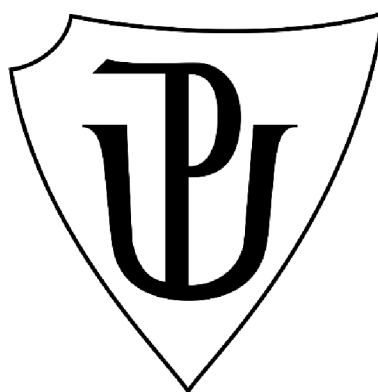


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Imunitní priming hmyzu

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Anna Maňasová**
Studijní program: B0512A130008
Studijní obor: Biochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.**
Rok: 2024

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a 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/a jsem seznámen/a 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

Ráda bych poděkovala Mgr. Jiřímu Danihlíkovi Ph.D. za cenné rady, vstřícnost při konzultacích a odborné vedení mé bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Zuzaně Žvátorové, za trpělivost a zaučení v metodách mé bakalářské práce.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Anna Maňasová
Název práce	Imunitní priming hmyzu
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá studiem imunitního systému hmyzu s konkrétním zaměřením na imunitní priming. Imunitní priming je jedním z málo prozkoumaných mechanismů imunity hmyzu i přesto, že pro některé druhy je tento proces životně důležitý. Hmyz patří mezi bezobratlé živočichy a nedisponuje tak získanou neboli adaptivní imunitou. Díky tomu není schopen vytvářet protilátky a dlouhodobě se bránit proti napadání patogeny. Imunitní priming je relativně nově objevený proces. Jde o vytváření krátkodobé (až 22 dní) imunitní paměti, jejíž obranné mechanismy jsou realizovány buněčnou, a především humorální imunitou. Hlavní myšlenkou této práce je výzkum sekretu hltanových žláz včely medonosné – mateří kašičky. Mateří kašička výrazně ovlivňuje správný vývoj larev a slouží jim nejen jako potrava, ale zajišťuje larvám i částečnou ochranu před patogeny a parazity. Díky jejím antimikrobiálním vlastnostem zvyšuje sterilitu buňky, kde se larva nachází. Zároveň se spekuluje také o možnosti, že mateří kašička slouží jako transportní médium fragmentů mikrobů při imunitním primingu. Cílem této práce je blíže osvětlit význam mateří kašičky ve vývoji larev, dále původ jejich antimikrobiálních vlastností, zapojení do mechanismu imunitního primingu, a nakonec porovnat výsledky analýzy mateří kašičky larev v rozdílných vývojových stádiích.

Praktická část této bakalářské práce se zabývá proteinovou analýzou mateří kašičky odebrané larvám různých vývojových stádií pomocí tří metod – Bradfordově metodě, SDS-PAGE a metodě Western blot. Pomocí Bradfordovy metody byl zjištěn celkový obsah proteinů ve vzorku a následně i obsah proteinů na mikrogram mateří kašičky. Pomocí SDS-PAGE byly tyto proteiny separovány v elektrickém poli podle molekulové hmotnosti a díky poznatkům z předchozích výzkumů bylo možné proteinové složení odhadnout. Metodou Western blot byla v mateří kašičce zjišťována přítomnost AmP (royalisinu, hymenoptaecinu a abaecinu) a proteinu vitellogeninu. Díky této metodě byla poprvé vyloučena přítomnost vitellogeninu v mateří kašičce, což bude hrát důležitou roli při

objasňování mechanismu imunitního primingu u včely medonosné. Dále nebyla prokázána přítomnost AmP hymenoptaecinu a abaecinu. Naopak bylo dokázáno, že AmP royalisin se v mateří kašičce vyskytuje. Tato informace tak hraje zásadní roli při výzkumu vlastností mateří kašičky.

Data získaná v rámci této bakalářské práce mohou být základem pro další a přesnější výzkum této problematiky. Vhodným navázáním by mohla být přesná identifikace proteinového složení mateří kašičky pomocí hmotnostní spektrometrie. Pro vyšší průkaznost změn proteinového složení by bylo vhodné použít vyšší počet vzorků s rovnoměrným zastoupením larev ve vývojových stádiích.

Klíčová slova	Včela medonosná, imunitní priming, mateří kašička, přenos patogenů
Počet stran	76
Počet příloh	-
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname	Anna Maňasová
Title	Immune priming of insects
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

This bachelor thesis deals with the study of the insect immune system with a specific focus on immune priming. Immune priming is one of the understudied mechanisms of insect immunity despite the fact that this process is vital for some species. Insects are invertebrates and thus do not possess acquired or adaptive immunity. As a result, it is unable to produce antibodies and defend itself against pathogen attack in the long term. Immune priming is a relatively newly discovered process. It involves the formation of a short-term (up to 22 days) immune memory, whose defence mechanisms are implemented by cellular and, above all, humoral immunity. The main idea of this work is the investigation of the secretion of the pharyngeal glands of the honey bee - royal jelly. Royal jelly significantly influences the proper development of larvae and serves not only as food, but also provides the larvae with partial protection against pathogens and parasites. Thanks to its antimicrobial properties, it increases the sterility of the cell where the larva is located. It is also speculated that royal jelly serves as a transport medium for microbial fragments during immune priming. The aim of this study is to shed more light on the importance of royal jelly in larval development, the origin of its antimicrobial properties, its involvement in the immune priming mechanism, and finally to compare the results of royal jelly analysis of larvae at different developmental stages.

The practical part of this bachelor thesis deals with the protein analysis of royal jelly collected from larvae of different developmental stages using three methods - Bradford method, SDS-PAGE and Western blot method. The Bradford method was used to determine the total protein content of the sample and subsequently the protein content per microgram of royal jelly. Using SDS-PAGE, these proteins were separated in the electric field according to molecular weight and the protein composition could be estimated thanks to the knowledge from previous studies. The presence of AmP (royalysin, hymenoptaecin and abaecin) and vitellogenin protein was detected in royal jelly by Western blotting. With

this method, the presence of vitellogenin in royal jelly was excluded for the first time, which will play an important role in elucidating the mechanism of immune priming in the honey bee. Furthermore, the presence of AmP hymenoptaecin and abaecin was not demonstrated. In contrast, AmP royalisin was shown to be present in royal jelly. This information thus plays a crucial role in the investigation of royal jelly properties.

The data obtained in this bachelor thesis can be the basis for further and more precise research on this subject. A suitable follow-up could be the accurate identification of the protein composition of royal jelly by mass spectrometry. For higher conclusiveness of changes in protein composition, it would be advisable to use a higher number of samples with an even representation of larvae in the developmental stages.

Keywords	Honeybee, immune priming, royal jelly (beebread), transmission of pathogens
Number of pages	76
Number of appendices	-
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Imunitní systém hmyzu	2
2.1.1	Fyzikální bariéra	3
2.1.2	Buněčná imunita	3
2.1.3	Humorální imunita	4
2.1.3.1	Lektiny	4
2.1.3.2	Lysozym	5
2.1.3.3	Fenoloxidasová kaskáda	5
2.1.3.4	Antimikrobiální peptidy	7
2.1.4	Signální dráhy	8
2.1.4.1	Toll signální dráha	8
2.1.4.2	Imd signální dráha	9
2.1.4.3	JAK/STAT signální dráha	9
2.1.5	Sociální imunita	11
2.2	Stimulace imunitního systému	12
2.2.1	Molekulární vzory asociované s patogeny – PAMPs (Pathogen associated molecular patterns)	12
2.2.1.1	Humorální PRRs	13
2.2.1.2	Buněčné PRRs	14
2.2.2	Molekulární vzory asociované s poškozením – DAMPs (Damage associated molecular patterns)	15
2.3	Imunitní priming	16
2.3.1	Imunitní priming u různých druhů hmyzu	17
2.3.2	Imunitní priming u včely medonosné	18
2.3.2.1	Možné faktory ovlivňující imunitní priming u včel	18
2.3.3	Transstádijní imunitní priming	19
2.3.4	Transgenerační imunitní priming	19
2.3.5	Vitellogenin	21
2.3.6	Očkování včel	21
2.4	Mateří kašička	23
2.4.1	Chemické složení	23
2.4.1.1	Sacharidy	24
2.4.1.2	Proteiny	24
2.4.1.3	Lipidy	25
2.4.1.4	Vitaminy	26

2.4.1.5	Minerální látky a stopové prvky	26
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
3.1	Materiály a přístroje	27
3.1.1	Chemikálie	27
3.1.2	Roztoky	28
3.1.3	Biologický materiál	30
3.1.4	Přístrojové vybavení a pomůcky	30
3.2	Metody.....	32
3.2.1	Úprava biologického materiálu	32
3.2.1.1	Postup odebrání mateří kaše z pláství	32
3.2.1.2	Určení stáří larvy a larválního stádia podle hmotnosti.....	32
3.2.2	Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou.....	33
3.2.3	Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS (SDS-PAGE) 34	
3.2.3.1	Příprava vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu.....	34
3.2.3.2	Příprava gelů	34
3.2.3.3	Průběh elektroforézy	34
3.2.3.4	Fixace, barvení a focení gelů	35
3.2.4	Metoda Western blot	36
3.2.4.1	Průběh detekce vitellogeninu metodou Western blot.....	36
3.2.4.2	Průběh detekce AmP metodou Western blot	37
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
4.1	Informace o biologickém materiálu.....	39
4.2	Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou	40
4.3	Detekce proteinového složení pomocí barviva CBB G-250	42
4.4	Metoda Western blot.....	45
4.4.1	Imunodetekce vitellogeninu	45
4.4.2	Imunodetekce royalisinu	47
4.4.3	Imunodetekce hymenoptaecinu.....	50
4.4.4	Imunodetekce abaecinu	52
5	ZÁVĚR.....	54
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	56
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	66

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Připravit literární přehled poznatků o imunitním primingu hmyzu.
- Zpracovat literární rešerši o mechanismu imunitního primingu v rámci generace i mezigeneračně.
- Zpracovat literární rešerši o imunitním primingu skrz potravu či přenos patogenů.

Praktická část:

- Vyvinout a optimalizovat metody analýzy potravy včely medonosné

1 ÚVOD

Hmyz je mimořádně úspěšná a rozmanitá skupina živočichů, která obývá téměř všechna stanoviště a ekosystémy na Zemi (Leonardi et al., 2012). Hmyz hraje zásadní roli v opylování kvetoucích rostlin, v produkci hedvábí a v některých společnostech může být také zdrojem potravy. Hmyz je také velkou příčinou ztrát na úrodě a plýtvání potravinami a je významným přenašečem infekčních nemocí (např. malárie, horečky dengue nebo nemoci zika), které způsobují vysokou míru nemocnosti a úmrtnosti zejména v rozvojových zemích (Purcell & Almeida, 2004). Úspěch hmyzu byl dříve přičítán jejich rychlým reprodukčním cyklům, jejich relativně krátkému životnímu cyklu a jejich schopnosti rychle se adaptovat na změny v prostředí (Purcell & Almeida, 2004). Nedávný výzkum však upozornil na jejich vysoce efektivní imunitní reakci chránící je před patogeny (Downes, 1965). Imunitní systém hmyzu se skládá z propojených buněčných a humorálních reakcí, které rychle identifikují a zničí invazní patogeny (Ratcliffe, 1985; Vilmos & Kurucz, 1998). Buněčná imunitní reakce je zprostředkována hemocyty, které mohou fagocytovat a zabíjet patogeny nebo zachytávat velké patogeny (např. vajíčka parazitických vos) a imobilizovat je (Boman & Hultmark, 1987).

Při zkoumání hmyzí imunity jsou velmi důležitým hmyzem například včely. Včela medonosná je užitečný hmyz, který přispívá svou opylovací službou k zemědělské produkci. Snížení populace včely medonosné, by se mohlo projevit na nedostatečné produktivitě pěstovaných plodin, a tudíž i k omezenější produkci potravin. Na druhou stranu je nutné říct, že rostliny jsou opylovány i jinými včelami a dalším hmyzem, který do určité míry může včelu medonosnou zastoupit. Nejen dostatečná úroda, ale také včelí produkty, jako je med, propolis, vosk nebo mateří kašička, by byly méně dostupným zbožím, pokud by došlo k poklesu počtu chovaných včelstev.

Z důvodu ohrožení včel různými biogenními a abiogenními stresovými faktory, narůstá na významu výzkum imunity včel. Včelstva jsou často napadána parazity nebo mikroby a v naprosté většině případů je včelař nucen včelstvo zlikvidovat, aby předešel dalšímu šíření.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Imunitní systém hmyzu

Hmyz je velmi úspěšná a rozsáhlá třída bezobratlých živočichů, mezi které patří miliony druhů a žijí ve své podstatě v téměř každém místě naší planety. Bezobratlí živočichové mají obecně vzato jednodušší imunitní systém, než mají obratlovci (Hoffmann & Reichhart, 2002). Ti mají na rozdíl od bezobratlých pro boj s patogeny a parazity dvě zbraně. První zbraní je imunita vrozená. Ta odpovídá na nákazu rychle, ale nikdy cíleně. Příkladem může být likvidace cizorodých buněk makrofágy. Druhou zbraní je imunita získaná nebo jinak specifická. Pod tento typ imunity spadají účinnější, a také specifitější látky a mechanismy. Tyto buňky navíc vytváří imunitní paměť, díky čemuž protilátky rozpoznají a zničí patogena často dříve, než stihne propuknout nákaza.

Za specifické imunitní reakce jsou u obratlovců zodpovědné převážně lymfocyty a funkční imunoglobuliny (Hernández López et al., 2014). Ty u hmyzu zcela chybí, proto vyvstává otázka, jaký je mechanismus obranyschopnosti těchto živočichů.

Přesto, že nebyly u bezobratlých živočichů nalezeny výše zmíněné buňky ani látky zodpovědné za reakce získané imunity u obratlovců byly u některých druhů bezobratlých (především hmyzu) pozorovány imunitní reakce, které se podobaly již dříve zmíněné „imunitní paměti“. Tyto imunitní odpovědi naznačovaly specifitu a byly relativně dobře cílené (Sadd & Schmid-Hempel, 2006; Schmid-Hempel, 2005).

