11 000×g. Následně bylo na membránu kolonky nanášeno ještě 250 μl WB2 a kolonka byla centrifugována 2 minuty při 11 000×g. Znovu byl odstraněn eluát do odpadu, kolonky se vzorky v centrifuze byly otočeny o 180° a prázdné byly znovu centrifugovány 2 minuty při 11 000×g. Následně byly kolonky přeneseny z *Collection Tube* (2ml) do příslušně označených uzavíratelných *Collection Tube* (1,5ml), na membránu kolonky bylo nanášeno 30 μl *RNase-free* vody a kolonka byla centrifugována 1 minutu při 11 000×g. Následně byly kolonky opět otočeny o 180°,

na jejich membránu bylo naneseno znovu 30 μl *RNase-free* vody a byla provedena poslední centrifugace při 11 000 $\times g$ po dobu 1 minuty. Celkový získaný objem RNA byl 60 μl .

3.2.3 Stanovení koncentrace

Po izolaci RNA byla u každého vzorku stanovena koncentrace pomocí spektrofotometrického readeru Synergy microplate reader H1. Spektrofotometr byl řízen z PC pomocí programu Gene 5. Na Take3 destičku byly pipetovány vzorky včetně blanku v duplikátu o objemech 2 μl . Zároveň s měřením koncentrace byla také měřena čistota izolované RNA stanovením poměru absorbancí při 260 a 280 nm, jehož poměr A260/280 se blížil hodnotě „2“. Po stanovení koncentrace jednotlivých vzorků byla jejich koncentrace upravena ve sterilním boxu *RNase-free* vodou na koncentraci 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$.

3.2.4 Kontrola integrity RNA na 1,1% agarosovém gelu

Pro vizualizaci izolované RNA a kontroly, zda v průběhu izolace nedošlo k její degradaci byly všechny vzorky podrobeny elektroforéze na agarosovém gelu. Gel byl připraven z 1,1 g agarosy a 100 ml pracovního 1 \times TAE pufru, který byl připraven ředěním zásobního 50 \times TAE, připraveného dle tabulky č. 4. Následně byla agarosa rozpuštěna v Erlenmeyerově baňce zahříváním v mikrovlnné troubě do úplného rozpuštění. Po ochlazení cca na 60 $^{\circ}\text{C}$ byly přidány 2 μl Midori Greed Advance DNA Stain a po promíchání byl gel nalit do formy. Ztuhlý gel byl umístěn do elektroforetické vany pod hladinu 1 \times TAE pufru.

Tabulka č. 4: Chemikálie pro přípravu 500 ml 50 \times TAE pufru

Chemikálie	Množství
Tris	121 g
Ledová kyselina octová	28,55 ml
0,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA	50 ml
Deionizovaná voda	Doplnit na 500 ml

Do jamek v gelu byly pipetovány 2 μl vzorku s 2 μl *Gel Loading Dye* a 6 μl *PCR-vody*, takže celkový objem vzorku v jamce činil 10 μl . Do krajní jamky gelu byly napipetovány 3 μl *Ladderu* s DNA fragmenty o velikostech 1000 bp, 750 bp, 500 bp, 300 bp, 150 bp a 50 bp. Vzhledem k zápornému náboji nukleových kyselin byly vzorky na gelu umístěny ve směru elektrického pole od záporného pólu (katoda) ke kladnému (anoda). Poté byla elektroforetická vana připojena ke zdroji. Proces elektroforézy trval 60 minut při konstantním napětí 80 V. Integrita RNA byla ověřena pomocí agarosové elektroforézy. Fotografie gelu byla pořízena prostřednictvím přístroje Gel DocTM EZ Imager.

3.2.5 Přepis RNA do cDNA

Po izolaci celkové RNA z biologického materiálu bylo nutné komplementárně převést RNA transkripty do cDNA, aby mohla být pomocí metody qPCR stanovena relativní genová exprese. Přepis RNA do cDNA byl proveden pomocí enzymu reverzní transkriptasy (EC 2.7.7.49), která byla obsahem komerčního kitu iScript cDNA Synthesis kit. 7,5 μl RNA ředěné na 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ bylo v 200 μl zkumavkách smícháno s 2,5 μl reakčního mixu dle pokynů výrobce. Vzorky s reagenциemi byly krátce centrifugovány a vloženy do termocykléru (BioRad, T100). Reakce probíhala dle protokolu v tabulce č. 5.

Tabulka č. 5: Reakční protokol iScript

Krok	Čas [min]	Teplota [°C]
Iniciace amplifikace	5	25
Reverzní transkripce	20	46
Inaktivace reverzní transkriptasy	1	95
Inkubace	∞	4

3.2.6 EndPoint PCR

Po přepisu RNA do cDNA byla u vybraných vzorků provedena kontrola přepisu a kontrola na případnou kontaminaci gDNA. cDNA nebo RNA byla smíchána ve 200 μ l zkumavkách s GoTaq Polymerase premix, 10 μ mol \cdot l⁻¹ Primer F, 10 μ mol \cdot l⁻¹ Primer R a PCR-vodou. Pro tuto reakci byly použity forward a reverse primery *EFl-alpha* a GoTaq polymerasa (EC 2.7.7.7). Reakční protokol EndPoint PCR reakce byl nastaven dle tabulky č. 6. Produkty EndPoint PCR byly vizualizovány na 2,5% agarosovém gelu a vyhodnoceny před qPCR.

Tabulka č. 6: Reakční protokol GoTaq endpoint PCR

Krok	Čas	Teplota [°C]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	2 min	95	1
Denaturace	40 s	95	
Navázání primerů	30 s	60	35
Prodloužení	1 min	72	
Konečné prodloužení	5 min	72	1
Inkubace	∞	4	1

3.2.7 Real-Time qPCR

Pro qPCR byla použita 96jamková mikroleska (Twin.tec PCR plate 96, skirted). Do každé jamky bylo napipetováno 3,4 μ l *Master mixu* připraveného z 0,45 μ l 3,33 μ M Forward primeru, 0,45 μ l 3,33 μ M Reverse primeru a 2,5 μ l *Syber Select Master Mix*. Každý z šesti genů byl měřen v duplikátu. K 3,4 μ l *Master mixu* bylo pipetováno 1,6 μ l vzorku cDNA, takže celkový objem qPCR reakce byl 5 μ l. Termocyklér byl pro tuto qPCR nastaven dle reakčního protokolu v tabulce č. 7:

Tabulka č. 7: Reakční protokol qPCR

Krok	Čas	Teplota[°C]	Počet cyklů
Aktivace AmpliTaq® DNA Polymerasy	10 min	95	1
Denaturace	15 s	95	
Navázání primerů/prodloužení	1 min	60	35
Křivka tání	10 s	60 95,5	0,5 °C/cyklus

3.2.8 Stanovení genové exprese

Ze změřených hodnot Ct byla vypočítána relativní genová exprese *Obp3* (Gene ID: 677671), *Obp14* (Gene ID: 677673), *Obp17* (Gene ID: 552478) a *Obp21* (Gene ID: 551935) zvlášť vzhledem k expresi *EF1-alpha* (Gene ID: 544670) a zvlášť vzhledem k expresi *RPS5* (Gene ID: 409728). Z relativních expresí vztažených na housekeeping geny byly získány výsledné hodnoty relativní genové exprese OBP.

Účinnost primerů byla změřena sestavením kalibrační řady. Kalibrační řada byla sestavena postupným dvojnásobným ředěním směsi všech měřených vzorků. Pro potvrzení výsledků bylo všech šest analyzovaných genů v rámci qPCR vizualizováno na 2,5% agarosovém gelu. Sekvence 5' → 3' použitých primerů a velikosti ampliconů včetně referencí jsou uvedeny v tabulce č. 8.

Tabulka č. 8: Forward (Fw) a Reverse (Rv) sekvence primerů pro měřené geny, velikosti ampliconů a účinnosti genů *EF1-alpha*, *RPS5*, *Obp3*, *Obp14*, *Obp17*, *Obp21*

Gen	Primer 5' → 3'	Velikost ampliconu [bp]	Reference
<i>EF-1 alpha</i>	Fw GGAGATGCTGCCATCGTTAT	153	(Lourenço et al., 2008)
	Rv CAGCAGCGTCCTTGAAAGTT		
<i>RPS5</i>	Fw AATTATTTGGTCGCTGGAATTG	115	(Tesovnik et al., 2017)
	Rv TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA		
<i>Obp3</i>	Fw AATGCTGAGAAAGCGAGGGT	83	nově navrhl Dr. Škrabišová, Katedra biochemie, PřF UP
	Rv TCGACACGTCGAAGACGTTA		
<i>Obp14</i>	Fw TTTGCGTTGGTGCTCTGACAA	117	nově navrhl Dr. Škrabišová, Katedra biochemie, PřF UP
	Rv TGCCTTCAATAACGTCATTTGCT		
<i>Onp17</i>	Fw TCTGCTATTTGCGTTTGCGT	98	nově navrhl Dr. Škrabišová, Katedra biochemie, PřF UP
	Rv GCAGTGCCAATTTCTTTCATGC		
<i>Obp21</i>	Fw TGTGGTCAGAGAAATAGCGGA	98	nově navrhl Dr. Škrabišová, Katedra biochemie, PřF UP
	Rv TCAAATGTATGTCAGCATCAGAGA		