V boji proti patogenům uplatňuje hmyz několik zásadních obranných linií. První překážkou je fyzikální bariéra tzv. kutikula. Další linií je buněčná imunita, následovaná poslední tzv. humorální imunitou. Obě skupiny zahrnují vrozené imunitní reakce (Daníhlík et al., 2015). Tyto tři stupně obrany se řadí do individuální imunity hmyzu. Existuje však i hmyz, který je charakteristický svým sdružováním do kolonií. Takový hmyz označujeme jako sociální. Příkladem může být včela medonosná, na kterou se budu v této práci zaměřovat. Sociální hmyz se sdružuje v relativně malém prostoru, kde dochází k častému kontaktu mezi jedinci, například při komunikaci, předávání potravy nebo při péči o potomstvo. Aby se zabránilo rychlému předávání případné nákazy, vybudovala si jednotlivá společenství řadu návyků a vzorců chování pro udržování čistoty v kolonii, kterým říkáme sociální nebo společenská imunita (Meunier, 2015).

2.1.1 Fyzikální bariéra

Vnější fyzikální bariéra hmyzu je tvořena tvrdou sklerotizovanou kutikulou pokrývající tělo a pružnější kutikulou, která vystylá tracheje a zažívací trakt. Je přirozenou bariérou proti mnoha mikroorganismům a houbám (Siva-Jothy et al., 2005). Existuje však řada organismů, kteří jsou schopni produkovat enzym chitinasu (EC 3.2.1.14) degradující chitin. Tím penetrují vnější kutikulu hmyzu. Větší odolnost před poškozením kutikuly je zajištěna vrstvičkou vosku na povrchu. Nejnáchylnějšími místy pro penetraci je dýchací soustava a spojení mezi jednotlivými články hmyzího těla (Nation, 2021). Dýchací soustava hmyzu je tvořena trachejemi neboli vzdušnicemi. Jsou to kanálky, které přímo zásobují tkáň vzdušným kyslíkem. Stěna trachejí je velmi tenká a pro organismus, který se se vzduchem dostane na její povrch, je velmi snadné skrze ni proniknout.

Hmyz je také často napadán mikroorganismy v potravě. Na povrchu stěny předního a středního střeva je tenká chitinová výstelka, která chrání střevní epitel před nakažením. Střední střevo je ale zranitelnější, proto se na jeho povrchu nachází ještě nepřiléhavá peritrofičká membrána jako další ochranný prvek. Tato membrána je složena z chitinu a proteinů. Chrání kartáčkový povrch středního střeva nejen před ostrými kousky potravy ale i před nebezpečnými mikroorganismy (Lehane, 1997).

2.1.2 Buněčná imunita

Reakce buněčné imunity jsou iniciovány obvykle epiteliálními buňkami pod kutikulou, hemocyty v hemolymfě, buňkami tukového tělíska a epiteliálními buňkami vystylající střeva bezprostředně po proniknutí patogena. Cizí objekt je následně napaden a zlikvidován (Tan et al., 2013).

Mechanismus imunitní reakce na buněčné úrovni je následující. Po rozpoznání patogena a iniciaci k imunitní odpovědi, která byla zmíněna v předchozím odstavci, se nastartuje proliferace hemocytů. Ty jsou ve zvýšeném počtu schopny efektivní likvidace a potlačení nákazy fagocytózou nebo enkapsulací. Hemocyty během reakce produkují nejen srážlivé látky, ale i zymogen profenoloxidasu, který je aktivován na fenoloxidasu. Tento enzym následně spouští fenoloxidasovou kaskádu, která již patří do imunity humorální (Nation, 2021).

Fagocytóza je hlavním procesem uplatňovaným hemocyty, při odstraňování menších cizorodých částic. Hemocyt pohltní tuto částici dovnitř své vlastní buňky. Zde je následně částice rozložena pomocí enzymů jako jsou lysozymy, elastasy, fosfatasy, fosforylasy, peroxidasy a proteasy. (Estrada et al., 2016). Při zneškodňování větších objektů a shluků

těch menších, je však fagocytóza neúčinná. Zde přichází na řadu tzv. nodulace a enkapsulace (Gillespie et al., 1997). Hemocyty se zformují do shluků a následně dochází k enkapsulaci nebezpečného objektu. Tímto procesem je částice izolována a zneškodněna (Pech & Strand, 2000).

Správné fungování buněčné imunity je pro hmyz zásadní. Například larvy octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) úspěšněji rozpoznávají i zapouzdřená vajíčka parazita *Asobara tabida* díky nadbytečnému množství hemocytů (Nation, 2021). Hemocyty těchto larev rozdělujeme na tři typy; plasmocyty, lamellocyty a krystalické buňky. Avšak více než na samotném množství hemocytů závisí na poměru všech tří typů hemocytů. Funkcí plasmocytů je fagocytóza mrtvých buněk a mikrobiálních patogenů. Lamellocyty zapouzdřují části větších objektů a krystalické buňky produkují fenoloxidasu (PO) (EC 1.10.3.1). Produkce této látky je důležitá pro zapouzdření cizorodých látek a při hojení ran (Castillo et al., 2011).

2.1.3 Humorální imunita

Humorální neboli látková imunita je soubor aktivních molekul imunitního systému, které vyvolávají jeho specifické obranné reakce u hmyzu. Mezi hlavní aktivní látky humorální imunity řadíme lektiny, hydrolytický enzym lysozym (EC 3.2.1.17), fenoloxidasu, reaktivní meziprodukty kyslíku a dusíku, prozánětlivé cytokiny a antimikrobiální peptidy (Nappi et al., 1993). Hlavním zdrojem antibakteriálních a antimykotických peptidů jsou buňky tukového tělíska, částečně se na jejich tvorbě podílejí i hemocyty, epitelové buňky střeva a epidermální buňky pod kutikulou (Laughton et al., 2011).

Tukové tělísko je významným orgánem. Zastupuje nejen důležitou roli v imunitním systému, ale slouží také jako hlavní zásobovací orgán a je zde uloženo velké procento tělesných rezerv (Costa-Leonardo et al., 2013). Jeho další funkcí je i zajištění správného chodu celkového metabolismu a je velmi důležitý při detoxifikaci organismu. Poté, co dojde k postřehnutí patogena v organismu se pomocí proteinů s rozpoznávací funkcí aktivují signální dráhy Toll, IMD a JAK/STAT, které vedou k aktivaci genů kódujících tvorbu antimikrobiálních peptidů (AmP) (Nation, 2021). Mezi tyto se řadí například apidaecin, abaecin, hymenoptaecin nebo defensiny (Lima & Brochetto-Braga, 2003; Yi et al., 2014).

2.1.3.1 Lektiny

Jelikož se u bezobratlých živočichů nevyskytují látky na bázi protilátek, hrají lektiny významnou roli při rozpoznávání cizích organismů. Molekuly lektinů fungují jako PRR

(pattern recognition receptor), neboli rozpoznávací receptory molekulových vzorců (Nation, 2021; Wilson et al., 1999).

Lektiny se navazují na specifické sacharidové sekvence na povrchu patogena, a tak lokalizují místo pro imunitní odpověď. Jsou schopny zvýšit míru aktivace profenoloxydasy (proPO) (EC 1.14.18.1) a fenoloxidasové kaskády. Jejich funkce je zapojena také do procesu nodulace, enkapsulace a fagocytózy (Wilson et al., 1999).

Existuje několik druhů lektinů, které se od sebe vzájemně liší sacharidovou sekvencí, na kterou jsou schopny se navázat. Tato vlastnost má vliv na rozlišování cizorodých buněk jako jsou kvasinky, grampozitivní a gramnegativní bakterie, podle odlišných sacharidů na povrchu jejich buněk (Wilson et al., 1999). Jedním z typů lektinů nacházejících se hemolymfě je lektin typu C. Vazebná aktivita tohoto lektinu je podmíněna přítomností vápenatých iontů (Nation, 2021).

2.1.3.2 Lysozym

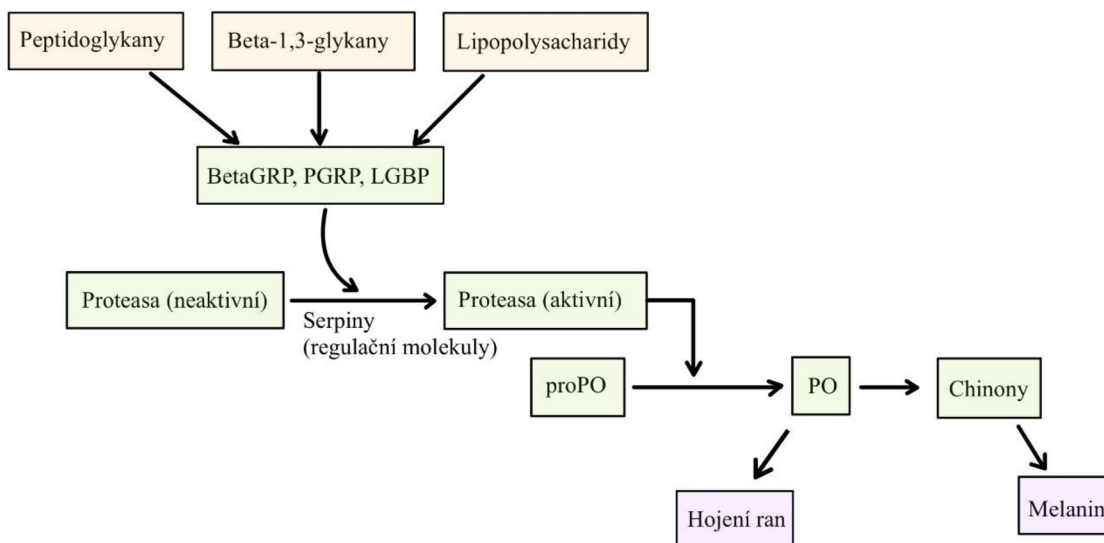
Enzym lysozym, který ve svém aktivním místě obsahuje aminokyselinové zbytky kyseliny glutamové a asparagové, efektivně narušuje strukturu mureinu a chitinu. Peptidoglykan murein je základní stavební složkou buněčné stěny bakterií. Chitin zastává stejnou funkci v buněčné stěně hub. Lysozym hydrolyticky štěpí β -(1,4)-glykosidovou vazbu mezi molekulami N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetylglukosaminem a tím dochází k rozpadu buněčné stěny nepřátelského mikroorganismu a k jeho likvidaci (Callewaert & Michiels, 2010; Casteels et al., 1990; Nation, Sr., 2021).

2.1.3.3 Fenoloxidasová kaskáda

Fenoloxidasa (PO) je enzym zodpovědný za aktivaci procesu melanizace u bezobratlých živočichů a za sklerotizaci jejich vnější schránky (Sussman, 1949; Wyatt, 1961). Vyžaduje složitý aktivační a inhibiční systém. Neaktivním prekurzorem je zymogen profenoloxidasa (proPO) (Nation, 2021).

Hemolymfa obsahuje několik druhů PRR, například β -1,3-glucan recognition protein (β GRP), lipopolysaccharide and β -1,3-glucan-binding protein (LGBP) a peptidoglykan recognizing protein (PGRP), které dokáží zaznamenat přítomnost molekulárních vzorů spojených s poškozením (DAMPs) a molekulárních vzorů spojených s patogenem (PAMPs). Mezi PAMPs patří β -1,3-glukany, lipopolysacharidy a peptidoglykany nacházející se na povrchu cizorodých mikroorganismů (Nation, 2021). Díky reakcím PRR na PAMPs a DAMPs dochází k aktivaci serin-proteasové kaskády. V této dráze dochází k přeměně neaktivní proteasy na její aktivní formu. Aktivní proteasa štěpí proPO

za vzniku aktivních forem PO. Poté následuje fenoloxidasová kaskáda a tvorba melaninu (Viz obrázek 1) (Dubovskiy et al., 2016; Nation, 2021).



Obr. 1: Zjednodušené schéma stimulace imunitního systému látkami buněčné stěny cizorodých mikroorganismů, aktivace PO díky serin proteasové kaskádě a vzniku pigmentu melaninu. Obrázek byl převzat od (Nation, 2021) a následně upraven.

Fenoloxidasová kaskáda je jedna z významných biochemických drah imunitního systému hmyzu. Mezi meziprodukty patří například chinony, reaktivní formy dusíku (RNS), reaktivní formy kyslíku (ROS) nebo difenoly (Dubovskiy et al., 2016; Nation, Sr., 2021).

Nejdůležitější látkou je z hlediska humorální imunity koncový produkt melanin. Je zodpovědný nejen za pigmentaci schránky těla hmyzu, ale díky procesu melanizace dokáže zacelit a zhojit rány. Zabráni se tak možnému proniknutí infekce (Gruna et al., 2022). Principem melanizace je hromadění melaninu v místě poranění a tím se rána postupně zacelí. Tento proces můžeme alespoň z části přirovnat ke kaskádě vyvolávající srážení krve u člověka. Další obranná vlastnost melaninu je schopnost enkapsulace cizorodých částic. Pokud tedy dojde k nákaze houbou nebo bakterií, imunitní systém se aktivuje a pomocí melaninu a hemocytů vytvoří na povrchu buněk patogenů silnou vrstvu. Tvorbu aktivní formy enzymu fenoloxidasu je potřeba kontrolovat a regulovat její aktivitu. To se děje pomocí regulačních molekul serpinů (serin-proteasové inhibitory) (Cerenius & Söderhäll, 2004; Fujimoto et al., 1993; Piñera et al., 2013; Tokura et al., 2014).

Melanin vzniká z aminokyseliny fenylalaninu, která je nejprve hydroxylována na tyrosin enzymem fenylalaninhydroxylasou (EC 1.14.16.1). Hydroxylací tyrosinu aktivní

formou PO vzniká prekurzor dopaminu DOPA (L-3,4-dihydroxyfenylalanin). DOPA se oxiduje na dopachinon a ten se spontánní neenzymatickou reakcí okamžitě přeměňuje na DOPAchrom. Neenzymatickou strukturní přestavbou DOPAchromu a následnou dekarboxylací vzniká 5,6-dihydroxyindol (DHI). Tato molekula je posléze oxidována PO za vzniku 5,6-indolchinonu. Nakonec jsou vzniklé indolchinony polymerovány na eumelanin, nebo v přítomnosti thiolových sloučenin na feomelanin (Dubovskiy et al., 2016). Obě formy se zapojují do procesu melanizace (Dubovskiy et al., 2016). Případně může být DHI tvořen alternativní cestou, kdy je DOPA dekarboxylována na dopamin enzymem DOPAdekarboxylasou (EC 4.1.1.28) (Nation, Sr., 2021).

2.1.3.4 Antimikrobiální peptidy

Další ze stěžejních molekul humorální imunity jsou antimikrobiální peptidy (AmP). Po analýze hemolymfy včely medonosné bylo rozpoznáno sedm rozdílných AmP: apidaeciny (3 isoformy 1a, 1b, 2), abaecin, hymenoptaecin, defensiny (1 a 2), jelleiny (1, 2 a 4) a apidaecin (Daníhlík et al., 2015; Li et al., 2012).