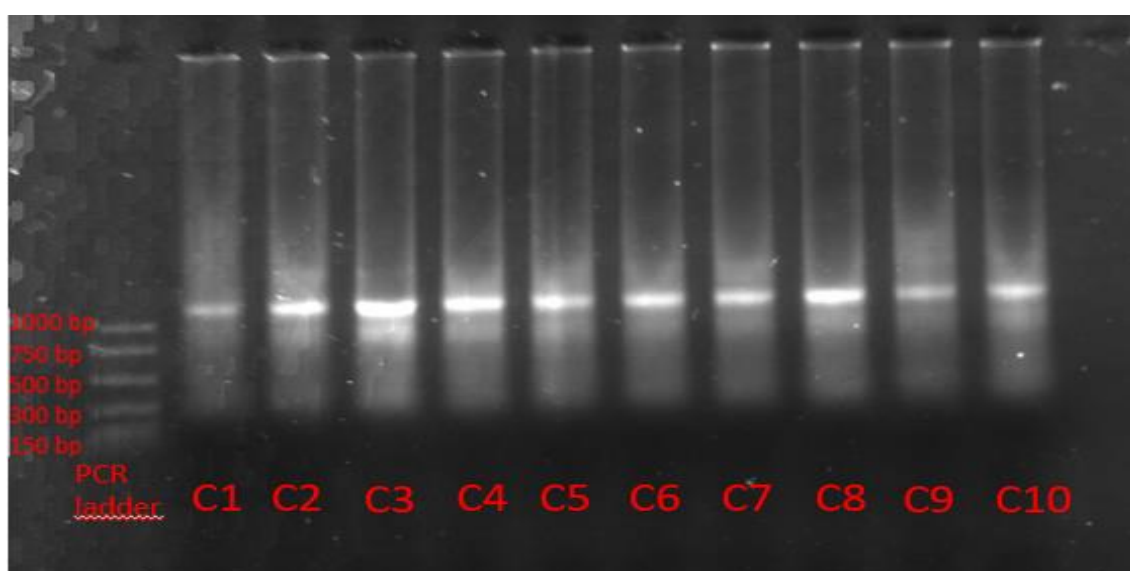
3.2.9 Statistické vyhodnocení

Rozdíly v expresi genů *Obp3*, *Obp14*, *Obp17*, *Obp21* mezi testovanými skupinami byly statisticky hodnoceny t-testem prostřednictvím programů pro statistickou analýzu (Statistica, JASP). Jako relevantní byl výsledek brán v případě, kdy se hodnota „p“ nacházela v rozmezí hladiny významnosti tj. $p \leq 0,05$. Z každého pokusného včelstva bylo připraveno 10 vzorků, přičemž každý vzorek vznikl z homogenátu 5 dělnic.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Zavádění a optimalizace qPCR

Při izolaci RNA z biologického materiálu bylo ve většině případů vzorků, dle výstupu spektrofotometricky změřené koncentrace, získáno velké množství RNA. Čistota byla určena dle poměru absorbancí A_{260}/A_{280} , která je pro RNA ~ 2 (Tabulky č. 9-10). Kontrola integrity na 1,1% agarosovém gelu vyšla pro všechny vzorky, RNA byla intaktní. Vybrané izolované vzorky (včelstvo 73) jsou znázorněny na obr. č 4. Viditelné „bandy“ zastupují celkovou izolovanou RNA, jejíž intaktnost je podložena přítomností velké podjednotky rRNA 28S (2748 bp) (Macharia et al., 2015) a malé podjednotky rRNA 18S (1854 bp) (Ward & Downie, 2005).



Obrázek č. 4: Znázornění kontroly integrity RNA na 1,1% agarosovém gelu

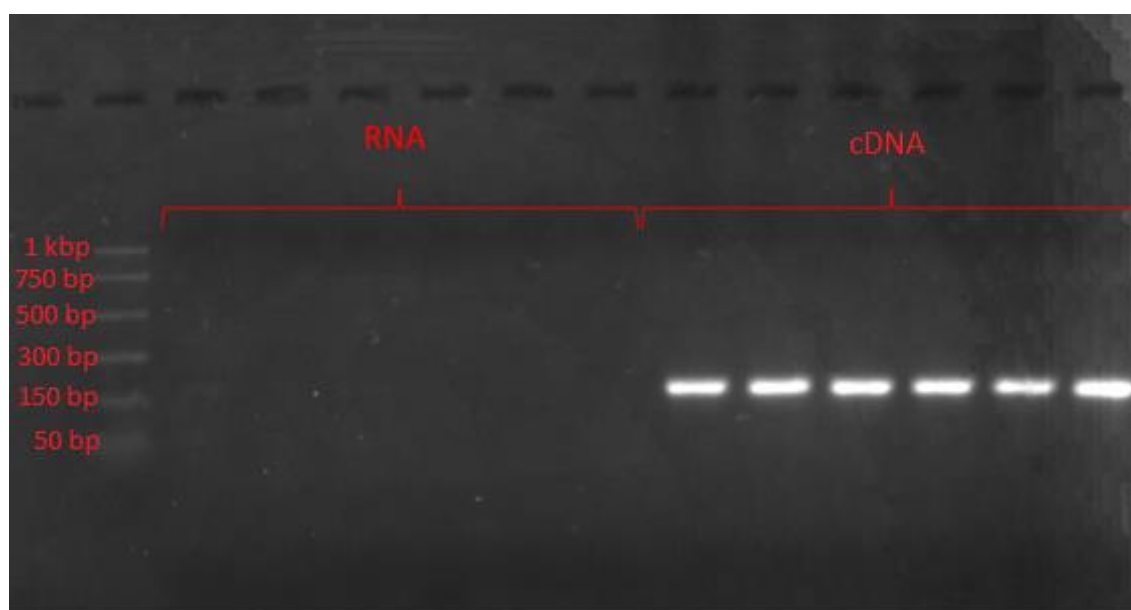
Tabulka č. 9: Průměrné hodnoty koncentrace a čistoty RNA izolované z kontrolních včelstev 73, 71 a 69

Vzorek	Kontrolní včelstva (CTRL)					
	73		71		69	
	A_{260}/A_{280}	c [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	A_{260}/A_{280}	c [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	A_{260}/A_{280}	c [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]
1	2,20	265,94	2,20	572,89	2,22	1050,85
2	2,19	543,88	2,20	729,46	2,20	1018,00
3	2,19	834,42	2,20	556,06	2,20	859,78
4	2,20	531,75	2,20	460,31	2,20	781,66
5	2,19	549,12	2,20	427,10	2,20	779,41
6	2,18	479,28	2,20	440,89	2,20	628,73
7	2,19	462,27	2,18	430,24	2,20	714,79
8	2,18	699,23	2,20	591,45	2,19	721,38
9	2,19	377,14	2,20	725,00	2,20	755,83
10	2,19	525,28	2,19	478,30	2,20	696,96

Tabulka č. 10: Průměrné hodnoty koncentrace a čistoty RNA izolované z experimentálních včelstev 93, 113 a 92

Vzorek	Experimentální včelstva (VD)					
	93		113		92	
	A_{260}/A_{280}	c [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	A_{260}/A_{280}	c [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]	A_{260}/A_{280}	c [$\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$]
1	2,20	878,95	2,21	1288,05	2,21	962,84
2	2,20	912,94	2,21	986,94	2,21	1036,79
3	2,21	1318,93	2,20	898,38	2,20	744,32
4	2,21	910,55	2,19	666,69	2,22	782,86
5	2,20	596,59	2,21	784,01	2,21	726,43
6	2,20	962,40	2,20	910,42	2,21	935,25
7	2,19	695,43	2,20	813,01	2,21	763,09
8	2,21	757,90	2,20	820,14	2,20	668,49
9	2,20	673,46	2,21	923,74	2,21	811,02
10	2,20	619,92	2,20	772,35	2,20	652,61

Kontrola přepisu RNA do cDNA (EndPoint PCR) byla provedena pomocí metody PCR s GoTaq polymerasou a výsledky této PCR byly ověřeny prostřednictvím elektroforézy. Vzorky RNA testované na přítomnost gDNA nevykazovaly na gelu žádný viditelný band, což byl pozitivní výsledek. Naopak vzorky RNA přepisované do cDNA svítily jedním jasně ohraničeným bandem, značícím intaktnost cDNA. Při PCR reakci s GoTaq polymerasou byl použit primer pro gen *EF1-alpha*, jehož velikost ampliconu čítá 153 bp (Lourenço et al., 2008), což odpovídá jednomu jasně viditelnému bandu na přibližné úrovni 150 bp dle PCR markeru, viz obrázek č. 5.

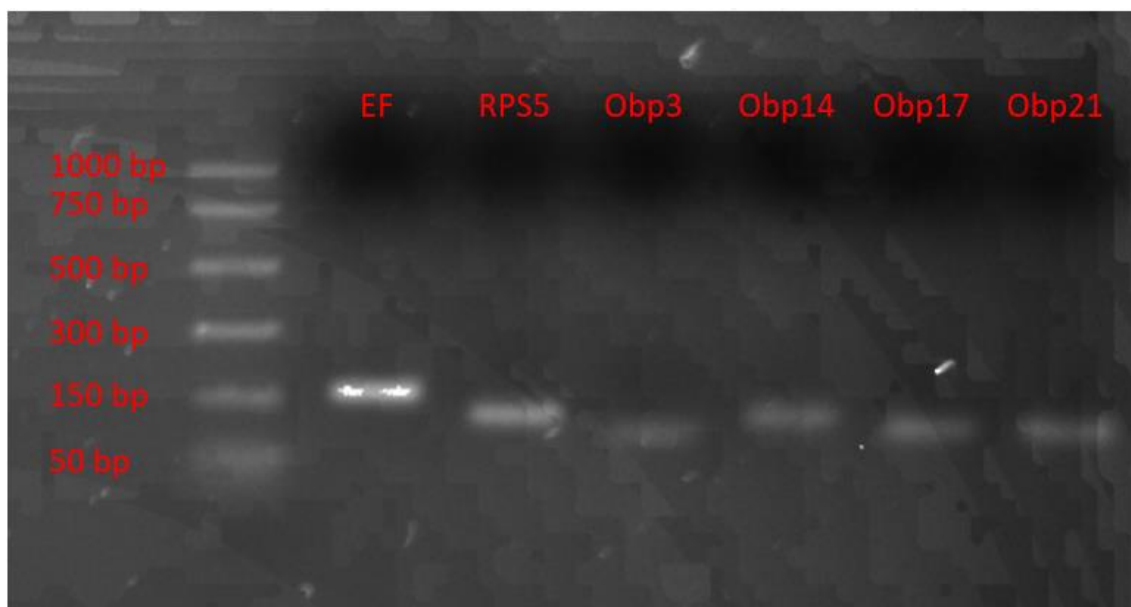


Obrázek č. 5: Kontrola produktů z EndPoint PCR na 2,5% agarosovém gelu

Po kontrole přepisu z RNA do cDNA bylo přistoupeno k samotné Real-Time qPCR. Ta umožnila v reálném čase stanovit na základě měření fluorescence počet cyklů, při kterém byl daný úsek cDNA v závislosti na množství kopií detekován. Hranice detekce signálu (Ct) byla pro každý vzorek zaznamenána a z duplikátu byl vypočítán průměr. Jeden vzorek ve skupině VD 92 vykazoval známky degradace a kontaminace, a tudíž byl před vyhodnocením výsledků vyjmut z analýzy. Pro přibližnou orientaci v měřítku výsledků z qPCR jsou přiloženy maximální a minimální hodnoty Ct a průměrné hodnoty exprese GOI normalizované vůči HKG včetně standardní odchylky pro každý gen s ohledem na kontrolní či experimentální skupinu i na jednotlivá včelstva (tabulka č. 11). Geny *EF1-alpha*, *RPS5*, *Obp3*, *Obp14*, *Obp17* a *Obp21* jsou vizualizovány na obrázku č. 6, velikosti jejich amplikonů, jak je uvedeno v tabulce č.8, odpovídají pro *EF1-alpha* 153 bp, pro *RPS5* 115 bp, pro *Obp3*, pro *Obp14* 117, pro *Obp17* 98 a pro *Obp21* 98.