Apidaecin se vyskytuje ve třech isoformách. To je způsobeno přítomností třech kódujících sekvencí ve včelím genomu. Jednotlivé isoformy se od sebe liší malými rozdíly v primární struktuře (například záměnou jedné aminokyseliny v celé sekvenci) (Casteels et al., 1989).

Zatímco apidaeciny jsou účinné hlavně proti grampozitivním bakteriím abaecin prokazuje stejnou efektivitu účinku proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Některé grampozitivní bakterie si vybudovali rezistenci vůči apidaecinům. V tomto případě slouží abaecin jako pojistka, jelikož na tento AmP se rezistence nevztahuje (Casteels et al., 1990).

Defensin-1 obsažený v hemolymfě je svou primární strukturou velice podobný na AmP royalisin, který se byl analyzován v mateří kašičce. Rozdílem je pouze záměna aminokyselin v poloze 50 (Casteels-Josson et al., 1994).

AmP byly nalezeny i v již dříve zmíněné mateří kašičce a ve včelím jedu. Royalisin, jellein 1, 2 a 4 jsou složkami mateří kašičky. Ve včelím jedu pak tvoří významný podíl (40-60 %) mellitin, dále je to neurotoxický AmP apamin a degranulační peptid mastocytů (Hellgren et al., 2010).

Důležitou vlastností AmP je jejich kladný náboj. Díky němu je molekula schopna změnit membránový potenciál na buňce patogena a tím jej zahubit. Dokáže se také navazovat na membránu nebo jí přímo proniknout a tím opět zapříčinit smrt nepřátelského

mikroorganismu (Li et al., 2012). Rozdělení jednotlivých AmP je zaznamenáno v tabulce 1.

Tab. 1: Přehled jednotlivých AmP spolu s informacemi o délce řetězce a výskytu v těle včely medonosné. Tabulka byla převzata a upravena (Daníhlík et al., 2015).

Antimikrobiální peptid	Obsažen v	Počet aminokyselin v řetězci	Zdroj
Apidaecin 1a	Hemolymfa	18	(Casteels et al., 1989)
Apidaecin 1b	Hemolymfa	18	(Casteels et al., 1989)
Apidaecin 2	Hemolymfa	18	(Casteels et al., 1989)
Apidacin	Hemolymfa	18	(Daníhlík et al., 2015)
Abaecin	Hemolymfa	34	(Daníhlík et al., 2015)
Defensin 1	Hemolymfa	51	(Casteels-Josson et al., 1994)
Defensin 2	Hemolymfa	85	(Casteels-Josson et al., 1994)
Hymenoptaecin	Hemolymfa	93	(Casteels et al., 1993)
Jellein 1	Mateří kašička	8	(Evans et al., 2006)
Jellein 2	Mateří kašička	9	(Evans et al., 2006)
Jellein 4	Mateří kašička	8	(Evans et al., 2006)
Royalisin	Mateří kašička	51	(Casteels-Josson et al., 1994)
Apamin	Včelí jed	18	(Lima & Brochetto-Braga, 2003)
Melitin	Včelí jed	26	(Lima & Brochetto-Braga, 2003)
Degradační peptid mastocystů	Včelí jed	22	(Lima & Brochetto-Braga, 2003)

2.1.4 Signální dráhy

Každá reakce imunitního systému je odpovědí na určitý podmět neboli stimul. Jako stimuly můžeme označit molekuly nebo struktury nacházející se převážně na povrchu nepřátelských mikroorganismů, nebo jimi mohou být vylučovány. Pokud se tělo setká s těmito podměty, spustí se signální dráhy, které následně aktivují příslušnou imunitní odpověď (Nation, 2021).

U hmyzu se setkáváme se čtyřmi základními signálními drahami. Je to signální dráha Toll, Imd a JAK/STAT signální dráha (Evans et al., 2006). Schéma stimulace imunitního systému pomocí těchto drah je zaznamenáno na obrázku 2.

2.1.4.1 Toll signální dráha

Stimulem ke spuštění Toll signální dráhy je nákaza grampozitivními bakteriemi nebo houbami. Především se jedná o reakci na přítomnost PGRP a β GRP a proteas, které regulují (Hillyer et al., 2003).

K transdukci signálu dochází při navázání C-koncové části proteinu Spätzle na dimerní transmembránový Toll signální protein. Po navázání dochází k asociaci s komplexem Myd88 (Myeloid differentiation primary response 88) pomocí TIR domén (Toll-interleukin receptor). Myd88 se naváže na komplex Tube a poté dochází a aktivaci kinasy Pelle. Dalším krokem této dráhy je fosforylace a ubikvitinace proteinu Cactus. Díky ubikvitinaci je tento protein označen a je následně degradován. Tím dojde k uvolnění Dorsal faktorů. Tyto se translokují do jádra a zde spustí expresi antimikrobiálních peptidů (Royet et al., 2005).

2.1.4.2 Imd signální dráha

Imd (immune deficiency pathway, česky dráha imunitní nedostatečnosti) je signální dráha reagující na přítomnost gramnegativních bakterií, lépe řečeno na peptidoglykany s kyselinou diaminopimelovou a viry (Hillyer et al., 2003; Hultmark, 2003; Werner et al., 2003).

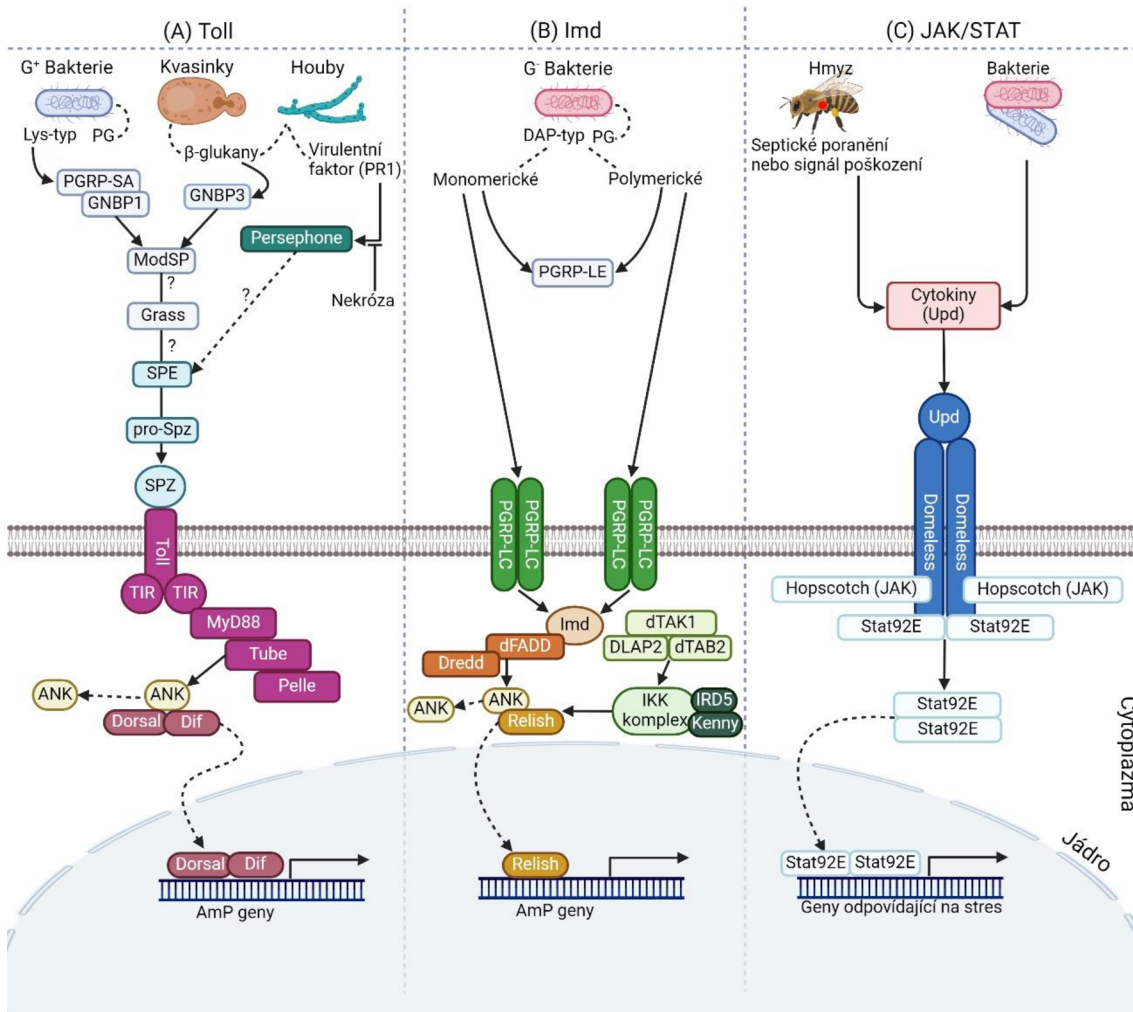
Ve většině případů je stimulem pro spuštění Imd dráhy vazba peptidoglykanů nepřátelské buňky na receptory buněk hostitelského organismu (PGRPs). Vytvoří se komplex Imd s FADD (Fas-asociovaný protein smrtící doménou) a DREDD proteinem. DREDD protein rozštěpí IMD. Ten je následně ubikvitinován. Pomocí polyubikvitinových řetězců je připojen i TAB 2 (vazebný protein 2 spojený s TAK 1). Dojde k aktivaci TAK 1 (transformovaný růstový faktor beta aktivovaný kinasou 1). TAK 1 je zodpovědný za aktivaci komplexu IKK. Komplex IKK následně fosforyluje jaderný faktor Relish. Tento faktor je následně translokován do jádra hostitelské buňky a je zde spuštěna syntéza AmP. Může vést i k apoptóze (Rembold et al., 1980).

2.1.4.3 JAK/STAT signální dráha

JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcriptions) je signální dráha zodpovědná za regulaci kaskády imunitních reakcí. Spouští produkci proteinů s imunitní aktivitou v tukovém tělese. Hlavní roli zde hrají Janus kinasy (JAK) a aktivátory transkripce (STAT). Dále se zde vystupuje Upd ligand a receptor Dome. U včel byla nalezena výjimka, Upd ligand je u nich nahrazen zatím neznámým ligandem (Nation, 2021).

Jedná se o signální dráhu, která reaguje na stimulaci bakteriemi nebo viry. Nejprve dojde k navázání ligandu na receptor Dome. Ten se následně dimeruje. Přítomné JAK kinasy fosforylují specifická tyrosinová residua. Dojde tak k vytvoření dokovacího místa pro STAT, ze kterých se poté také stávají dimery. Následně dojde k oddělení a celé

uskupení putuje do buněčného jádra, kde nesou zodpovědnost za zvýšení proliferace hemocytů (Evans et al., 2006).



Obr. 2: Schématické znázornění jednotlivých signálních drah vrozené imunity hmyzu a imunitních odpovědí vyvolaných přítomností bakterií, hub, kvasinek nebo poraněním. (A) Toll signální dráha je odpověď na přítomnost G^+ bakterií, β -glukanů (jsou obsaženy v buněčné stěně kvasinek) a virulentního faktoru u hub. Po této aktivaci dochází ke kaskádě reakcí, při kterých se uvolňuje řada proteinů. Některé z těchto procesů nejsou zatím známy a jsou označeny otazníkem. Důležitým krokem je aktivace ligandu Speatzle (SPZ) pomocí Speatzle-processing enzymu (SPE). Transmembránový Toll receptor je aktivován navázáním aktivovaného ligandu SPZ. Výsledkem je uvolnění, translokace do jádra a následné navázání transkripčních faktorů Dorsal a Dif. Tím dochází k expresi genů pro AmP. (B) Popisuje signální dráhu IMD, která je spuštěna jako reakce na přítomnost G^- bakterií díky receptorům PGRP-LC a PGRP-LE. Opět dochází k řadě reakcí, které vyústí navázáním transkripčního faktoru Relish, díky čemuž je opět aktivována transkripce genů pro AmP. (C) Aktivace signální dráhy JAK/STAT probíhá při septickém poranění nebo při bakteriální infekci. Dojde k vazbě cytokinů Unpaired (Upd) na cytokinový receptor Domeless a dochází k dimerizaci transkripčního faktoru Stat92E. Tento pak spustí transkripci expresi genů odpovídajících na stres. Obrázek byl převzat a upraven (Zhang et al., 2021).

2.1.5 Sociální imunita

Včela medonosná, jako zástupce sociálního hmyzu, tvoří včelstva dosahující až 50 000 jedinců i více. Celá kolonie přitom obývá velmi malý prostor, to poskytuje ideální podmínky pro rychlý přenos patogenů a parazitů (Hernández López et al., 2014; Cornman et al., 2012). A nejde jen o vysokou hustotu včel v úlu. Dalším aspektem zvyšujícím riziko nakažení je komunikace, předávání potravy (trofalaxe) a péče o potomstvo. Včely jsou si vzájemně velmi blízké a komunikují spolu dotekem. Aby se snížilo riziko nákazy, prokázaly včely vysokou úroveň sociálního chování a veškerý dříve zmíněný kontakt je přísně kontrolován (Hernández López et al., 2014). Pro vyšší ochranu včelstva před nákazami praktikují včely tzv. grooming. To znamená, že v úlu je přísně dodržována hygiena a pořádek. Pravidelně je čištěno dno úlu, kde se mohou hromadit nečistoty nebo mrtvé včely. Důležitý je i úklid buněk před vložení vajíčka a kontrola, zda není nakažený plod a pokud ano, je zlikvidován. Velmi zásadním faktorem pro udržování čistoty v kolonii je kálení mimo úl. Pokud je včelstvo zdravé nikdy nekálí uvnitř úlu (Božič a Valentinčič, 1995). Čistota je udržována i u samotných včel. Včely si pomocí nožek čistí své tělo od prachu, pylu nebo jiných nečistot. Ne všechny nečistoty zvládne však včela očistit sama. Proto mezi sebou uplatňují tzv. allogrooming. Tento pojem označuje chování většinou sociálních druhů zvířat, které se mezidruhově nebo v rámci svého druhu navzájem čistí. U včel se s allogroomingem pojí i další pojem a to groomdance. Včela se začne rychle pohupovat „tančit“. Jedna z okolních včel následně zareaguje a začne tančící včelu čistit (Pettis a Pankiw, 1998).