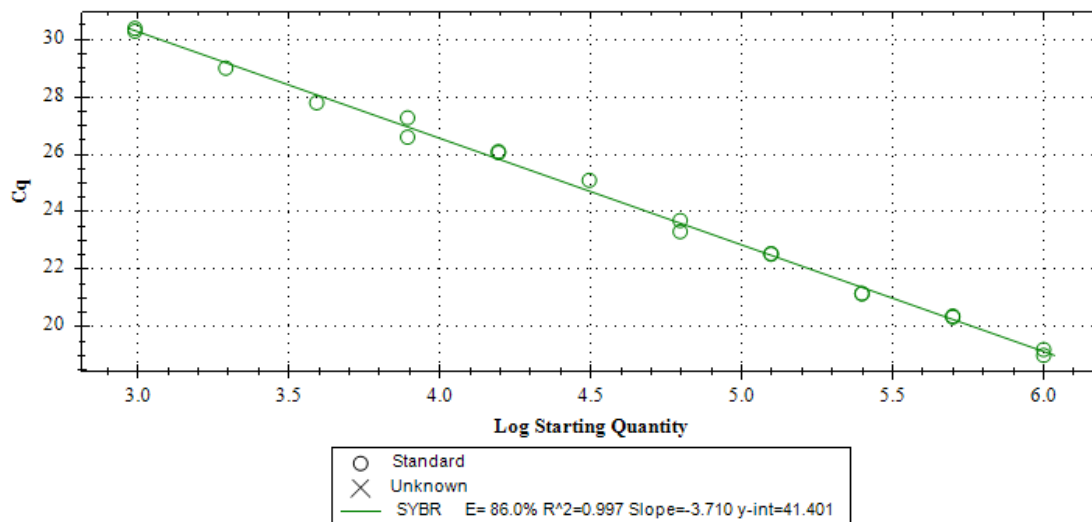
Tabulka č. 11: Počet analyzovaných vzorků použitých při výpočtu relativní genové exprese pro daný gen, minimální a maximální hodnoty HKG/GOI, průměrné hodnoty HKG/GOI včetně standardní odchylky

	<i>Obp3</i>		<i>Obp14</i>		<i>Obp17</i>		<i>Obp21</i>	
	CTRL	VD	CTRL	VD	CTRL	VD	CTRL	VD
Počet vzorků	30	30	30	30	30	30	30	29
Vyřazené z analýzy	0	0	0	0	0	0	0	1
Průměr	2.611	3.539	1.347	1.937	0.537	0.685	1.082	1.301
Std. odchylka	1.863	1.159	0.716	0.919	0.172	0.141	0.278	0.233
Minimum	0.634	1.581	0.462	0.762	0.028	0.376	0.582	0.832
Maximum	6.799	5.444	3.970	4.184	1.008	0.972	1.791	1.865

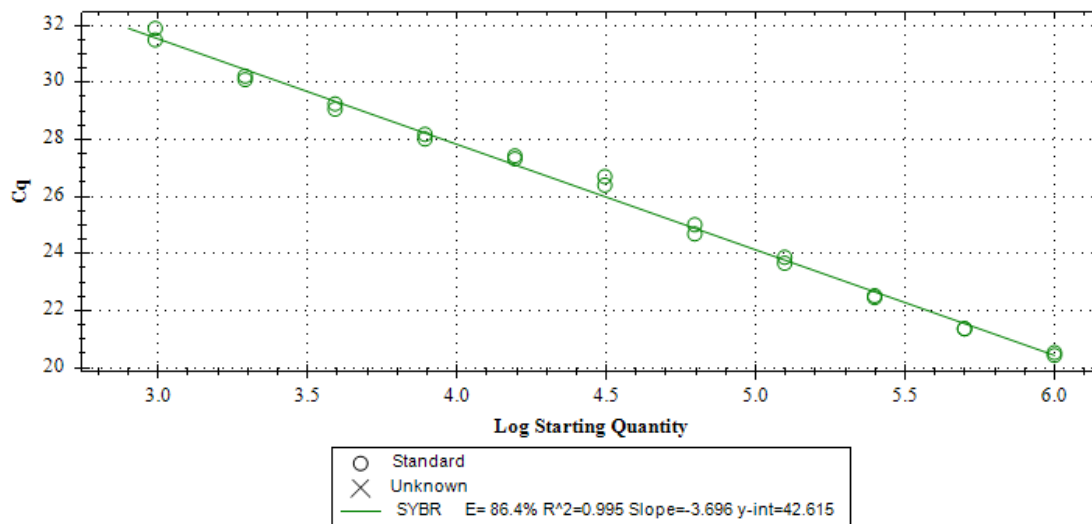


Obrázek č. 6: Vizualizace genů *EF1-alpha*, *RPS5*, *Obp3*, *Obp14*, *Obp17* a *Obp21*

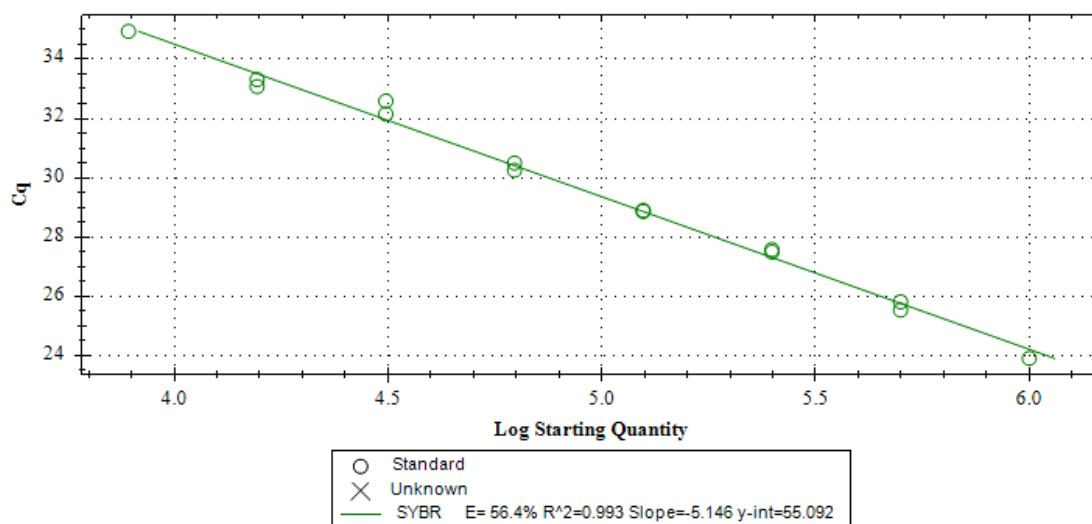
Pro ověření účinnosti PCR byla změřena účinnost každého jednotlivého primeru. Pro toto ověření byla sestavena kalibrační řada ze směsi vzorků. Faktor ředění byl 2 a výsledky účinností primerů pro geny *EF1-alpha*, *RPS5*, *Obp3*, *Obp14*, *Obp17* a *Obp21* získané ze standardních křivek jsou znázorněny lineární regresí logaritmické stupnice míry signálu „Log Starting Quantity“ (osa x) v závislosti na cyklu amplifikace „Cq (quantification cycle – cyklus kvantifikace)“ (osa y). Pro stanovení genové exprese byla použita hodnota „slope“ (poměr mezi počtem amplifikovaných molekul DNA a zvýšením fluorescenčního signálu detekovaného v každém cyklu amplifikace), která je uvedena pro každý jednotlivý gen spolu s hodnotami jejich účinnosti (Obr.7-12).



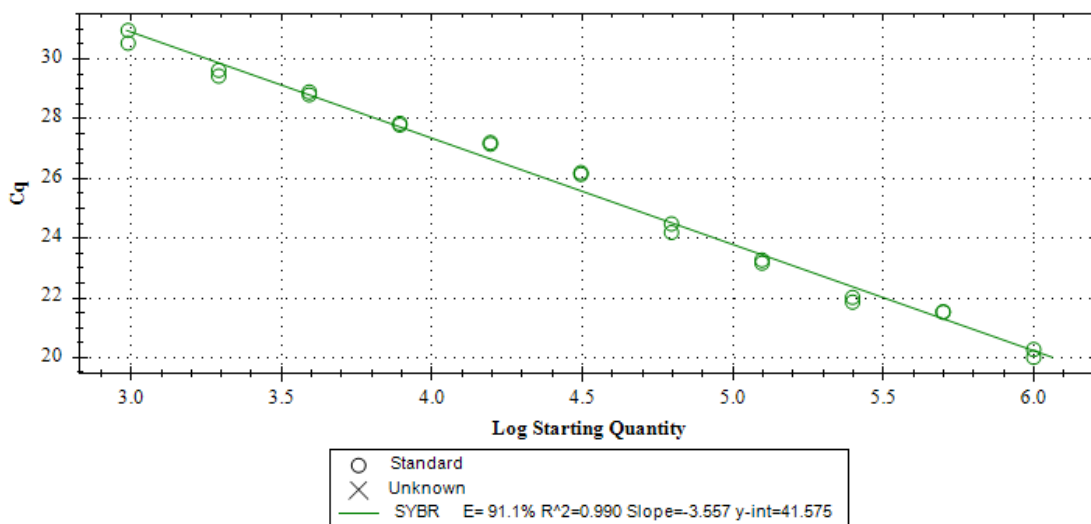
Obrázek č. 7: Účinnost primeru *EFL-alpha* byla stanovena na 86,0 %



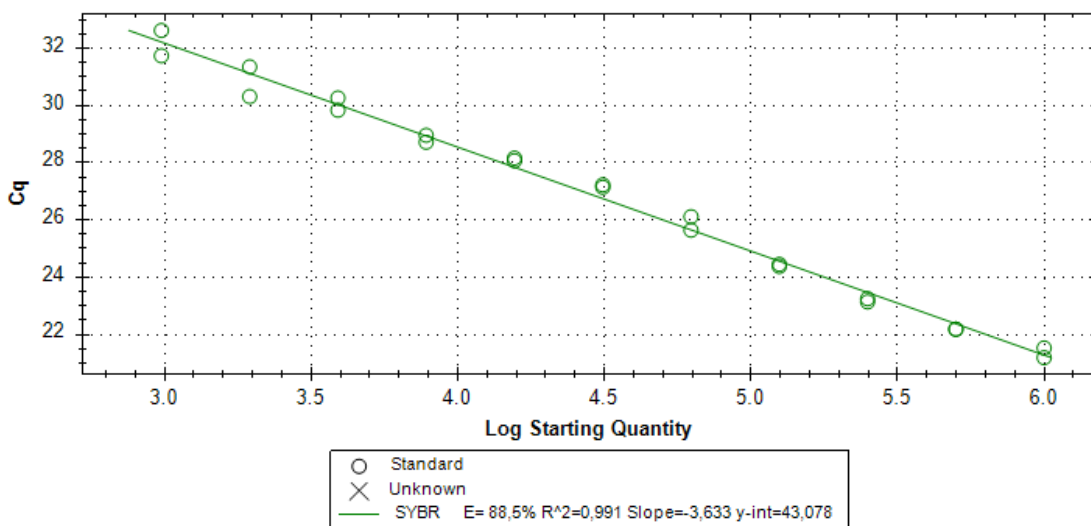
Obrázek č. 8: Účinnost primeru *RPS5* byla stanovena na 86,4 %