2.2 Stimulace imunitního systému

Většina projevů imunitního systému je výsledkem kaskádových interakcí mezi signálními molekulami, které se vyskytují na povrchu nepřátelského organismu, nebo jsou jimi vylučovány, a receptory uvnitř hmyzího těla. Různé skupiny organismů napadající tělo hmyzu disponují různými signálními molekulami. Příkladem mohou být grampozitivní a gramnegativní bakterie, které díky jinému složení buněčné stěny spouští i různé signální dráhy. Díky těmto odlišnostem je tělo hmyzu schopno díky různým receptorům spustit rozdílné signální dráhy, na jejichž konci je mechanismus schopný tento patogen zneškodnit nebo zabít. Avšak imunitní systém je mnohem komplexnější a nestará se tak jen o odstranění nežádoucích cizorodých organismů a látek, ale i o hojení ran. Příkladem mechanismu, který je uplatňován jak při likvidaci patogenů, tak i při regeneraci zranění, je melanizace spojená s fenoloxidasovou kaskádou (viz kapitola 2.1.3.3 Fenoloxidasová kaskáda) (Lemaitre & Hoffmann, 2007; Zhang et al., 2021).

2.2.1 Molekulární vzory asociované s patogeny – PAMPs (Pathogen associated molecular patterns)

Rozpoznávání cizorodých látek a organismů, které následně iniciuje obranné reakce vrozeného imunitního systému hmyzu, je regulováno receptory rozpoznávající specifické vzory (PRRs). Tyto receptory mohou být volné, ale i vázané na buněčnou membránu (Kurata, 2014; Lemaitre & Hoffmann, 2007; Melcarne et al., 2019; Wang et al., 2019). PRRs se vážou na specifické molekulární motivy nazývané PAMPs. Nalezneme je na povrchu mikroorganismů jako jsou bakterie, kvasinky nebo houby. PAMPs fungují jako silné imunostimulační faktory pro buněčné i humorální imunitní odpovědi. Hlavní složku buněčné stěny většiny bakterií představuje peptidoglykan (PGN) a je tak i hlavním ukazatelem pro imunitní systém na přítomnost bakterií. PGN je polymer tvořen střídavě N-acetylmuramovou kyselinou (MurNAc) a N-acetylglukosaminem (GlcNAc) s β -1,4-vazbou. Tyto řetězce jsou zkříženy krátkými peptidovými stonky složenými ze střídavých L- a D-aminokyselin prostřednictvím lacylamidové vazby. Vzhledem k tomu, že uhlovodíková kostra je zachována, mezi bakteriemi (s výjimkou de-N-acetylovaných nebo O-acetylovaných variant) má peptidová složka značnou rozmanitost. Podle zbytku na pozici 3 peptidových stonků jsou PGN rozděleny do dvou hlavních kategorií: L-lysin typ (Lys-typ) a m-diaminopimelová kyselina typ (Dap-typ) (Schleifer & Kandler, 1972). Obvykle jsou peptidové stonky Dap-typu přímo zkříženy, zatímco peptidové stonky Lys-typu jsou propojeny peptidovým mostem, který se liší délkou a složením aminokyselin u

různých bakterií. Navíc se bakterie značně liší v rozsahu zkřížení, čímž se do PGN struktury vnáší další rozmanitost (Gan et al., 2008). Humorální PRRs pro hlavní PAMPs byly identifikovány u hmyzu; nicméně, o buněčných PRRs je známo málo (Gillespie et al., 1997; Hillyer, 2016). Rozpoznání mikrobiálního útočnicka díky navázání humorálních PRRs na PAMPs je proces známý jako opsonizace (Myllymäki & Rämetsä, 2014; Valanne et al., 2011).

2.2.1.1 Humorální PRRs

Mezi humorální PRRs řadíme převážně proteiny vylučované hemocyty a tukovým tělískem, které cirkulují v hemolymfě (Stokes et al., 2015).

Mezi takové se řadí například C-type lektiny. Tyto proteiny obohacené o vápník se navazují na sacharidy jako například lypopolysacharidy, lipoteichovou kyselinu a β -1,3-glukan. Účastní se také reakcí vrozené imunity jako je fagocytóza, nodulace, závěrečné fáze enkapsulace a aktivace proPO (Manning et al., 2017; Mayer et al., 2017; Zelensky & Gready, 2005; Zhu et al., 2020).

Proteiny obsahující thioester (Thioester-containing proteins TEPs) jsou sekreční glykoproteiny představující hlavní složku vrozené imunitní odpovědi proti invazi mikroorganismy (Blandin & Levashina, 2004; Eleftherianos & Sachar, 2020; Shokal & Eleftherianos, 2017a). Jsou příbuzné savčím α 2-makroglobulinům, které vytvářejí kovalentní vazby na bakteriální povrchy prostřednictvím thiol-esterových vazeb. Podporují fagocytózu, lyzi a melanizaci mikrobů (Eleftherianos & Sachar, 2020; Shokal & Eleftherianos, 2017a, 2017b; Stroschein-Stevenson et al., 2006). TEPs jsou exprimovány v tukovém tělisku a hrají roli při aktivaci a regulaci signálních drah Toll, Imd a JAK/STAT (Royet et al., 2005; Shokal & Eleftherianos, 2017b).

Proteiny rozpoznávající peptidoglykany (PGRPs) jsou výrazně konzervované molekuly vrozené imunity. Tyto molekuly můžeme dělit na katalytické PGRPs a nekatalytické PGRPs. Ty katalytické vykazují amidasovou aktivitu, která odstraňuje peptidy z PGN řetězců a fungují jako modulátory signálních drah. Nekatalytické PGRPs jako například PGRP-SA, PGRP-LC a PGRP-LE postrádají amidasovou aktivitu a místo toho se na PGN navazují. Tyto molekuly jsou exprimovány v tkáních spojených s imunitní funkcí. Může jí být například tukové tělísko, střevní epitel a hemocyty (Anselme et al., 2006; Liu et al., 2018; Werner et al., 2000; Yoshida et al., 1996).

Dalšími takovými proteiny jsou GNBPs neboli proteiny vážící se na buněčnou stěnu gramnegativních bakterií a β GRPs neboli proteiny rozpoznávající β -1,3-glukany. Ty

mohou interagovat s C-type lectiny a PGRPs, které se vážou na polysacharidy na povrchu mikroorganismů (Ma & Kanost, 2000; Takahashi et al., 2014).

2.2.1.2 Buněčné PRRs

Buněčné nebo jinak na membránu navázané PRRs jsou zapojeny do reakcí proti mikrobům, pomocí hemocytů. Podílejí se ale i na humorálních imunitních reakcích (Toll receptory, PGRP-LC, atd). Některé z těchto receptorů mají přímé homology u savců, jiné jsou charakteristické jen pro hmyz (Melcarne et al., 2019; Nazario-Toole & Wu, 2017; Wang et al., 2019).

Jedním z nejvíce konzervovaných buněčných receptorů, který můžeme najít od hmyzu po člověka, je Scavenger receptor SR dSR-CI a představuje jednu z nejprimitivnějších forem rozpoznávání bakterií. Mezi scavenger receptory se řadí i receptor Paste. Ten ale rozpoznává pouze některé intracelulární bakterie (Bowdish & Gordon, 2009; Pearson et al., 1995; Philips et al., 2005).

Transmembránový receptor Eater je exprimován v plasmacytech (druh hemocytů) a rozpoznává širokou škálu patogenů a zprostředkovává fagocytózu široké škály bakterií u *Drosophila melanogaster* (Shiratsuchi et al., 2012).

Další transmembránový receptor Nimrod je si s receptorem Eater velmi podobný. Je to fagocytický receptor v plasmacytech nejen u *Drosophila melanogaster*, ale například i u včely medonosné (*Apis mellifera*) (Bork et al., 1996; Melcarne et al., 2019).

U *Antheraea myllita* (bourec morušový) byl identifikován receptor Noduler, který se specificky váže na lipopolysacharidy, lipoteichovou kyselinu a β -1,3-glukany. Jak je již z názvu patrné, spouští nodulační signální dráhu (Gandhe et al., 2007).

Dalšími z důležitých receptorů je PGRP-LC a jeho koreceptor PGRP-LE, které se velmi významně podílejí na aktivaci Imd signální dráhy gramnegativními bakteriemi. U *Drosophila melanogaster* spouští expresi genu pro AmP diptericin, který účinně působí proti gramnegativním bakteriím (Kurata, 2014).

Toll receptor charakteristický pro Toll signální dráhu je exprimován v tukovém tělísku, hemocytech a střevě. Pro jeho primární strukturu jsou charakteristické úseky bohaté na leucin. Po navázání ligandu Speatzle dochází k aktivaci Toll signální dráhy a je spuštěna exprese genu pro AmP působící proti kvasinkám, houbám a grampozitivním bakteriím (Ao et al., 2008; Zhong et al., 2012).

Mezi další buněčné PRRs u hmyzu můžeme zařadit například receptor Dscam (Down syndrome cell-adhesion molecule), integriny, scavenger B receptor Croquemort a fagocytický receptor Drapper (Zhang et al., 2021).

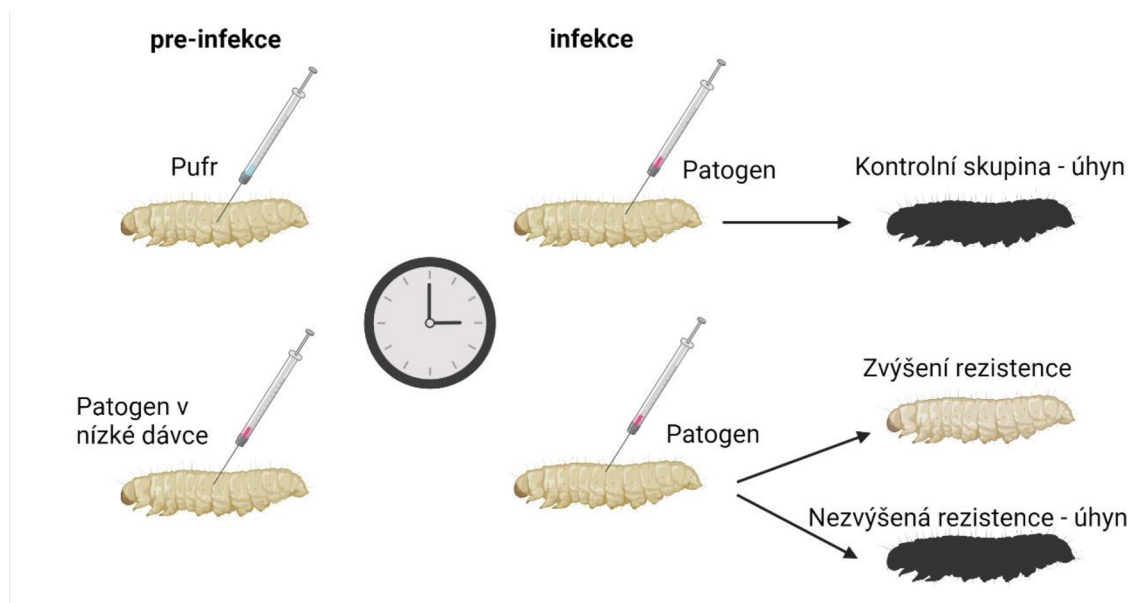
2.2.2 Molekulární vzory asociované s poškozením – DAMPs (Damage associated molecular patterns)

DAMPs neboli molekulární vzory asociované s poškozením jsou endogenní signální molekuly označující nebezpečí pro tělo organismu. Tyto molekulární vzory jsou uvolňovány buňkami při reakci na stres nebo poškození. Vyvolávají aseptickou zánětlivou reakci bez infekce a indukují tak přirozenou imunitní odpověď, která je podobná odpovědi na přítomnost PAMPs (Jentho & Weis, 2021; Roh & Sohn, 2018). Během posledních 30 let bylo objeveno přes 30 typů DAMPs vyskytujících se mimo buňku (například kyselina hyaluronová nebo fibrinogen), v cytosolu (S100 proteiny – malé 10-12 kDa, schopny vázat vápník) nebo například v endoplasmatickém retikulu (kalretikulin) (Roh & Sohn, 2018). Novým druhem DAMPs u hmyzu je dorsální přepínačový protein 1 (DSP1) a byla potvrzena jeho účast na aktivaci imunitní odpovědi u blýskavky červcovité (*Spodoptera exigua*) proti *Bacillus thuringiensis* (Bt). Nejdříve se předpokládalo, že DAMPs pocházejí z již mrtvých buněk, ale bylo dokázáno, že jsou vylučovány i živými buňkami v reakci na stresovou situaci (Ahmed et al., 2022; Decoville et al., 2001; Hrithik et al., 2023; Mollah et al., 2021; Mosrin-Huaman et al., 1998; Roy et al., 2022).

2.3 Imunitní priming

Navzdory absenci mechanismů klasické imunitní paměti má imunitní systém hmyzu velké adaptabilní schopnosti, které jim umožňují přizpůsobit se měnícím se environmentálním podmínkám a efektivně bojovat proti patogenům (Cooper a Eleftherianos, 2017). Jednou z nejzajímavějších adaptabilních schopností pozorovaných u hmyzu je imunitní priming. Imunitní priming je složitý dynamický proces, který představuje klíčový mechanismus v obranných strategiích mnoha organismů včetně hmyzu. Tento proces umožňuje imunitnímu systému „zapamatovat“ si předchozí vystavení patogenům, jejich molekulárním vzorům nebo neletálním infekcím a přizpůsobit svou reakci na budoucí opětovné nakažení (Cooper & Eleftherianos, 2017). Na obrázku 3 je vidět, jak probíhá vyvolání imunitního primingu v *in vitro* podmínkách.

U hmyzu, který je klíčovou součástí ekosystému, se imunitní priming jeví jako zásadní složka jeho obranných mechanismů. Výzkum na zavíječi voskovém (*Galleria mellonella*) a *Drosophila melanogaster* ukazuje, že tyto organismy vykazují zvýšenou odolnost vůči patogenům po předchozí neletální infekci, což je projevem imunitního primingu. Tento způsob adaptace imunitního systému je důležitý pro další vývoj v oblastech ekologie, evoluční biologie nebo lékařství a veterinárního lékařství. Porozumění mechanismům imunitního primingu může přinést hlubší náhled do toho, jak se organismy přizpůsobují a reagují na různorodé patogenní výzvy, a může napomoci vývoji nových strategií pro ochranu proti nemocem v širším spektru ekosystémů (Ardia et al., 2012; Chamilos et al., 2012).