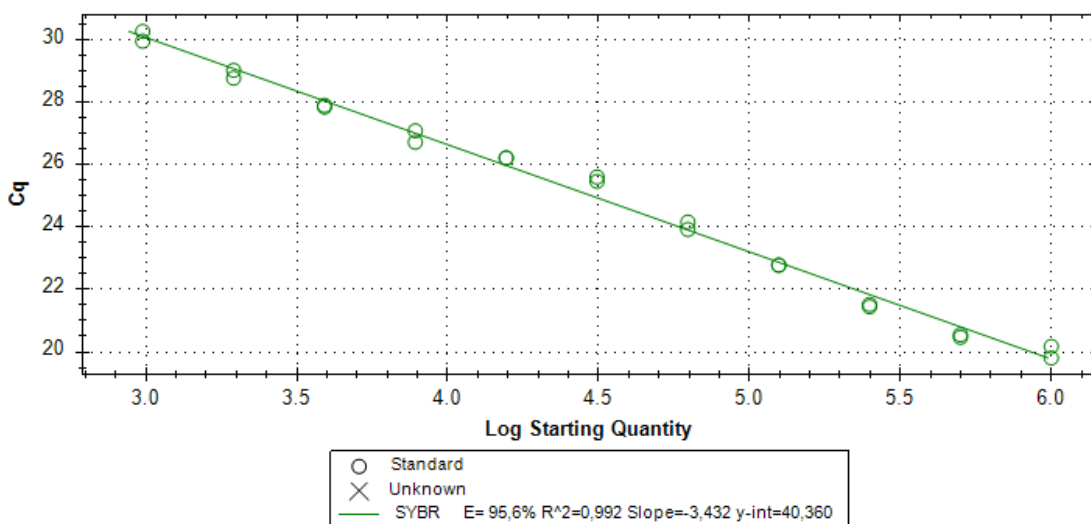
Obrázek č. 9: Účinnost primeru *Obp3* byla stanovena na 56,4 %



Obrázek č. 10: Účinnost primeru *Obp14* byla stanovena na 91,1 %



Obrázek č. 11: Účinnost primeru *Obp17* byla stanovena na 88,5 %



Obrázek č. 12: Účinnost primeru *Obp21* byla stanovena na 95,6 %

4.2 Stanovení genové exprese OBP

Tato kapitola již zaměřuje svou pozornost na věcný souhrn získaných výsledků v oblasti čtyř vybraných genů pro OBP a pokouší se diskutovat dosažené výsledky. Z výsledků qPCR naměřeného signálu úměrně odpovídajícímu množství ampliconů zkoumaných genů (GOI) byla jejich genová exprese normalizována vzhledem k referenčním housekeeping genům (HKG) *EF-alpha* a *RPS5*, tj. byla porovnána míra průměrné relativní exprese každého zkoumaného genu s průměrnou relativní expresí housekeeping genů (HKG/GOI). Normalizované exprese byly poté statisticky vyhodnoceny, aby bylo možné posoudit, zda jsou výstupy dat z měření relevantní a lze je diskutovat s výsledky doposud známých prací na téma odorant vazebných proteinů, varroózy a stresových reakcí včely medonosné. Dle měření relativní genové exprese *Obp3*, *Obp14*, *Obp17* a *Obp21* vyšlo jasně najevo, že infestace roztočem *V. destructor* významně ovlivňuje expresi všech čtyř uvedených genů.

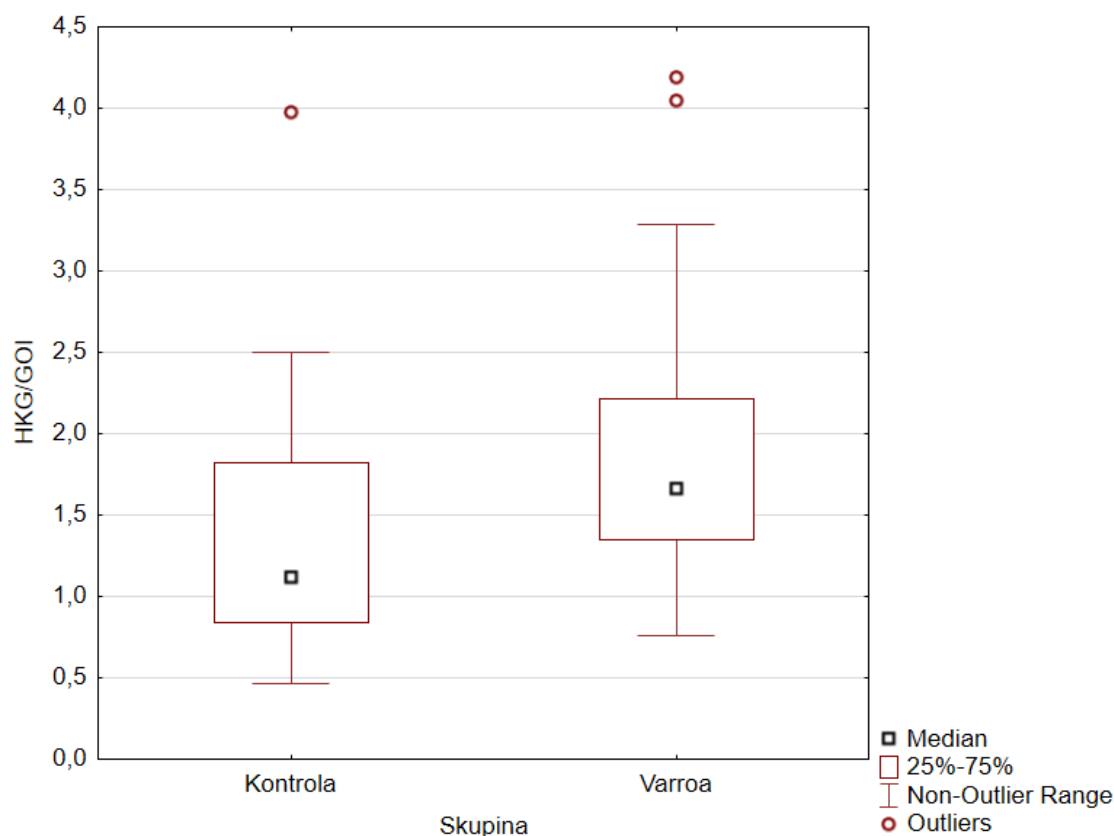
S ohledem na výsledky lze říct, že exprese všech zkoumaných genů byla významně zvýšena u experimentální (infestované) skupiny označené jako „VD“ při porovnání s kontrolní skupinou označenou jako „CTRL“ (Obr. 13-16), kde každý sloupec obsahuje množinu tří kontrolních anebo tří infestovaných včelích kolonií zastoupených 10 tj. celkem 30 jednotlivými vzorky v každé skupině, vyjma jednoho vzorku ze skupiny VD, který během qPCR degradoval. Dílčí výsledky jsou přehledně diskutovány se současnou vědeckou literaturou v následujících odstavcích se zaměřením na jednotlivé geny, jejichž exprese byla pozorována. Výsledky statistického vyhodnocení jsou zaznamenány v tabulce č. 12 a komentovaná grafická vyobrazení relativních genových expresí *Obp3*, *Obp14*, *Obp17* a *Obp21* jsou pak znázorněna na obrázcích 13-16.

Tabulka č. 12: Hodnoty definičního oboru (df , $df = n - 2$; n = počet vzorků) a hodnoty hladiny významnosti (p) pro rozdíl exprese *Obp3*, *Obp14*, *Obp17* a *Obp17* mezi kontrolními a infestovanými koloniemi:

t-test nezávislých vzorků			
Název genu	t	df	p
<i>Obp3</i>	-2.315	58	0.024
<i>Obp14</i>	-2.777	58	0.007
<i>Obp17</i>	-3.643	58	< 0.001
<i>Obp21</i>	-3.285	57	0.002

Pozn. studentův t-test.