Obr. 3: Schématické znázornění designu výzkumu vyvolaného imunitního primingu v *in vitro* podmínkách. Obrázek byl převzat a upraven (Sulek et al., 2021).

Imunitní priming je komplexní proces, který zahrnuje několik molekulárních a buněčných mechanismů, které umožňují hmyzu rychle a efektivně reagovat na patogeny nebo škodlivé látky. Tyto mechanismy zahrnují: rozpoznávání patogenů, následné spuštění signálních drah (Toll, Imd, JAK/STAT), buněčnou imunitní odpověď (zvýšená diferenciací prehemocytů, melanizace, nodulace nebo fagocytóza) a imunitní paměť (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Všechny tyto mechanismy jsou již detailněji popsány výše v kapitole o imunitě hmyzu a o stimulaci imunitního systému.

2.3.1 Imunitní priming u různých druhů hmyzu

Vytváření a rozšiřování imunitní paměti je při obraně proti patogenům zásadní. Proto se mechanismus tohoto procesu zkoumá už od 30. let 20. století. Imunitní priming byl prokázán u celé řady druhů hmyzu a mnoha mikroorganismů, kteří tento hmyz napadají. Příklady některých druhů hmyzu s potvrzenou schopností imunitního primingu jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2: Vybrané druhy hmyzu, u kterých byl potvrzený imunitní priming. Tabulka byla převzata od (Contreras-Garduño et al., 2016) a byla upravena.

Sledovaný subjekt	Patogen	Měřená odpověď	Zdroj
čmelák zemní (<i>Bombus terrestris</i>)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Přežití	(Sadd et al., 2005)
octomilka obecná (<i>Drosophila melanogaster</i>)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Přežití	(Pham et al., 2007)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Přežití, zvýšení fagocytózy	(Christofi & Apidianakis, 2013)
<i>Anopheles gambiae</i>	<i>Plasmodium berghei</i>	Zvýšení diferenciací hemocytů	(Rodrigues et al., 2010)
mravenec obecný (<i>Lasius niger</i>)	<i>Beauveria bassiana</i>	Přežití	(Gálvez & Chapuisat, 2014)
bourec morušový (<i>Bombyx mori</i>)	Gram-negativní peptidoglykany	Přežití	(Miyashita et al., 2014)

Imunitní priming je možné rozpoznat zvýšenou koncentrací cirkulujících hemocytů v hemolymfě a zvýšenou koncentrací AmP u hmyzu (Fallon et al., 2011).

Larvy *Galleria mellonella* ošetřené kvasinkou *Candida albicans* jsou chráněny před případnou další nákazou touto kvasinkou, která by za normálních podmínek byla smrtelná. Stejný ochranný účinek vyvolá i vystavení larev kvasince *Saccharomyces cerevisiae*, kdy v reakci na přítomnost kvasinky imunitní systém zareagoval zvýšenou expresí genů pro AmP (Bergin et al., 2006).

Imunizace *Drosophila melanogaster* subletální dávkou bakterie *Streptococcus pneumoniae* chránila jedince před následnou smrtelnou dávkou stejné bakterie. Zapříčinilo to předchozí zvýšení fagocytické aktivity hemocytů v reakci na přítomnost bakterie (Pham et al., 2007).

U čmeláka zemního (*Bombus terrestris*) může ochrana imunitním primingem trvat až 22 dní (Sadd & Schmid-Hempel, 2006).

Na druhou stranu existují druhy s poměrně krátkou dobou účinnosti imunitního primingu. Například u mravence *Formica selysi* byla doba zvýšené aktivity imunitního systému relativně krátká, což vedlo k myšlence, že život v kolonii odstraňuje nutnost dlouhodobého imunitního primingu, protože mohou fungovat jiné kompenzační mechanismy. Mravenci mají mnoho kolektivních obranných mechanismů, které omezují šíření patogenu v koloniích (Sadd & Schmid-Hempel, 2006).

Přestože byl imunitní priming objeven u dělnic i u larev tak stejně jako u *Formica selysi* je i u *Apis mellifera* doba zvýšené aktivity imunitního systému krátká ve srovnání s ostatním hmyzem. Důvodem je nejspíše energetická náročnost tohoto obranného mechanismu, proto si řada společenského hmyzu vybudovala řadu způsobů pro udržení kolektivní imunity (viz kapitola 2.1.5 Sociální imunita) (Schmid-Hempel, 2021).

2.3.2 Imunitní priming u včely medonosné

Včela se s patogeny a mikroby setkává v přírodě naprosto běžně, na květech při sběru potravy, při předávání potravy mezi včelami nebo i v úlu. Velkým problémem včelstev jsou nejen onemocnění postihující dospělé včely, ale také nemoci larev. Proto by imunitní priming mohl být pomocníkem při udržování zdravého včelstva.

Při studiu sociální imunity včel bylo zjištěno, že pokud se v úlu vyskytne nemocná nebo mrtvá larva, včela dělnice ji pozře a tím zabrání dalšímu šíření nákazy. Dospělá včela může být proti nemoci, která způsobila úhyn larvy, imunní (Božič & Valentinčič, 1995).

2.3.2.1 Možné faktory ovlivňující imunitní priming u včel

Imunitní priming je u včel ovlivňován řadou faktorů. Jedním z nich je i kolonizace střevní mikroflóry. Střevní mikrobiom, který se vyvíjí v raných stádiích života včel, může hrát klíčovou roli v regulaci imunitní odpovědi a náchylnosti k parazitům. Tento raný vývoj střevního mikrobiomu může ovlivnit imunitní systém včel a jejich schopnost efektivně reagovat na patogeny. Různé mikroorganismy v mikrobiomu mohou stimulovat

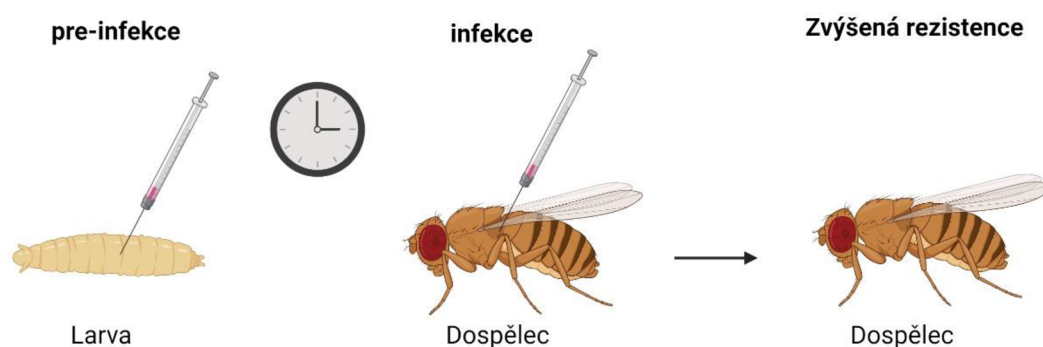
produkcí AmP nebo modulovat imunitní odpověď včel, což může zvyšovat jejich odolnost vůči patogenům (Schwarz et al., 2016).

Interakce mezi pesticidy a patogeny je dalším klíčovým faktorem ovlivňujícím imunitní priming u včel. Subletální dávky neonikotinoidního pesticidu společně s patogeny mohou společně interagovat, což vede k zvýšené mortalitě včel. Tyto chemické látky mohou oslabit imunitní systém včel, což zvyšuje jejich náchylnost k infekcím. Takové oslabení imunitního systému může zároveň ovlivnit jejich imunitní priming (např. zkrácením doby trvání) a ochranu proti budoucím infekcím, což zvyšuje jejich zranitelnost (Doublet et al., 2015).

V některých případech si včely samy zvyšují účinnost imunitního systému a podporují tak i imunitní priming. U včel byla objevena schopnost „samoléčení“. Bylo popsán jev, kdy včely zvyšují sběr pryskyřic po vystavení parazitům nebo patogenům. Toto chování by naznačovalo, že včely aktivně hledají a sbírají pryskyřice, které mají antiseptické a antifungální vlastnosti. Sběr pryskyřic může tedy fungovat jako preventivní opatření proti infekcím, které zvyšují odolnost včel proti patogenům a mohou pomoci včelám zvládnout infekční stres (Simone-Finstrom & Spivak, 2012).

2.3.3 Transstádijní imunitní priming

Imunitní priming popsán výše je procesem v rámci jednoho stádia i jedné generace. Avšak tento mechanismus funguje i napříč stádii a generacemi. Transstádijní imunitní priming je tedy proces při kterém dochází k zachování zvýšení aktivity a obranyschopnosti imunitního systému při přechodu mezi jednotlivými stádii hmyzu. Viz obrázek 4.



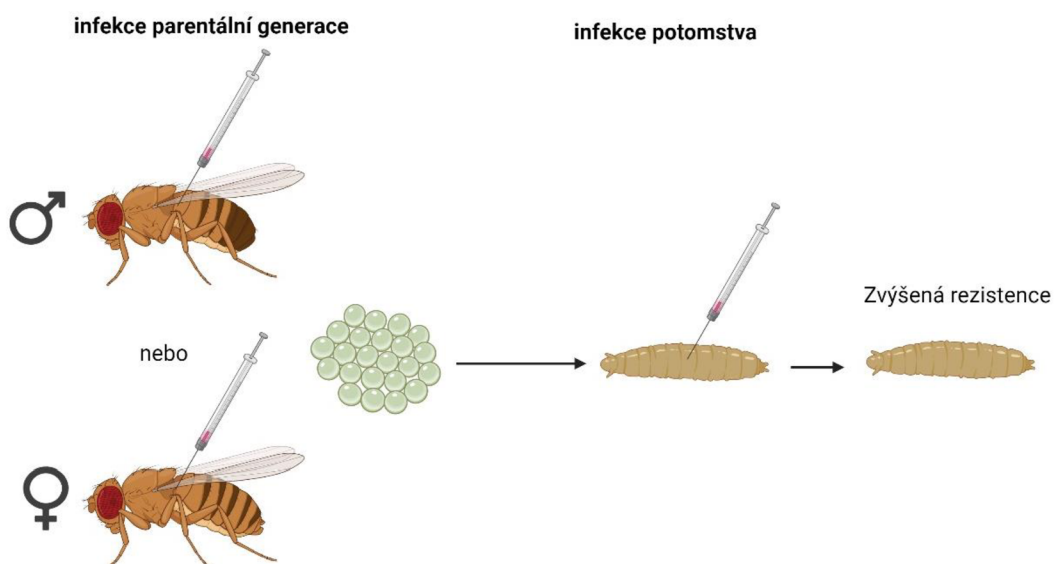
Obr. 4: Schématické znázornění průběhu výzkumu uměle vyvolaného transstádijního imunitního primingu. Obrázek byl převzat a upraven (Sulek et al., 2021).

2.3.4 Transgenerační imunitní priming

Transgenerační imunitní priming (TgIP) je proces, kdy dochází k přenosu určité imunitní zkušenosti nebo imunitní paměti z rodičů na potomstvo, tím zvyšují jejich odolnost vůči

skupině nebo jednotlivým patogenům, se kterými se jejich rodiče v krátké minulosti setkaly. Může dojít k přenosu konkrétních aktivních molekul imunitního systému nebo molekul anebo těch látek, které vyvolají spuštění imunitního primingu v následující generaci (Sadd & Schmid-Hempel, 2006; Siva-Jothy et al., 2005). Nedávné studie zdůraznily zvláštní roli mikroRNA v souvislosti s TgIP, které mohou ovlivňovat exprese genů, které se mohou přenášet mezi generacemi, ačkoli nejsou zakódovány v nukleotidové sekvenci. Schématické znázornění TgIP v podmínkách in vitro viz obrázek 5.

Přestože byla prokázána existence TgIP například u včely medonosné, nelze zatím bezpečně říct, jakým mechanismem k přenosu dochází. V roce 2011 a 2012 byl proveden výzkum, při kterém byly imunizovány včelí královny bakterií *Paenibacillus larvae*. Následně byla srovnávána letalita potomstva imunizovaných matek s letalitou potomstva matek v kontrolní skupině, které byly ošetřeny pouze fyziologickým roztokem. Výsledkem bylo průkazné snížení úmrtnosti larev imunizovaných matek po prodělání onemocnění moru včelího plodu, které je způsobeno výše zmíněnou bakterií. Snížení úmrtnosti larev činilo cca o 20 % ve srovnání s larvami matek v kontrolní skupině. U imunizovaných larev bylo zaznamenáno i zvýšení proliferace prehemocytů a jejich diferenciaci na hemocyty. Experiment byl proveden jak v roce 2011, tak v roce 2012 s velmi podobným výsledkem (Hernández López et al., 2014).



Obr. 5: Schématické znázornění průběhu výzkumu uměle vyvolaného transgeneračního imunitního primingu. Obrázek byl převzat a upraven (Sulek et al., 2021).

2.3.5 Vitellogenin

Vitellogenin (Vg) je zásobním fosfoglykolipoproteinem charakteristickým pro samice vejcorodých živočichů, tedy i hmyzu. Dále je Vg prekurzorem pro tvorbu vaječného žloutku. Jeho syntéza probíhá v tukových těliscích, odkud je vyměšován do hemolymfy, kde tvoří až 50 % z celkového množství proteinů (Amdam & Omholt, 2002; Hartfelder & Engels, 1998; Havukainen et al., 2012; Raikhel & Dhadialla, 1992; Tufail & Takeda, 2008). Vg vyskytující se v hemolymfě včely medonosné má molekulovou hmotnost 180 kDa (Wheeler & Kawooya, 1990). Struktura tohoto proteinu je vyobrazena na obrázku 6.

U včelích matek je zodpovědný za reprodukci, ale vyskytuje se i u dělnic, které jsou sterilní. U dělnic má funkci hlavního regulátoru délky života. Hojně se vyskytuje u zimních dlouhověkých včel a včel kojiček, méně pak u starších včel létavek (G. V. Amdam et al., 2009; Piulachs et al., 2003; Trenczek et al., 1989).

Kromě jiného má také imunitní funkci. Díky své struktuře je Vg schopen na sebe navázat bakterie, nebo jejich fragmenty a transportovat je tak přes hemolymfu do různých orgánů včely. Další zajímavou schopností je neutralizace volných radikálů (G. V. Amdam et al., 2005; Havukainen et al., 2013; Salmela et al., 2015; Seehuus et al., 2006).



Obr. 6: 3D model struktury Vitellogeninu (RCSB PDB – Protein Data Bank <https://www.rcsb.org/structure/1LSH>)

2.3.6 Očkování včel

Očkování včel proti onemocnění moru včelího plodu je inovátorskou strategií v boji proti bakteriální chorobě. Bylo již zmíněno že je způsobena bakterií *Paenibacillus larvae*. Ta je schopna infikovat včelí larvy během prvních 3 dnů jejich života. Antibiotika jsou často neefektivní při léčbě moru včelího plodu, protože působí pouze proti vegetativní formě

bakterie. Jakmile se projeví příznaky nemoci ve včelstvu, jediným efektivním způsobem, jak ji vyhubit a zabránit šíření, je spálit úl, vybavení i kolonii. Vzhledem k omezeným možnostem léčby antibiotiky je nezbytné najít bezpečné, účinné a udržitelné metody prevence a léčby tohoto onemocnění. Očkování se ukazuje jako slibná metoda prevence nemocí včel (Dickel et al., 2022). Očkování pro včely se spoléhá na nově prokázaný jev TgIP. (Viz kapitola 2.3.5 Transgenerační imunitní priming.) V posledních letech byl pozorován významný pokrok v oblasti výzkumu imunitního systému včel a jeho možného využití v ochraně včelstev před nemocemi. Očkování včelích matek proti moru včelího plodu je jedno z budoucích možných řešení tohoto závažného problému.

Nejdále je nejspíše výzkum vakcíny proti moru včelího plodu od americké biotechnologické firmy Dalan Animal Health (<https://dalan.com/>). Vakcína byla vydána na americký trh v lednu roku 2023, poté co byla podmíněně schválena. Problémem ovšem je, že vakcína pracuje na principu TgIP, jehož mechanismus není dosud objasněn. Vystávají tedy obavy o účinnosti této vakcíny, které jsou spojené i se způsobem aplikování, kdy je vakcína včelám podávána v potravě (Dickel et al., 2022).

2.4 Mateří kašička

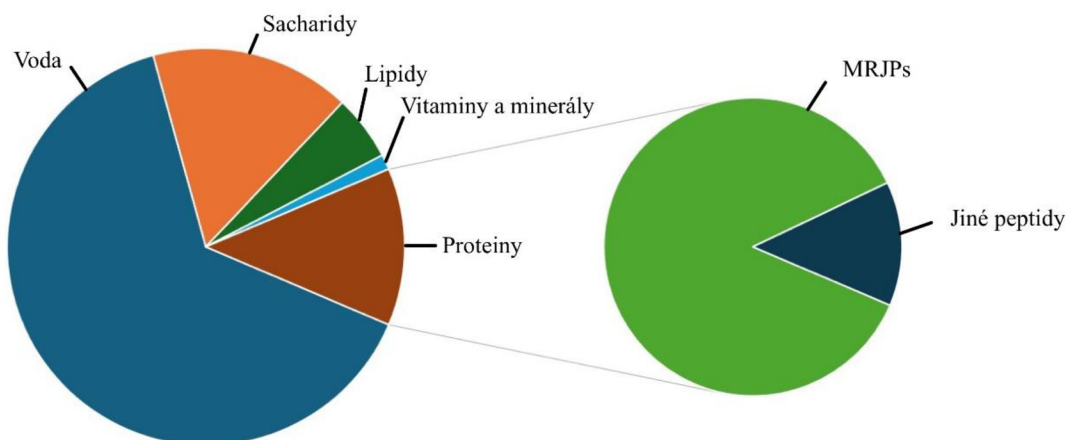
Jednou z nejdůležitějších látek produkovanou včelami je beze sporu mateří kašička. Jedná se o hustý, gelu podobný, sekret hltanových žláz, který produkují včely kojičky (dělnice stará pět až čtrnáct dní) (Fujita et al., 2013). Mateří kašička má mléčnou až nažloutlou barvu a mírně kyselé pH. Tvoří většinou složku potravy pro larvy i matku. Dále jsou v úle hojně využívány i její antimikrobiální a antioxidační vlastnosti (Fratini et al., 2016).

Hltanová žláza (*glandula pharyngealis*) je párová žláza umístěna mezi chitinovou schránkou hlavy a mozkem včely. Tato žláza je aktivována kolem čtvrtého až pátého dne po vylíhnutí včely. Z mladušek (včely do stáří pěti dnů) se tak stanou kojičky. Po uplynutí dvanácti až čtrnácti dnů hltanové žlázy ztrácí svoji funkci a rozvíjí se aktivita voskotvorných žláz.

2.4.1 Chemické složení

Mateří kašička má vysokou výživovou hodnotu. Pokud se podíváme blíže na procentuální zastoupení jednotlivých složek zjistíme, že 60 až 70 % tvoří voda. Dále sacharidy pokrývají 11 až 23 %, proteiny 9 až 18 % a lipidy 4 až 8 %. Mateří kašička obsahuje také spoustu vitamínů. Příkladem vitamínů rozpustných ve vodě jsou vitamíny skupiny B (B1, B2 nebo například B5). Vitamíny rozpustné v tucích se v mateří kašičce nevyskytují. Tyto složky tvoří 0,8 až 3 % (Melliou & Chinou, 2005a; Ramadan & Al-Ghamdi, 2012a; Sabatini, 2009a; Šimúth, 2001a).

Poměr všech složek mateří kaše může být proměnlivý v závislosti na mnoha faktorech. Jedním z nejzásadnějších faktorů ovlivňující složení mateří kaše je roční období a složení potravy včel. Dále ovlivňuje její složení například i stáří kojičky či larvy (Sabatini, 2009b). Na obrázku 7 jsou poměry obsahu jednotlivých složek vyznačeny v grafu.



Obr. 7: Graf procentuálního zastoupení složek v čerstvé mateří kaši. Obrázek byl převzat a upraven (Fratini et al., 2016).

2.4.1.1 Sacharidy

Sacharidová složka tvoří 7-18 % v čerstvé mateří kašičce a cca 30 % sušiny (Sabatini, 2009). Nejvíce zastoupenými sacharidy jsou fruktosa, glukosa a sacharosa, méně pak maltosa nebo trehalosa. Z celkového obsahu sacharidů tvoří glukosa a fruktosa až 90 % a sacharosa poté jen od 0,8-3,6 % (Ramadan & Al-Ghamdi, 2012b; Wytrychowski et al., 2012).

2.4.1.2 Proteiny

Proteiny na druhou stranu tvoří až 50 % sušiny (Bíliková et al., 2002). Nejvíce jsou zde zastoupeny tzv. MRJP proteiny (Major Royal Jelly Proteins). Ty tvoří 83-90 % všech proteinů (Šimúth, 2001b).

MRJP proteiny mají pro včely zásadní nutriční význam. MRJP1, MRJP4 a MRJP5 představují hlavní zdroj esenciálních aminokyselin pro larvy i matku (Tamura et al., 2009). Těmito esenciálními aminokyselinami jsou arginin, histidin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, fenylalanin, threonin, tryptofan a valin. Některé z těchto proteinů mají také vliv na nervovou soustavu. (Ramanathan et al., 2018)

MRJP proteiny jsou možná klíčem ke zpomalení stárnutí. U včely medonosné, a i u ostatního hmyzu (*Drosophila melanogaster*) byly tyto účinky po jejich podání v potravě potvrzeny. Hlavní roli v tom hrají jejich antioxidační účinky. (Ramanathan et al., 2018) Nejhojnějším a také nejdříve identifikovaným proteinem v mateří kašičce byl právě MRJP1. Tento protein je také znám pod názvy apalbumin nebo royalactin. Jeho přítomnost byla potvrzena nejen v hltanových žlázách a mateří kašičce, ale například i v nervové soustavě, a to konkrétně v cytoplasmě mozkových buněk antenálního a optického laloku nebo v houbových tělískách (část mozku, kde se zpracovávají smyslové vjemy). V menším množství byl MRJP1 zachycen i v medu nebo perze (Malecová et al., 2003).

Tento důležitý protein se může vyskytovat v několika formách. Monomerní forma je zodpovědná za determinaci včelí matky. Spouští fyziologické změny, které následně vedou k diferenciaci larvy na včelí matky. Dále zkracuje dobu vývoje a zvyšuje velikost těla i vaječníků. Oligomerní jednotky MRJP1 mají molekulovou hmotnost 420 kDa. Dalším důležitým proteinem zde je apisimin (5 kDa). Pomocí nekovalentních vazeb spojuje jednotlivé monomery MRJP1 a napomáhá tak vytvářet oligomerní struktury.

S proteinem MRJP1 souvisí i výskyt skupiny peptidů jelleinů I-III. Tyto peptidy pocházejí z C-konce MRJP1 proteinu a mají vysoce antibakteriální účinky. Dokáží

zamezit množení grampozitivních a gramnegativních bakterií i kvasinkám (Fontana et al., 2004).

Jeho hlavními funkčními vlastnostmi je schopnost prodlužování délky života jedince a vysoké antioxidační účinky. Bylo také dokázáno, že tento protein má vliv na proliferaci buněk a dokáže v určité míře modulovat látky imunitního systému. Jeho vlastnosti by se tak daly využít ve zdravotnictví například při léčení popálenin a při procesech hojení ran. Další významnou vlastností tohoto proteinu byla zvýšená produkce protinádorové látky TNF-alfa (faktor nádorové nekrózy) u kryš. (Ramanathan et al., 2018)

MRJP2 je základní protein s N-koncovou sekvencí A-I-V-R-E-N-S a pouze jedním N-řetězcem, který má strukturu podobnou manose. Jeho molekulová hmotnost je 72 kDa. Protein MRJP2 nemá tak širokou škálu funkčních vlastností jako MRJP1. Přesto také zvyšuje produkci protinádorových látek TNF-alfa a podporuje proliferaci buněk (Bíliková et al., 2002; Šimúth, 2001b).

Protein MRJP3 je vysoce oligomerní protein s hmotnostmi v rozmezí 80,5 kDa až 87 kDa. U tohoto proteinu jsou však velmi významné jeho účinky na zdraví organismů. MRJP3 ovlivňuje reakce T-lymfocytů, produkci IL-4 (interleukin 4), IL-2 (interleukin 2) a IFN-gama (interferon gamma). Dále tlumí produkci IgE (imunoglobulin E). Působí jako inhibitor produkce protizánětlivých cytokininů, jako jsou TNF-a IL-6.

MRJP4 poskytuje mateři kašičce nutriční složky jako jsou například esenciální aminokyseliny. Studie však ukazují, že úroveň exprese MRJP4 v hltanové žláze včely je ve srovnání s expresí ostatních MRJP velmi nízká (Schmitzová et al., 1998).

Pro protein MRJP5 je charakteristickým znakem široká oblast repetitivních nacházející se mezi aminokyselinami 367 a 540. Nachází se zde 58 opakování tripeptidů. Tato repetitivní oblast je složená z nabitých argininových a lysinových zbytků a také z negativně nabitých molekul asparaginu. Obsahuje také vysoký podíl esenciálních aminokyselin (Schmitzová et al., 1998).

2.4.1.3 Lipidy

Lipidy tvoří 3 až 19 % sušiny mateří kaše a přibližně 90 % z nich jsou mastné kyseliny. Zbytek se skládá z neutrálních lipidů, steroidů, uhlovodíků a fenolů. V mateři kašičce se nacházejí mastné kyseliny s 8–10 atomy uhlíku, což je odlišuje od mastných kyselin většiny jiných živočišných a rostlinných materiálů. Analýza lipidových složek je hlavním ukazatelem pro pravost mateří kaše, protože příměs medu nebo cukrů snižuje obsah

proteinů a lipidů a zvyšuje koncentraci minoritních cukrů, čímž se mateří kašička stává nerozpustná v alkalickém prostředí. Hlavní složkou mastných kyselin v mateří kašičce je 10-hydroxy-2-decenová (10-HDA), která má antibakteriální vlastnosti. Obsah 10-HDA je také využíván jako znak kvality a čerstvosti mateří kašičky. Dále, kyselina octová v je v mateří kašičce přítomná v menším množství než 10-HDA, je zapojena do odstrašujícího účinku proti parazitu *Varroa destructor* (Fratini et al., 2016b).

2.4.1.4 Vitaminy

Mateří kašička je velmi bohatá na vitaminy ze skupiny B. Nejvíce pak vitamin B5, B1, B2, B6, B8, B9 a B12. Dále je to vitamin PP (niacin, také B3) a vitamin C, které ale tvoří jen malou část z celkového obsahu vitaminů. Naopak vitaminy rozpustné v tucích, konkrétně A, D, E a K, nejsou v mateří kašičce přítomné (Li et al., 2012; Melliou & Chinou, 2005b).

2.4.1.5 Minerální látky a stopové prvky

Hlavními prvky vyskytující se v mateří kašičce, jsou draslík, fosfor, síra, sodík, vápník, hliník, hořčík, zinek, železo, měď a ve stopovém množství nikl, chrom, antimon, wolfram, bismut a titan (Ramadan & Al-Ghamdi, 2012b).