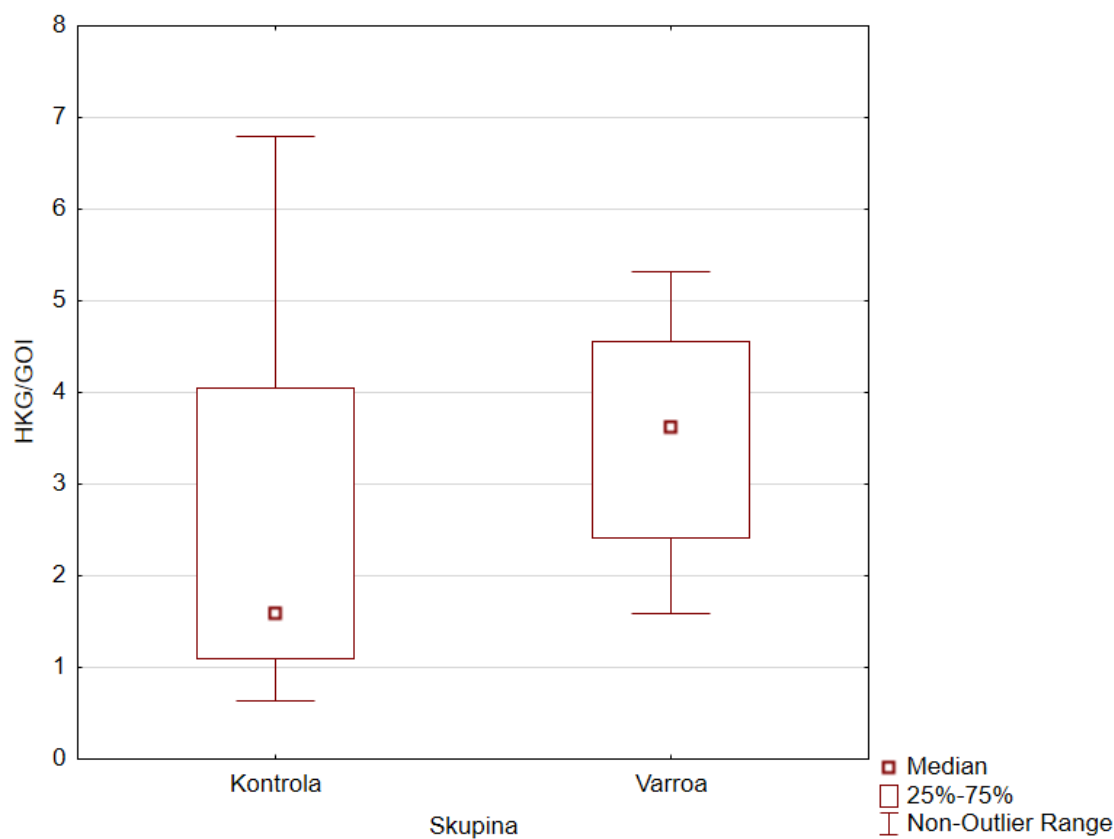
4.2.1 Stanovení exprese genu *Obp3*



Obrázek č. 13: Expresa genu *Obp3* v kontrolních a infestovaných koloniích

V případě genu *Obp3*, který je exprimován, mimo tykadla, přibližně ve stejném množství napříč celým tělem včely medonosné (Forêt & Maleszka, 2006) došlo u infestované skupiny (VD) ke zvýšení exprese (Obr. č. 13). Zda se jedná o mobilizaci imunitního systému či vedlejší účinek vlivů roztoče *V. destructor* není z tohoto výzkumu zřejmé, nicméně to nabádá k širšímu prozkoumání. Byl však prokázán vliv OBP3 na rozvoj varroasenzitivního chování (Mondet et al., 2015) a jeho velký význam v rámci nervového systému včely medonosné (Forêt & Maleszka, 2006). Mimo význam OBP3 v rámci varroasenzitivního chování hraje tento protein také důležitou roli při hygienickém chování. Bylo prokázáno, že jeho zvýšení vede právě ke zvýšení hygienického chování (Le Conte et al., 2011).

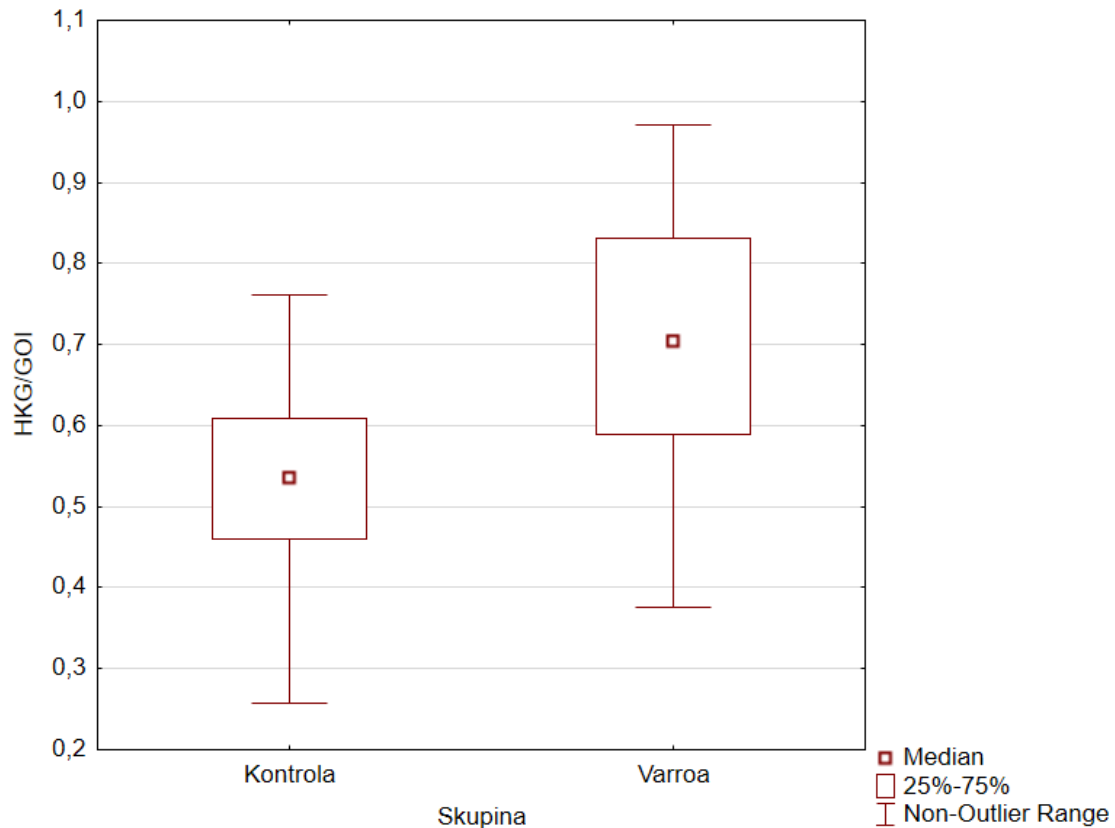
4.2.2 Stanovení exprese genu *Obp14*



Obrázek č. 14: Expresse genu *Obp14* v kontrolních a infestovaných koloniích

Expresse *Obp14* měřena v této práci byla rovněž zvýšena (Obr. č. 14), podobné výsledky byly zaznamenány při studiu vlivu infekce *Nosema ceranae*, kdy se mění exprese mnoha proteinů včetně *Obp14* nebo *Obp21* v závislosti na fázi infekce (Badaoui et al., 2017). V tomto případě, kdy byla včelstva VD silně infestovaná roztoči lze předpokládat podobnou adaptaci při expresi OBP. Z výzkumů provedených na včele africké (*Apis mellifera simensis*) vyplývá, že zvýšená relativní exprese genu pro OBP14 ve včelstvech vykazujících příznaky varroózy je spojena s vyšší citlivostí včel vůči roztoči, a dokonce i DWV a toto zvýšení exprese tudíž vede ke zlepšení hygienického chování, kdy je jednodušší roztoče ve včelstvu detekovat a zbavit se jej (Gebremedhn et al., 2023). Nutno však podotknout, že rozdíly mezi fyziologickou odpovědí organismu v rámci druhu se mohou lišit, což platí i pro diskutovanou včelu africkou ve srovnání se včelou medonosnou, na které byl proveden výzkum.

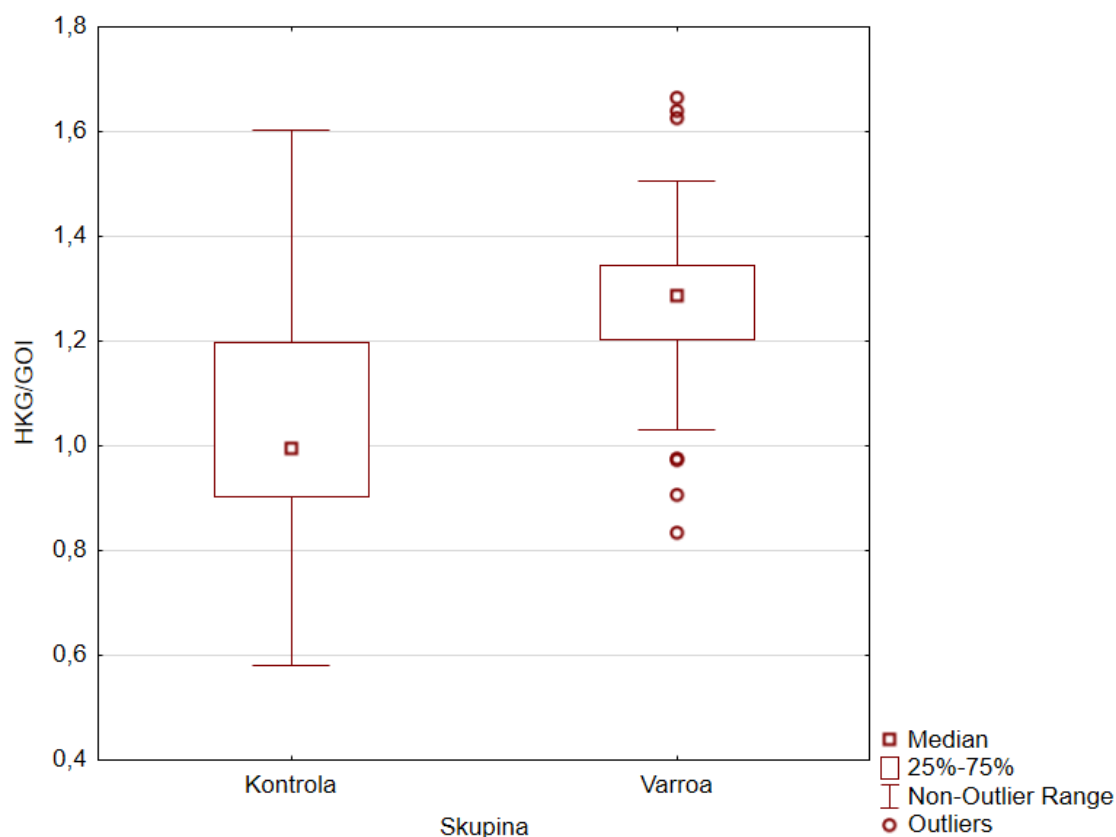
4.2.3 Stanovení exprese genu *Obp17*



Obrázek č. 15: Expresce genu *Obp17* v kontrolních a infestovaných koloniích

Expresce genu *Obp17* byla ve všech infestovaných koloniích výrazně zvýšena (Obr. č. 15), což by mohlo vést k hypotéze, že se OBP17 nějakým způsobem podílí na imunitní reakci organismu vůči patogenům. Stimulující vliv na vyšší expresi mnoha genů kódujících širší spektrum proteinů účastnících se kaskády imunitních reakcí včetně genu *Obp17* bylo prokázáno při studiu vlivu bakteriální infekce způsobené *Escherichia coli* v hlavě včely medonosné (Scharlaken et al., 2008), což podporuje hypotézu o roli OBP17 v imunitním systému včely. Zapojení těchto proteinů z oblasti smyslového vnímání v imunitních a obranných reakcích pramení z všeobecného předpokladu, kdy hmyzí imunitní i nervový systém hmyzu kooperují na podobném principu, jako tomu je u vyšších organismů při snaze odstranit z organismu patogenní činitele (Ader et al., 1995).