Dalšími stopovými složkami mateří kašičky jsou heterocyklické látky, volné nukleotidy (adenosin, guanosin, cytidin a iridin), fosfáty (ATP, ADP, AMP), dále acetylcholin a některé organické kyseliny (glutamová, benzoová, malonová a mléčná). Funkce všech stopových složek zatím není zcela jasná (Sabatini, 2009b).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a přístroje

3.1.1 Chemikálie

- 5-Brom-4-chlor-3-indolylfosfát (BCIP; Sigma-Aldrich, Německo)
- Akrylamid (AA; Acros Organics, USA)
- Anti-králičí sekundární protilátka konjugovaná s alkalickou fosfatase (EC 3.1.3.1) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Bisakrylamid (BIS; Sigma-Aldrich, Německo)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Německo)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G250; Bio-Rad, USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (PENTA s.r.o, Česká republika)
- Dithiotreitol (DTT; Sigma-Aldrich, Německo)
- Dodecylsírán sodný (SDS; Applichem, Německo)
- Etanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Glycerol (Lach-Ner, Česká republika)
- Glycin (Sigma-Aldrich, USA)
- Hovězí sérový albumin (BSA; Sigma-Aldrich, Německo)
- Hovězí sérový albumin pro western blot (BSA; ITW reagents, Španělsko)
- Chlorid sodný (Lach-Ner; Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina octová (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina trihydrogenfosforečná (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
- Marker molekulové hmotnosti (SigmaMarker™ wide range 6500-200 000 Da; Sigma-Aldrich, Německo)
- β-merkapt ethanol (Sigma-Aldrich, Japonsko)
- Methanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Močovina (Lach-Ner, Česká republika)
- N,N'-tetramethyldiamin (TEMED; Carl Roth, Německo)
- N,N'-metylen-bisakrylamid (bAA; MP Biomedicals, Francie)
- n-Butanol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Nitro blue tetrazolium chloride (NBT; Sigma-Aldrich, Německo)

- Peroxodisíran amonný (APS; Sigma-Aldrich, Japonsko)
- Polyklonální králičí primární protilátka cílená proti abaecinu (MoravianBiotechnology, Česká republika)
- Polyklonální králičí primární protilátka cílená proti defensinu-1 (MoravianBiotechnology, Česká republika)
- Polyklonální králičí primární protilátka cílená proti hymenoptaecinu (MoravianBiotechnology, Česká republika)
- Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA)
- Sušené mléko (Carl Roth; Německo)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris; MP Biomedicals, Francie)
- Tween-20 (Carl Roth; Německo)

3.1.2 Roztoky

- **0,1 M K-Pi pufr pH 7,0** (6,1 ml 1M K₂HPO₄, 3,85 ml 1M KH₂PO₄, doplněno dH₂O na 1000 ml, pH upraveno pomocí KOH)
- **10% (w,v) APS** (0,1 g APS, 1 ml dH₂O)
- **10% (w,v) SDS** (10 g SDS, doplněno dH₂O na 100 ml)
- **AB-3 Zaostrňovací gel monomer 49,5 % T, 3% C** (96 g AA, 6 g N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS), 200 ml dH₂O)
- **AB-6 Separační roztok monomer 49,5% T, 6% C** (93 g AA, 6 g N,N'-metylenbisakrylamidu (BIS), 200 ml dH₂O)
- **Akrylamid-N,N'-metylenbisakrylamid** (30 % (w/v) akrylamidu, 0,8 % bisakrylamidu (w/v) ve vodě)
- **Anodový pufr (0,1M Tris, pH 8,9), 10x** (60,57 g Tris, 200 ml dH₂O, úprava pH pomocí 1M HCl)
- **Blokovací roztok (5% sušené mléko)** (1 g sušeného mléka, 4 ml 5x koncentrovaný TBS pufr, 16 ml dH₂O)
- **Blokovací roztok BSA (1% BSA v 1xTBS)**
- **Blokovací roztok BSA (5% BSA v 1xTBS)**
- **Blotovací pufr, pH 8,3** (4,5375 g Tris, 21,615 g glycinu, 350 ml dH₂O, 300 ml methanolu, doplněno dH₂O na 1500 ml)
- **Elektrodotový pufr 0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1% (w,v) SDS, pH 8,3** (6,0ř g Tris 28,82 g glycinu, 2 g SDS, doplněno na 2000 ml dH₂O)
- **Fixační roztok** (30 % (v/v) ethanol, 10 % kyselina octová)

- **Gelový pufr (3,0 M Tris, 0,3% SDS, pH 8,45) 3x** (181,65 g Tris, 1,5 g SDS, doplněno dH₂O na 500 ml, úprava pH pomocí HCl)
- **Katodový pufr (0,1M Tris, 0,1M Tricine, 0,1% SDS, pH 8,25) 10x** (60,55 g Tris, 89,6 g Tricinu, 5 g SDS, 500 ml dH₂O)
- **Odbarvovací roztok 5% kyselina octová** (50,5 ml 99% kyseliny octové, doplněno dH₂O na 1000 ml)
- **Primární protilátka v 1% sušeném mléku (1:10000)** (0,1 g sušeného mléka, 2 ml 5x koncentrovaný TBS pufr a 8 ml dH₂O, 1 µl primární protilátky proti Vg)
- **Primární protilátka v 1xTBS-T 1:1000** (10 µl primární protilátky proti Hymenoptaecinu, 10 ml 0,1 % TBS-T)
- **Primární protilátka v 1xTBS-T 1:500** (20 µl primární protilátky proti Abaecinu, 10 ml 0,05 % TBS-T)
- **Primární protilátka v 1xTBS-T 1:5000** (2 µl primární protilátky proti Defensinu-1, 10 ml 0,1 % TBS-T)
- **Pufr do dělicího gelu 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8** (36,3 g Tris, 150 ml dH₂O, úprava pH pomocí HCl, doplněno dH₂O na 200 ml)
- **Pufr do zaostřovacího gelu 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8** (3 g Tris, 40 ml dH₂O, úprava pH pomocí HCl, doplněno dH₂O na 50 ml)
- **Pufr pro AP (alkalickou fosfatasu)** (12,11 g Tris, 1,016 g MgCl₂, 5,84 g NaCl, doplněno dH₂O do 1000 ml)
- **Roztok BCIP** (50 mg BCIP, 1 ml 100% dimethylformamid)
- **Roztok NBT** (50 mg NBT, 1 ml 70% dimethylformamid)
- **Sekundární protilátka v 1% sušeném mléku (Anti.Rabbit IgG (whole molecule) – Alkaline Phosphatase antibody produced in goat; (1:10000))** (0,1 g sušeného mléka, 2 ml 5x koncentrovaný TBS pufr a 8 ml dH₂O, 1 µl sekundární protilátky)
- **TBS pufr 5x, pH 7,5** (24,2 g Tris, 292,2 g chloridu sodného, doplněno dH₂O na 2000 ml)
- **TBS-T (0,05% Tween) pufr** (100 ml 1x koncentrovaný TBS pufr, 0,05 ml Tween)
- **TBS-T (0,1% Tween) pufr** (100 ml 1x koncentrovaný TBS pufr, 0,1 ml Tween)
- **Vodou nasycený n-butanol** (50 ml n-butanolu, 5 ml dH₂O)

- **Vzorkovací pufr dle Laemmliho 0,125 M Tris/HCl, 4% (w,v) SDS, 20% v/v glycerol, 0,2 M DTT, 0,02% (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8** (2,5 ml pufru do zaostřovacího gelu, 4 ml 10% SDS, 2 ml glycerolu, 2 mg bromfenolové modři, 0,31 g DTT, doplněno dH₂O na 10 ml)
- **Zásobní roztok Bradfordova činidla** (100 mg Coomassie Brilliant Blue G250, 100 ml 80% kyseliny trihydrogenfosforečné, 50 ml methanolu, doplněno dH₂O na 200 ml).
- **Zásobní roztok koloidního barviva Coomassie Brilliant Blue G-250** (12,5 % (v/v) H₃PO₄, 12/5 % (w/v) (NH₄)₂SO₄, 0,15 % (w/v) CBB G-250)
- **Zásobní roztok BSA pro přípravu standardů** (0,0125 g BSA, 25 ml K-Pi pufru)

3.1.3 Biologický materiál

- Komerční vzorek mateří kašičky
- Ručně odebrané vzorky mateří kašičky

3.1.4 Přístrojové vybavení a pomůcky

- Aparatura pro přípravu gelů
- Automatické pipety
- Centrifuga Eppendorf 5415 R
- Gel Doc EY Imager
- Hřebínky (10 jamek, 1 mm)
- Kazety pro tank blot
- Komora na elektroforézu
- Komora pro tank blot
- Malá skla na přípravu gelů
- Mikrozkmavky
- Nástroje pro odebrání mateří kašičky z pláství
- Nitrilové rukavice
- Nitroceluloseová membrána
- Nůžky
- Petriho misky
- Pinzeta s úzkou špičkou
- Porézní hubička
- PVDF membrána

- Silný filtrační papír
- Skla na přípravu gelů (1 mm)
- Spektrofotometr
- Spektrofotometrická mikrotitrační destička
- Špičky pro automatické pipety
- Termoblok
- Třepačka
- Váhy
- Váleček pro blotování
- Vortex Biosan V1
- Zdroj

3.2 Metody

3.2.1 Úprava biologického materiálu

Optimalizace metody ředění a stanovení celkové hladiny proteinů pomocí Bradfordovy metody byl použit směsný vzorek mateří kašičky.

Pro další práci byla použita mateří kašička ručně odebraná přímo z pláství od včelích larev různého stáří. Směsný vzorek i ručně odebraná mateří kašička byla pro další manipulaci a metody rozpouštěna v 0,1M K-Pi pufru, pH 7. Směsný vzorek v 1 ml pufru a ručně odebrané vzorky ve 100 μ l pufru.

3.2.1.1 Postup odebrání mateří kaše z pláství

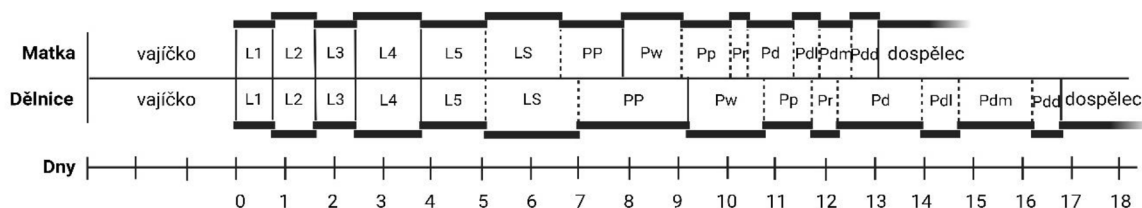
Hluboce zamražená plástev se včelími larvami byla pomalu rozmrazena při laboratorní teplotě. Poté byla nožem seříznuta cca půl centimetru tlustá vrstva plástve pro lepší manipulaci a snazší preparaci larvy ven z plástve. Je třeba si při řezání dát pozor, aby se plástve nedrolily. Pomocí drátku s malou lžičkou na konci (tzv. přelarvovací lžička používaná včelaři) byla opatrně vytažena larva ven z plástve. V tomto kroku bylo důležité, aby larva zůstala nepoškozená, jelikož tělní tekutiny by znehodnotily mateří kašičku pod ní. Každá vypreparovaná larva byla vložena do předem zvážené mikrozkušavky a změřena její hmotnost. Hmotnost larev posléze sloužila ke zjištění stáří larvy. Pro odběr mateří kašičky byla použita malá špachtle. Každý vzorek mateří kašičky byl vložen do zvážených mikrozkušavek a opět byla změřena jejich hmotnost. Všechny vzorky larev i mateří kašičky byly po dobu celého výzkumu uchovávány v mrazáku.

3.2.1.2 Určení stáří larvy a larválního stádia podle hmotnosti

Doba od naklazení vajíčka matkou po přeměnu v larvu trvá cca 3 dny. Následně se začne larva vyvíjet a postupně prochází jednotlivými instary (stádii), ty jsou označeny jako L1-L5. Viz obrázek 8. Označení LS platí pro larvu v pátém instaru, která se čerstvě zavíčkovala. Hmotnost jednotlivých instarů se pohybuje v intervalech, které jsou zapsány v tabulce 3. Podle těchto intervalů a podle obrázku 8 bylo určeno stáří larev vypreparovaných z pláství. Veškeré výchozí informace o vzorcích a larvách jsou uvedeny v tabulce 6.

Tab. 3: Přehled instarů dělnice včely medonosné a intervalů hmotností larev náležící k jednotlivým instarům. Tabulka byla upravena podle (Rembold et al., 1980).

Larvální stádium	Hmotnost larvy [mg] min.-max.
L1	0,10-0,45
L2	0,35-1,50
L3	1,30-6,00
L4	4,20-32,00
L5+LS	27,00-280,00



Obr. 8: Schématické znázornění přechodů plodu včely medonosné mezi jednotlivými instary v závislosti na stáří a srovnání vývoje plodu dělnice a matky včely medonosné. Larva se z vajíčka vylíhne po třech dnech. Den narození je označen jako den 0. L1-L5 = instary larev; LS = larva instaru L5 čerstvě po zavíčkování; PP = předkukla; P = kukla (malá písmena značí zabarvení tělních částí kukly, w = bílé oči, p = růžové oči, d = tmavě hnědé oči, dl = tmavě hnědé oči + mírně zabarvené tělo, dm = tmavě hnědé oči + středně zabarvené tělo, dd = tmavě hnědé oči + hnědé tělo). Obrázek byl převzat od (Rembold et al., 1980) a přepracován.

3.2.2 Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou

Vytvořená kalibrační řada roztoků standardů BSA se pohybovala v rozmezí koncentrací od 50 do 500 $\mu\text{g/ml}$. Na analytických vahách bylo naváženo do mikrozkušavky 100 mg směšného vzorku mateří kašičky a byl přidán 1 ml K-Pi pufru. Pro lepší rozpuštění mateří kašičky v pufru byl roztok po 30 minut ponechán na rotační třepačce. Po rozpuštění byly vzorky naředěny v poměru 1:9 a 1:1.

Do mikrotitrační destičky bylo napipetováno nejdříve 5 μl vzorku (standardu) (u blanku to bylo 5 μl K-Pi pufru), 45 μl K-Pi pufru a 200 μl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Pracovní roztok Bradfordova činidla byl připraven ze zásobního roztoku naředěním v poměru 1:4 s dH_2O . Všechny vzorky a standardy byly pipetovány na mikrotitrační destičku v technickém triplikátu. Následně proběhla inkubace po dobu 5 minut. Absorbance byla měřena na spektrofotometru Synergy H1 při vlnové délce 595 nm.

Vzorky mateří kašičky odebrané různě starým larvám byly proměřeny stejným způsobem.

3.2.3 Diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS (SDS-PAGE)

3.2.3.1 Příprava vzorků pro SDS-PAGE elektroforézu

K 5 μ l vzorku o koncentraci 100 μ g/ml proteinu z mateří kašičky bylo přidáno 5 μ l vzorkovacího pufru dle Laemmliho. Roztoky byly zvortexovány a následně vloženy do termobloku vyhřátého na 100 °C, pro zajištění denaturace proteinů. Po uplynutí doby pro denuraci byly vzorky zchlazeny v ledové lázni a zcentrifugovány je při 6000 g po dobu 4 minut.

3.2.3.2 Příprava gelů

Nejdříve byla sestavena aparatura pro nalévání gelů. Pro tento experiment byly zvoleny gely o tloušťce 1 mm.

Při SDS-PAGE se používají dva typy gelů zaostřovací a dělicí. Složení obou gelů je uvedeno v tabulce 4. Po nalití zaostřovacího gelu do něj byl vložen hřebínek na deset jamek o tloušťce 1 mm. Gel byl následně ponechán cca dalších 20 minut v klidu až do úplného zatuhnutí.

Tab. 4: Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Všechny objemy jsou uvedeny v ml.