4.2.4 Stanovení exprese genu *Obp21*



Obrázek č. 16: Exprese genu *Obp21* v kontrolních a infestovaných koloniích

OBP21 hraje velmi důležitou roli v chemické komunikaci včel. Změna v jeho expresi byla pozorována např. při vystavení včel toxickým účinkům insekticidu thiametoxamu, kde bylo pozorováno pro změnu snížení jeho exprese, což se oproti vlivům, které expresi OBP zvyšují, projevilo jako negativní ve smyslu ovlivnění fyziologických procesů včetně vývoje (Teng-Fei et al., 2017). V případě této závěrečné práce byla však jeho exprese zvýšena (Obr. č. 16), což znamená, že chemosenzorické schopnosti včel jsou rovněž zesíleny. Toto porovnání ukazuje na způsoby, jakými včely reagují na stresové faktory, v případě infestace roztoči je indukována snaha zvýšit citlivost poplašných systémů a vede to ke zvýšení exprese s tím spojených proteinů, naopak stres vyvolaný účinkem insekticidu nemohl být včelou rozpoznán v podobném stylu a toxicita insekticidu nějakým jiným způsobem narušila biochemické a molekulárně-biologické pochody organismu. Vzhledem k očekávání opačného výsledku exprese *Obp21* je toto překvapivá informace, neboť by se dalo čekat, že se roztoč bude snažit oslabit smyslové soustavy včely, aby tím tak zabránil rozvoji hygienického chování. Je také možné, že netrpí-li

včelstvo jinými onemocněními, jako jsou virózy či bakteriální infekce, je schopné indukovat vyšší expresi některých proteinů vedoucích k hygienickému chování.

4.2.5 Potenciální vliv jiných stresorů na expresi OBP

Potvrzení, zda včelstva nebyla nakažena viry či bakteriemi, které jak je výše uvedeno rovněž ovlivňují expresi OBP, však nebyla získána, což by ale v případě potvrzení, zda byla některá včelstva infikována virem deformovaných křídel, mohlo poskytnout mnohem objektivnější pohled, neboť je znám symbiotický vztah DWV a *V. destructor* v rámci jejich společného šíření (Di Prisco et al., 2016), a tudíž je tato úvaha spíše ukazatelem směru dalšího výzkumu.

5 ZÁVĚR

Smyslem této bakalářské práce bylo shromáždit základní poznatky o OBP a seznámit její čtenáře blíže s jejich nezastupitelnou funkcí v rámci fyziologie organismů.

Příčemž bylo dosaženo těchto výsledků:

- 1) Vypracování literární rešerše o struktuře a funkci OBP hmyzu, zejména včely medonosné. Vypracování literární rešerše o podobnosti OBP hmyzu s OBP obratlovců.

Byly komentovány odlišnosti a podobnosti ve struktuře OBP hmyzu a obratlovců, přičemž podstatou srovnání je důkaz konvergentního vývoje OBP.

- 2) Byla diskutována spojitost mezi imunitními reakcemi včely medonosné a OBP, role OBP v rámci včelí kolonie a zpracována literární rešerše o molekulárně-biologické a biochemické podstatě OBP.

Ze studií zabývajících se OBP bylo prokázáno, že jejich role se neomezuje pouze na zprostředkování pachové informace, ale tyto proteiny se rovněž podílejí na imunitních reakcích nebo též na fungování centrální nervové soustavy včely medonosné a ostatních zástupců hmyzu.

- 3) Vypracování literární rešerše o metodách studia a využití odorant vazebných proteinů.

Pro studium OBP lze využít mnoha metod, z nichž byla využita metoda stanovení genové exprese. Vzhledem k výjimečné stabilitě OBP a jejich velmi vysoké citlivosti při detekci různorodých semiochemikálií se jeví jako atraktivní jejich využití při syntéze biosenzorů na bázi OBP.

- 4) V rámci praktické části byla zavedena a optimalizována metoda pro stanovení genové exprese OBP.

Pro studium OBP byla využita metoda izolace RNA s RT-qPCR a z výsledků byla stanovena relativní genová exprese *Obp3*, *Obp14*, *Obp17* a *Obp21*

5) Výsledky měření reálných vzorků silně infestovaných včel byly statisticky vyhodnoceny a vzaty do kontextu se současnými poznatky o OBP.

Z výsledků této práce i prací zaměřených na OBP ve spojitosti se stresovými faktory vyplývá, že infestace roztočem *V. destructor* signifikantně zvyšuje expresi všech čtyř zkoumaných genů kódujících OBP.

6 BIBLIOGRAFIE

- Abdelmegeed, S., & G., S. (2015). Comparative Studies on the Antennal Sense Organs of Queen and Worker Honey Bees, *Apis mellifera* L. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. A, Entomology*, 8(2), 65-75. <https://doi.org/10.21608/eajbsa.2015.12902>
- Ader, R., Cohen, N., & Felten, D. (1995). Psychoneuroimmunology: interactions between the nervous system and the immune system. *The Lancet*, 345(8942), 99-103. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)90066-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)90066-7)
- Ando, T., Sekine, S., Inagaki, S., Misaki, K., Badel, L., Moriya, H., Sami, M., Itakura, Y., Chihara, T., Kazama, H., Yonemura, S., & Hayashi, S. (2019). Nanopore Formation in the Cuticle of an Insect Olfactory Sensillum. *Current Biology*, 29(9), 1512-1520.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.03.043>
- Angeli, S., Ceron, F., Scaloni, A., Monti, M., Monteforti, G., Minnocci, A., Petacchi, R., & Pelosi, P. (1999). Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *European Journal of Biochemistry*, 262(3), 745-754. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00438.x>
- Badaoui, B., Fougeroux, A., Petit, F., Anselmo, A., Gorni, C., Cucurachi, M., Cersini, A., Granato, A., Cardeti, G., Formato, G., Mutinelli, F., Giuffra, E., Williams, J., Botti, S., & Rueppell, O. (2017). RNA-sequence analysis of gene expression from honeybees (*Apis mellifera*) infected with *Nosema ceranae*. *PLOS ONE*, 12(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173438>
- Barbosa, A., Oliveira, A., & Roque, A. (2018). Protein- and Peptide-Based Biosensors in Artificial Olfaction. *Trends in Biotechnology*, 36(12), 1244-1258. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.07.004>
- Bianchet, M., Bains, G., Pelosi, P., Pevsner, J., Snyder, S., Monaco, H., & Amzel, L. (1996). The three-dimensional structure of bovine odorant binding protein and its mechanism of odor recognition. *Nature Structural Biology*, 3(11), 934-939. <https://doi.org/10.1038/nsb1196-934>
- BIGNETTI, E., CAVAGGIONI, A., PELOSI, P., PERSAUD, K., SORBI, R., & TIRINDELLI, R. (1985). Purification and characterisation of an odorant-binding protein from cow nasal tissue. *European Journal of Biochemistry*, 149(2), 227-231. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1985.tb08916.x>
- Boguski, M., Lowe, T., & Tolstoshev, C. (1993). dbEST — database for “expressed sequence tags”. *Nature Genetics*, 4(4), 332-333. <https://doi.org/10.1038/ng0893-332>
- Bowen-Walker, P., Martin, S., & Gunn, A. (1999). The Transmission of Deformed Wing Virus between Honeybees (*Apis mellifera*L.) by the Ectoparasitic Mite *Varroa jacobsoni*Oud. *Journal of Invertebrate Pathology*, 73(1), 101-106. <https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4807>
- Brodtschneider, R., Gray, A., van der Zee, R., Adjlane, N., Brusbardis, V., Charrière, J., Chlebo, R., Coffey, M., Crailsheim, K., Dahle, B., Danihlík, J., Danneels, E., de Graaf, D., Dražić, M., Fedoriak, M., Forsythe, I., Golubovski, M., Gregorc, A., Grzęda, U. et al. (2016). Preliminary analysis of loss rates of honey bee colonies during winter 2015/16 from the COLOSS survey. *Journal of Apicultural Research*, 55(5), 375-378. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1260240>
- Broeck, J. (2001). Insect G protein-coupled receptors and signal transduction. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 48(1), 1-12. <https://doi.org/10.1002/arch.1054>
- Dahanukar, A., Hallem, E., & Carlson, J. (2005). Insect chemoreception. *Current Opinion in Neurobiology*, 15(4), 423-430. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.06.001>
- Dal Monte, M., Andreini, I., Revoltella, R., & Pelosi, P. (1991). Purification and characterization of two odorant-binding proteins from nasal tissue of rabbit and pig. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 99(2), 445-451. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(91\)90068-0](https://doi.org/10.1016/0305-0491(91)90068-0)
- Danty, E., Briand, L., Michard-Vanhée, C., Perez, V., Arnold, G., Gaudemer, O., Huet, D., Huet, J., Ouali, C., Masson, C., & Pernollet, J. (1999). Cloning and Expression of a Queen Pheromone-Binding Protein in the Honeybee: an Olfactory-Specific, Developmentally Regulated Protein. *The Journal of Neuroscience*, 19(17), 7468-7475. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-17-07468.1999>

- Di Pietrantonio, F., Cannatà, D., Benetti, M., Verona, E., Varriale, A., Staiano, M., & D'Auria, S. (2013). Detection of odorant molecules via surface acoustic wave biosensor array based on odorant-binding proteins. *Biosensors and Bioelectronics*, *41*, 328-334. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.08.046>
- Di Prisco, G., Annoscia, D., Margiotta, M., Ferrara, R., Varricchio, P., Zanni, V., Caprio, E., Nazzi, F., & Pennacchio, F. (2016). A mutualistic symbiosis between a parasitic mite and a pathogenic virus undermines honey bee immunity and health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(12), 3203-3208. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523515113>
- Dimitratos, S., Hommel, A., Konrad, K., Simpson, L., Wu-Woods, J., & Woods, D. (2019). Biosensors to Monitor Water Quality Utilizing Insect Odorant-Binding Proteins as Detector Elements. *Biosensors*, *9*(2). <https://doi.org/10.3390/bios9020062>
- Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, *312*(5771), 212-217. <https://doi.org/10.1126/science.1124619>
- Dorak, M. (2006). *Real-Time PCR* (1.). Taylor & Francis Group.
- Drakou, C., Tsitsanou, K., Potamitis, C., Fessas, D., Zervou, M., & Zographos, S. (2017). The crystal structure of the AgamOBP1•Icaridin complex reveals alternative binding modes and stereo-selective repellent recognition. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *74*(2), 319-338. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2335-6>
- Ellis, J., & Munn, P. (2015). The worldwide health status of honey bees. *Bee World*, *86*(4), 88-101. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2005.11417323>
- Erban, T., Sopko, B., Kadlikova, K., Talacko, P., & Harant, K. (2019). Varroa destructor parasitism has a greater effect on proteome changes than the deformed wing virus and activates TGF- β signaling pathways. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-19. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45764-1>
- Esch, H. (1960). Über die Körpertemperaturen und den Wärmehaushalt von Apis mellifica. *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie*, *43*(3), 305-335. <https://doi.org/10.1007/BF00298066>
- Evans, J., Aronstein, K., Chen, Y., Hetru, C., Imler, J., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G., 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>
- Flower, D. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemical Journal*, *318*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1042/bj3180001>
- Forêt, S., & Maleszka, R. (2006). Function and evolution of a gene family encoding odorant binding-like proteins in a social insect, the honey bee (Apis mellifera). *Genome Research*, *16*(11), 1404-1413. <https://doi.org/10.1101/gr.5075706>
- Fries, I. (2010). Nosema ceranae in European honey bees (Apis mellifera). *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*, S73-S79. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.017>
- Fries, I., Camazine, S., & Sneyd, J. (2015). Population Dynamics of Varroa Jacobsoni: A Model and a Review. *Bee World*, *75*(1), 5-28. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1994.11099190>
- Garrido-Bailón, E., Bartolomé, C., Prieto, L., Botías, C., Martínez-Salvador, A., Meana, A., Martín-Hernández, R., & Higes, M. (2012). The prevalence of Acarapis woodi in Spanish honey bee (Apis mellifera) colonies. *Experimental Parasitology*, *132*(4), 530-536. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.08.018>
- Gebremedhn, H., Claeys Bouuaert, D., Asperges, M., Amssalu, B., De Smet, L., & de Graaf, D. (2023). Expression of Molecular Markers of Resilience against Varroa destructor and Bee Viruses in Ethiopian Honey Bees (Apis mellifera simensis) Focussing on Olfactory Sensing and the RNA Interference Machinery. *Insects*, *14*(5). <https://doi.org/10.3390/insects14050436>
- Getchel, T., Margolis, F., & Getchel, M. (1984). Perireceptor and receptor events in vertebrate olfaction. *Progress in Neurobiology*, *23*(4), 317-345. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(84\)90008-X](https://doi.org/10.1016/0301-0082(84)90008-X)
- Gong, D., Zhang, H., Zhao, P., Lin, Y., Xia, Q., & Xiang, Z. (2007). Identification and expression pattern of the chemosensory protein gene family in the silkworm, Bombyx mori. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *37*(3), 266-277. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.11.012>

- Gong, D., Zhang, H., Zhao, P., Xia, Q., & Xiang, Z. (2009). The Odorant Binding Protein Gene Family from the Genome of Silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-332>
- González, D., Zhao, Q., McMahan, C., Velasquez, D., Haskins, W., Sponsel, V., Cassill, A., & Renthal, R. (2009). The major antennal chemosensory protein of red imported fire ant workers. *Insect Molecular Biology*, *18*(3), 395-404. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2009.00883.x>
- Gordon, D. (1983). Dependence of necrophoric response to oleic acid on social context in the ant, *Pogonomyrmex badius*. *Journal of Chemical Ecology*, *9*(1), 105-111. <https://doi.org/10.1007/BF00987774>
- Goulson, D., Nicholls, E., Botías, C., & Rotheray, E. (2015). Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science*, *347*(6229). <https://doi.org/10.1126/science.1255957>
- Ha, T., & Smith, D. (2022). Recent Insights into Insect Olfactory Receptors and Odorant-Binding Proteins. *Insects*, *13*(10), 1-13. <https://doi.org/10.3390/insects13100926>
- Hekmat-Safe, D., Scape, C., McKinney, A., & Tanouye, M. (2002). Genome-Wide Analysis of the Odorant-Binding Protein Gene Family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Research*, *12*(9), 1357-1369. <https://doi.org/10.1101/gr.239402>
- Horst, R., Damberger, F., Luginbühl, P., Güntert, P., Peng, G., Nikonova, L., Leal, W., & Wüthrich, K. (2001). NMR structure reveals intramolecular regulation mechanism for pheromone binding and release. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(25), 14374-14379. <https://doi.org/10.1073/pnas.251532998>
- Chen, Y., & Siede, R. (2007). Honey Bee Viruses. *Advances in Virus Research Volume 70*, 33-80. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(07\)70002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(07)70002-7)
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, *162*(1), 156-159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. (2006). *Nature*, *443*(7114), 931-949. <https://doi.org/10.1038/nature05260>
- Iovinella, I., Dani, F., Niccolini, A., Sagona, S., Michelucci, E., Gazzano, A., Turillazzi, S., Felicioli, A., & Pelosi, P. (2011). Differential Expression of Odorant-Binding Proteins in the Mandibular Glands of the Honey Bee According to Caste and Age. *Journal of Proteome Research*, *10*(8), 3439-3449. <https://doi.org/10.1021/pr2000754>
- Iriti, M., & Faoro, F. (2007). Review of innate and specific immunity in plants and animals. *Mycopathologia*, *164*(2), 57-64. <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9026-7>
- Jia, Q., Zeng, H., Zhang, J., Gao, S., Xiao, N., Tang, J., Dong, X., & Xie, W. (2021). The Crystal Structure of the *Spodoptera litura* Chemosensory Protein CSP8. *Insects*, *12*(7). <https://doi.org/10.3390/insects12070602>
- Kratochvíl, B., Hušák, M., Brynda, J., & Sedláček, J. (2008). What Can the Current X-Ray Structure Analysis Offer?. *Chemické listy*, *102*(10), 889-901.
- Lartigue, A., Campanacci, V., Roussel, A., Larsson, A., Jones, T., Tegoni, M., & Cambillau, C. (2002). X-ray Structure and Ligand Binding Study of a Moth Chemosensory Protein. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(35), 32094-32098. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204371200>
- Le Conte, Y., Alaux, C., Martin, J., Harbo, J., Harris, J., Dantec, C., Séverac, D., Cros-Arteil, S., & Navajas, M. (2011). Social immunity in honeybees (*Apis mellifera*): transcriptome analysis of varroa-hygienic behaviour. *Insect Molecular Biology*, *20*(3), 399-408. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2011.01074.x>
- Leal, W. (2005). Pheromone Reception. *The Chemistry of Pheromones and Other Semiochemicals II*, *2005*(240), 1-36. <https://doi.org/10.1007/b98314>
- Leal, W. (2013). Odorant Reception in Insects: Roles of Receptors, Binding Proteins, and Degrading Enzymes. *Annual Review of Entomology*, *58*(1), 373-391. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153635>
- Lourenço, A., Mackert, A., dos Santos Cristino, A., & Simões, Z. (2008). Validation of reference genes for gene expression studies in the honey bee, *Apis mellifera*, by quantitative real-time RT-PCR. *Apidologie*, *39*(3), 372-385. <https://doi.org/10.1051/apido:2008015>

- Macharia, R., Ombura, F., & Aroko, E. (2015). Insects' RNA Profiling Reveals Absence of "Hidden Break" in 28S Ribosomal RNA Molecule of Onion Thrips, *Thrips tabaci*. *Journal of Nucleic Acids*, 2015, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/965294>
- Mastrobuoni, G., Qiao, H., Iovinella, I., Sagona, S., Niccolini, A., Boscaro, F., Caputo, B., Orejuela, M., Torre, A., Kempa, S., Felicioli, A., Pelosi, P., Moneti, G., Dani, F., & Leal, W. (2013). A Proteomic Investigation of Soluble Olfactory Proteins in *Anopheles gambiae*. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075162>
- McPherson, M., & Moller, S. (2006). *PCR* (2nd ed). Taylor & Francis.
- Milne, C. (1983). Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Hygienic Behavior and Resistance to Chalkbrood. *Annals of the Entomological Society of America*, 76(3), 384-387. <https://doi.org/10.1093/aesa/76.3.384>
- Min, J., Woo, M., Yoon, H., Jang, J., Wu, J., Lim, C., & Kim, Y. (2014). Isolation of DNA using magnetic nanoparticles coated with dimercaptosuccinic acid. *Analytical Biochemistry*, 447, 114-118. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.11.018>
- Mitaka, Y., Kobayashi, K., Mikheyev, A., Tin, M., Watanabe, Y., Matsuura, K., & Dickens, J. (2016). Caste-Specific and Sex-Specific Expression of Chemoreceptor Genes in a Termite. *PLOS ONE*, 11(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146125>
- Mondet, F., Alaux, C., Severac, D., Rohmer, M., Mercer, A., & Le Conte, Y. (2015). Antennae hold a key to *Varroa*-sensitive hygiene behaviour in honey bees. *Scientific Reports*, 5(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/srep10454>
- National Library of Medicine: Basic Local Alignment Search Tool*. Retrieved 2023-02-10, from <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Neumann, P., & Carreck, N. (2015). Honey bee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 1-6. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.01>
- Parida, S., Dash, S., Patel, S., & Mishra, B. (2006). Adsorption of organic molecules on silica surface. *Advances in Colloid and Interface Science*, 121(1-3), 77-110. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2006.05.028>
- Patricio, E., Cruz-López, L., & Morgan, E. (2004). Electroantennography in the study of two stingless bee species (Hymenoptera: meliponini). *Brazilian Journal of Biology*, 64(4), 827-831. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842004000500012>
- Pelosi, P. (1994). Odorant-Binding Proteins. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 29(3), 199-228. <https://doi.org/10.3109/10409239409086801>
- Pelosi, P. (1996). Perireceptor events in olfaction. *Journal on Neurobiology*, 30(1), 3-19. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4695\(199605\)30:1%3C3::AID-NEU2%3E3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4695(199605)30:1%3C3::AID-NEU2%3E3.0.CO;2-A)
- Pelosi, P. (1998). Odorant-Binding Proteins: Structural Aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855(1), 281-293. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10584.x>
- Pelosi, P., Iovinella, I., Zhu, J., Wang, G., & Dani, F. (2018). Beyond chemoreception: diverse tasks of soluble olfactory proteins in insects. *Biological Reviews*, 93(1), 184-200. <https://doi.org/10.1111/brv.12339>
- Pelosi, P., & Maida, R. (1990). Odorant-binding proteins in vertebrates and insects: similarities and possible common function. *Chemical Senses*, 15(2), 205-215. <https://doi.org/10.1093/chemse/15.2.205>
- Persaud, K. (2012). Biomimetic Olfactory Sensors. *IEEE Sensors Journal*, 12(11), 3108-3112. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2012.2214118>
- Pesenti, M., Spinelli, S., Bezirard, V., Briand, L., Pernollet, J., Tegoni, M., & Cambillau, C. (2008). Structural Basis of the Honey Bee PBP Pheromone and pH-induced Conformational Change. *Journal of Molecular Biology*, 380(1), 158-169. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.04.048>
- Pevsner, J., & Snyder, S. (1990). Odorant-binding protein: odorant transport function in the vertebrate nasal epithelium. *Chemical Senses*, 15(2), 217-222. <https://doi.org/10.1093/chemse/15.2.217>
- Picimbon, J., Dietrich, K., Krieger, J., & Breer, H. (2001). Identity and expression pattern of chemosensory proteins in *Heliothis virescens* (Lepidoptera, Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31(12), 1173-1181. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00063-7](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00063-7)
- Posada-Florez, F., Ryabov, E., Heerman, M., Chen, Y., Evans, J., Sonenshine, D., Cook, S., & Rueppell, O. (2020). *Varroa* destructor mites vector and transmit pathogenic honey bee viruses

- acquired from an artificial diet. *PLOS ONE*, 15(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242688>
- Raran-Kurussi, S., Cherry, S., Zhang, D., & Waugh, D. (2017). Removal of Affinity Tags with TEV Protease. *Heterologous Gene Expression in E.coli*, 221-230. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6887-9_14
- Ratnieks, F. (2015). American Foulbrood: The Spread and Control of an Important Disease of the Honey Bee. *Bee World*, 73(4), 177-191. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1992.11099136>
- Ribeiro, C., & Brehélin, M. (2006). Insect haemocytes: What type of cell is that?. *Journal of Insect Physiology*, 52(5), 417-429. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.01.005>
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M., & Séraphin, B. (1999). A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnology*, 17(10), 1030-1032. <https://doi.org/10.1038/13732>
- Rihani, K., Ferveur, J., & Briand, L. (2021). The 40-Year Mystery of Insect Odorant-Binding Proteins. *Biomolecules*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/biom11040509>
- Saba, N., Ye, C., Zhang, W., Wu, T., Wang, Y., Zhang, X., Song, Z., Xing, L., Su, X., & Ziesmann, J. (2022). The Antennal Sensilla and Expression Patterns of Olfactory Genes in the Lower Termite *Reticulitermes aculabialis* (Isoptera: Rhinotermitidae). *Journal of Insect Science*, 22(4). <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieac045>
- Sandler, B., Nikonova, L., Leal, W., & Clardy, J. (2000). Sexual attraction in the silkworm moth: structure of the pheromone-binding-protein–bombykol complex, 7(2), 143-151. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00078-8](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00078-8)
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., & Desneux, N. (2016). Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. *Environment International*, 89-90, 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.009>
- Shanbhag, S., Hekmat-Scafe, D., Kim, M., Park, S., Carlson, J., Pikielny, C., Smith, D., & Steinbrecht, R. (2001). Expression mosaic of odorant-binding proteins in *Drosophila* olfactory organs. *Microscopy Research and Technique*, 55(5), 297-306. <https://doi.org/10.1002/jemt.1179>
- Scharlaken, B., de Graaf, D., Goossens, K., Peelman, L., & Jacobs, F. (2008). Differential gene expression in the honeybee head after a bacterial challenge, 32(8), 883-889. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.01.010>
- Schwaighofer, A., Kotlowski, C., Araman, C., Chu, N., Mastrogiacomo, R., Becker, C., Pelosi, P., Knoll, W., Larisika, M., & Nowak, C. (2014). Honey bee odorant-binding protein 14: effects on thermal stability upon odorant binding revealed by FT-IR spectroscopy and CD measurements. *European Biophysics Journal*, 43(2-3), 105-112. <https://doi.org/10.1007/s00249-013-0939-4>
- Silva, D., Ceballos, R., Arismendi, N., Dalmon, A., & Vargas, M. (2021). Variant A of the Deformed Wings Virus Alters the Olfactory Sensitivity and the Expression of Odorant Binding Proteins on Antennas of *Apis mellifera*. *Insects*, 12(10). <https://doi.org/10.3390/insects12100895>
- Spinelli, S., Lagarde, A., Iovinella, I., Legrand, P., Tegoni, M., Pelosi, P., & Cambillau, C. (2012). Crystal structure of *Apis mellifera* OBP14, a C-minus odorant-binding protein, and its complexes with odorant molecules. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(1), 41-50. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.10.005>
- Spivak, M., & Gilliam, M. (2015). Hygienic behaviour of honey bees and its application for control of brood diseases and varroa. *Bee World*, 79(3), 124-134. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1998.11099394>
- Steinbrecht, R. (1998). Odorant-Binding Proteins: Expression and Function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 855(1), 323-332. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10591.x>
- Teng-Fei, S., Wang, Y., Lei, Q., Fang, L., & Liu-Sheng, Y. (2017). Sublethal effects of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam on the transcriptome of the honeybee (*Apis mellifera*). *bioRxiv*, (114256). <https://doi.org/10.1101/114256>
- Tesovnik, T., Cizelj, I., Zorc, M., Čitar, M., Božič, J., Glavan, G., Narat, M., & Rueppell, O. (2017). Immune related gene expression in worker honey bee (*Apis mellifera carnica*) pupae exposed to neonicotinoid thiamethoxam and Varroa mites (*Varroa destructor*). *PLOS ONE*, 12(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187079>
- Tomaselli, S., Crescenzi, O., Sanfelice, D., AB, E., Wechselberger, R., Angeli, S., Scaloni, A., Boelens, R., & Tancredi. (2006). Solution Structure of a Chemosensory Protein from the Desert

- Locust *Schistocerca gregaria*. *Biochemistry*, 45(35), 10606–10613. <https://doi.org/10.1021/bi060998w>
- Toni, L., Garcia, A., Jeffrey, D., Jiang, X., Stauffer, B., Miyamoto, S., & Sucharov, C. (2018). Optimization of phenol-chloroform RNA extraction. *MethodsX*, 5, 599-608. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.05.011>
- Torto, B., Carroll, M., Duehl, A., Fombong, A., Gozansky, T., Nazzi, F., Soroker, V., & Teal, P. (2015). Standard methods for chemical ecology research in *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-34. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.06>
- Tsakas, S., & Marmaras, V. (2010). Insect immunity and its signalling: an overview. *Invertebrate Survival Journal*, 7(2), 228-238.
- Varmus, H. (1987). Reverse Transcription. *Scientific American*, 257(3), 56-64. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0987-56>
- Veselý, V. (2003). *Včelařství*. Brázda.
- Vincent, J., & Wegst, U. (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle, 33(3), 187-199. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2004.05.006>
- Vogt, R., & Riddiford, L. (1981). Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293(5828), 161-163. <https://doi.org/10.1038/293161a0>
- Wagoner, K., Spivak, M., Hefetz, A., Reams, T., & Rueppell, O. (2019). Stock-specific chemical brood signals are induced by *Varroa* and Deformed Wing Virus, and elicit hygienic response in the honey bee. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45008-2>
- Wang, F. (2021). Semi-Quantitative RT-PCR: An Effective Method to Explore the Regulation of Gene Transcription Level Affected by Environmental Pollutants. *Environmental Toxicology and Toxicogenomics*, 95-103. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1514-0_7
- Ward, P., & Downie, D. (2005). The ant subfamily Pseudomyrmecinae (Hymenoptera: Formicidae). *Systematic Entomology*, 30(2), 310-335. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2004.00281.x>
- Ward, W., & Swiatek, G. (2009). Protein Purification. *Current Analytical Chemistry*, 5(2), 85-105. <https://doi.org/10.2174/157341109787846171>
- Wegener, J., Ruhnke, H., Scheller, K., Mispagel, S., Knollmann, U., Kamp, G., & Bienefeld, K. (2016). Pathogenesis of varroosis at the level of the honey bee (*Apis mellifera*) colony. *Journal of Insect Physiology*, 91-92(91-92), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2016.06.004>
- Wu, T. (2000). Synthetic peptide mimicking of binding sites on olfactory receptor protein for use in 'electronic nose'. *Journal of Biotechnology*, 80(1), 63-73. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00228-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00228-5)
- Yasukawa, J., Tomioka, S., Aigaki, T., & Matsuo, T. (2010). Evolution of expression patterns of two odorant-binding protein genes, *Obp57d* and *Obp57e*, in *Drosophila*. *Gene*, 467(1-2), 25-34. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2010.07.006>
- Yuan, H., Ding, Y., Gu, S., Sun, L., Zhu, X., Liu, H., Dhiloo, K., Zhang, Y., Guo, Y., & Renou, M. (2015). Molecular Characterization and Expression Profiling of Odorant-Binding Proteins in *Apolygus lucorum*. *PLOS ONE*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140562>
- Zhang, W., Wanchoo, A., Ortiz-Urquiza, A., Xia, Y., & Keyhani, N. (2016). Tissue, developmental, and caste-specific expression of odorant binding proteins in a eusocial insect, the red imported fire ant, *Solenopsis invicta*. *Scientific Reports*, 6(1), 621-621. <https://doi.org/10.1038/srep35452>
- Zhao, H., Peng, Z., Huang, L., Zhao, S., & Liu, M. (2021). Expression Profile and Ligand Screening of a Putative Odorant-Binding Protein, *AcerOBP6*, from the Asian Honeybee. *Insects*, 12(11), 955. <https://doi.org/10.3390/insects12110955>
- Ziemba, B., Murphy, E., Edlin, H., & Jones, D. (2013). A novel mechanism of ligand binding and release in the odorant binding protein 20 from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Protein Science*, 22(1), 11-21. <https://doi.org/10.1002/pro.2179>

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- 7TMs – 7-transmembránové receptory
- ABP – tykadlové vazebné proteiny
- ABPV – virus akutní včelí paralýzy
- AFB – mor včelího plodu
- ASP – tykadlově specifické proteiny
- BLAST – Základní nástroj pro lokalizaci porovnání sekvencí
- BQCV – virus černání matečnicků
- BS – vazebný roztok
- CSP – chemosenzorick(ý/é) protein(y)
- CTRL – kontrolní skupina
- DWV – virus deformovaných křídel
- EAG – elektroantenografie
- EST – značky exprimovaných sekvencí
- GOBP – obecné odorant vazebné proteiny
- GOI – gen zájmu
- HKG – provozní gen
- KBV – Kashmir bee virus
- LBP – lyzační pufr
- NCBI – National Center for Biotechnology Information (Národní centrum pro biotechnologické informace)
- OBP – odorant vazebn(ý/é) protein(y)
- Obp* – gen kódující OBP
- ORs – olfaktorické receptory
- PBP – feromony vázající proteiny
- qPCR – kvantitativní polymerasová řetězová reakce
- Real-Time PCR – polymerasová řetězová reakce v reálném čase
- RT – reverzní transkripce
- SBV – virus pytlíčkovitosti plodu
- STS – sekvenčně značené místo
- TAP – tandemová afinitní purifikace
- TEV – virus tabákového leptání
- VD – experimentální skupina
- WB – promývací pufr