Typ gelu	AA/bAA	Tris/HCl (1,5 M, pH 8,8)	Tris/HCl (0,5 M, pH 6,8)	dH ₂ O	SDS	TEMED	APS
Dělicí 10%	6,80	5,00	-	7,60	0,20	0,02	0,14
Zaostřovací 4%	2,60	-	5,00	11,80	0,40	0,04	0,24

3.2.3.3 Průběh elektroforézy

Do jamek bylo aplikováno 10 μ l vzorku a do první použité jamky na každém gelu byl aplikován marker molekulových hmotností. Do elektroforetické vany byly vloženy komůrky s gely a bylo přidáno potřebné množství elektrodového pufru (podle počtu gelů). Na komůrku s elektrodami bylo nasazeno víko. Takto složená aparatura byla vložila do lednice a připojena ke zdroji. Počáteční napětí bylo 120 V a po přechodu vzorků ze zaostřovacího gelu do gelu dělicího bylo napětí zvýšeno na 180 V. Elektroforéza byla ukončena poté, co bromfenolová modř ze vzorkovacího pufru doputovala na spodní okraj gelu.

3.2.3.4 Fixace, barvení a focení gelů

Polyakrylamidové gely byly vloženy do vhodné nádoby a fixovány ve fixačním roztoku po dobu 30 minut za stálého míchání na třepačce. Byl připraven pracovní roztok barviva CBB G-250 smícháním 40 ml zásobního roztoku CBB G-250 a 10 ml methanolu. Po dokončení procesu fixace byly gely vloženy do Petriho misek společně s pracovním roztokem CBB G-250. Gely byly barveny přes noc. Po ukončení inkubace v barvicím roztoku byly gely vloženy do odbarvovacího roztoku 5 % kyseliny octové. Tento roztok byl měněn každých 30 minut, dokud nebyl gel dostatečně odbarven. Po ukončení procesu odbarvování byl gen důkladně opláchnut v dH₂O a následně byl zdokumentován a snímek byl upraven pomocí přístroje Gel Doc EZ Imager, na destičce Stain Free s bílým označením.

3.2.4 Metoda Western blot

3.2.4.1 Průběh detekce vitellogeninu metodou Western blot

Prvním krokem bylo provedení metody SDS-PAGE, která je popsána výše. Blotovací souprava se skládá z tanku (blotovací vana), blotovací komůrka, kazety, porézní houbičky, silných filtračních papírů a membrány. Pro sestavení soupravy a spuštění přenosu bylo potřeba ponořit všechny vyjmenované součásti do blotovacího pufru minimálně na 30 minut. Pro tento experiment byla použita PVDF membrána. Ta se nejdříve máčela 5 minut v methanolu a následně až v blotovacím pufru. Blotovací souprava se následně skládala takto. Na černou stranu kazety se skládaly jednotlivé vrstvy v tomto pořadí: porézní houbička, filtrační papír, gel, PVDF membrána, filtrační papír a porézní houbička. Pomocí válečku byly odstraněny bubliny mezi gelem a membránou. Kazeta byla uzavřena a vložena do blotovací komůrky v tanku tak, aby černá strana kazety směřovala k černé straně komůrky. Tank byl naplněn blotovacím pufrem, vložen do lednice a uzavřen víkem. Na základě velikosti membrány byla vypočtena velikost proudu ($0,8 \text{ mA/cm}^2$). Při počtu čtyř membrán (8 cm na 5 cm) v blotovací komůrce byl použit proud 180 mA. Vždy se blotovalo přes noc a přenos byl ukončen až následující den.

Po vyjmutí membrány z tanku byla vložena do krabičky spolu s barvicím činidlem Ponceau S na 10-15 minut pro ověření přenosu proteinů z gelu na membránu. Poté byla membrána omyta destilovanou vodou a nechala se inkubovat v blokovacím roztoku mléka přes noc v lednici.

Po procesu blokování byla membrána promývána TBS-T pufrem $2\times$ po 10 minutách. Inkubace v roztoku s primární protilátkou, která byla naředěna v poměru 1:10000, trvala 2 hodiny. Následuje další série promývání v TBS-T pufru a poté byl přidán roztok se sekundární protilátkou ředěnou v poměru 1:10000, kdy inkubace trvala 1 hodinu a 40 minut. Pro proces barvení musely být membrány opět promyty TBS-T pufrem $2\times$ po 10 minutách. Celý proces promývání a inkubací s protilátkami probíhal při laboratorní teplotě na třepačce.

Barvicí roztok NBT, BCIP a pufru pro alkalickou fosfatasu byl přidán k membráně. Proces barvení probíhal na třepačce. Je nutné bedlivě sledovat průběh barvení (1-5 minut). Následně musí být membrána důkladně opláchnuta dH_2O a usušena.

3.2.4.2 Průběh detekce AmP metodou Western blot

Gely pro tricininovou elektroforézu byly připraveny podle tabulky 5. Vzorky pro tricininovou elektroforézu byly připraveny následovně. Byl namíchán vzorkovací pufr pro tricininovou elektroforézu smísením Tricin sample buffer (Bio-Rad) s merkaptoetanolem v poměru 950 μ l :20 μ l. Do mikrozkušavek bylo napipetováno 6 μ l zvortexovaného vzorku a 6 μ l vzorkovacího pufru. Proteiny ve vzorcích byly denaturovány při 100 °C na 5 minut v termobloku.

Pro proběhnutí elektroforézy byly proteiny přeneseny na membránu procesem blotování. Tento proces probíhal stejně jako při detekci vitellogeninu. Po dokončení procesu blotování byl ověřen přenos proteinů z gelu na membránu pomocí barviva Ponceau S, ve kterém byla membrána barvena po dobu 15 minut. Následující kroky imunodetekce se liší pro jednotlivé detekované AmP: Membrána obsahující přenesené proteiny byla umístěna do krabičky a blokována na třepačce po dobu 2 hodin v roztoku BSA v 1xTBS v lednici na třepačce.

- a) Defensin-1 5% roztok BSA
- b) Hymenoptaecin 5% roztok BSA
- c) Abaecin 1% roztok BSA

Po inkubaci v blokovacím roztoku byly membrány promyty v TBS-T pufru 3x po 10 minutách za míchání na třepačce za laboratorní teploty.

- a) Defensin-1 0,1% Tween v TBS-T
- b) Hymenoptaecin 0,1% Tween v TBS-T
- c) Abaecin 0,05% Tween v TBS-T

Následovala inkubace s roztokem primární protilátky v TBS-T pufru, která probíhala přes noc v lednici na třepačce.

- a) Primární protilátka pro Defensin-1 ředění 1:5000
- b) Primární protilátka pro Hymenoptaecin ředění 1:1000
- c) Primární protilátka pro Abaecin ředění 1:5000

Následující den byly membrány promyty v TBS-T pufru stejně jako v předchozím promývacím kroku. Inkubace s roztokem sekundární protilátky v TBS-T probíhala na třepačce při pokojové teplotě po dobu 1 hodiny.

- a) Sekundární protilátka pro Defensin-1 ředění 1:15 000
- b) Sekundární protilátka pro Hymenoptaecin ředění 1:15 000
- c) Sekundární protilátka pro Abaecin ředění 1:15 000

Po uplynutí času inkubace proběhnul opět promývací krok stejný jako ty předchozí. Barvení membrány proběhlo stejně jako při detekci Vitellogeninu pomocí NBT, BCIP a pufru pro alkalickou fosfatasy (viz kapitola 3.2.4.1 Průběh detekce vitellogeninu metodou Western blot).

Tab 5: Složení gelů na Tricinovou elektroforézu (Objemy pro 4 gely).

Typ gelu	AB-6	AB-3	Gelový pufr	glycerol	H ₂ O	TEMED	APS	Močovina
16% dělicí s močovinou	10 ml	-	10 ml	3 g	10 ml	10 µl	100 µl	10,8
4% zaostřovací	-	1 ml	3 ml	-	8 ml	9 µl	90 µl	-

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Informace o biologickém materiálu

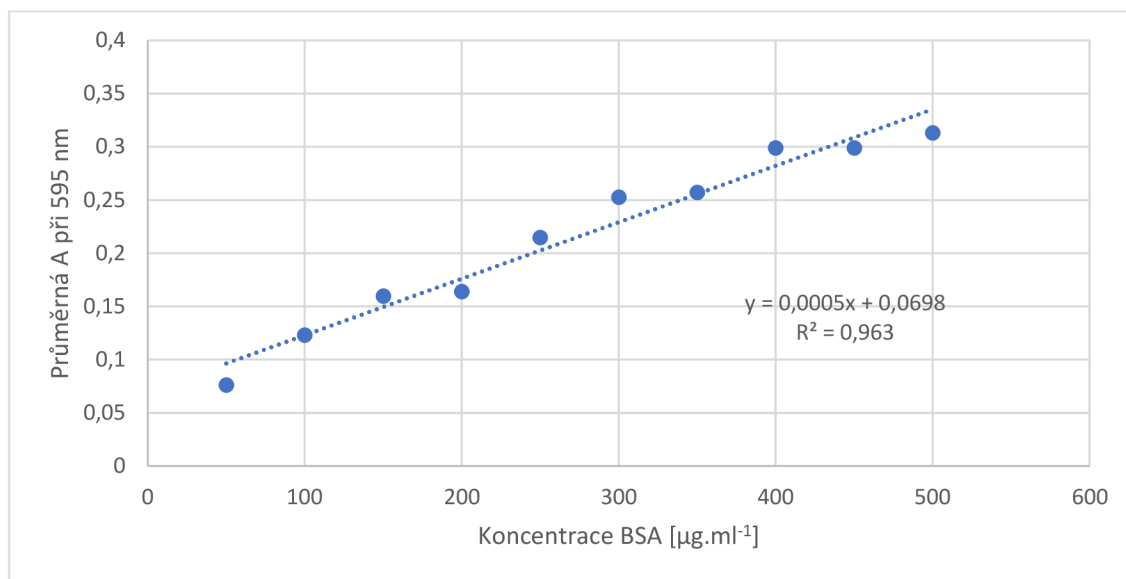
Pro určení vývojového instaru byly larvy zváženy a současně byla zvážena i odebraná mateří kašička. Viz tabulka 6.

Tab. 6: Přehled základních informací o odebraných vzorcích.

Číslo vzorku	Hmotnost larvy [mg]	Larvální stádium	Hmotnost mateří kašičky [mg]
1	16,0	L4	3,9
2	20,0	L4	4,8
3	11,5	L4	1,6
4	10,5	L4	3,7
5	24,6	L4	3,6
6	23,0	L4	3,9
7	0,3	L1	0,6
8	15,0	L4	3,7
9	29,0	L5	4,0
10	16,4	L4	3,4
11	4,4	L3	2,2
12	25,1	L4	3,8
13	14,7	L4	5,9
14	16,2	L4	5,3
15	-	-	-
16	11,0	L4	1,2
17	105,1	L5	2,2
18	42,1	L5	3,3
19	96,6	L5	4,2
20	97,2	L5	3,9
21	108,9	L5	2,2
22	68,8	L5	3,2
23	149,3	L5	3,8
24	101,6	L5	1,7
25	-	-	-
26	85,7	L5	3,7
27	94,0	L5	3,3
28	81,7	L5	3,9
29	44,0	L5	3,4
30	88,9	L5	3,0
31	58,6	L5	7,1
32	69,7	L5	1,9
33	68,3	L5	2,5
34	88,3	L5	4,3
35	167,3	LS	0,6
36	14,2	L4	0,9
37	-	-	-

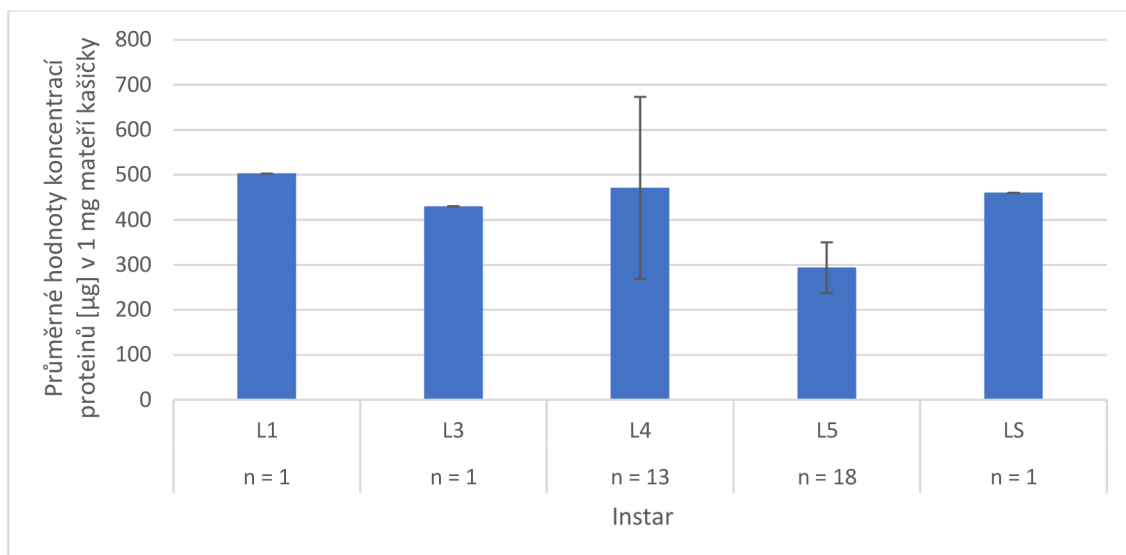
4.2 Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou

Byla změřena absorbance 10 standardizovaných roztoků BSA při 595 nm. Všechny standardy byly měřeny v technických triplikátech vůči blanku. Absorbance byla měřena za pomoci spektrofotometrického readru na mikrodestičkovém uspořádání. Z hodnot absorbancí triplikátů naměřených při vlnové délce 595 nm byly vytvořeny průměrné hodnoty a byl odečten blank. Sestrojená kalibrační přímka je zobrazena na obr. 9. Rovnice kalibrační funkce je $y = 0,0005x + 0,0698$, $R^2 = 0,963$.



Obr. 9: Závislost průměrné absorbance na koncentraci standardizovaných roztoků BSA při 595 nm.

Vzorky mateří kaše odebrané z plástve larvám různého stáří byly proměřeny a výsledky zpracovány stejným způsobem jako kalibrační roztoky BSA. Hodnoty průměrných absorbancí vypočítaných z triplikátů byly po odečtení blanku dosazeny do rovnice přímky a byla vypočítána koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích. Díky tomu bylo možné naředit vzorky na jednotnou koncentraci 100 $\mu\text{g/ml}$ proteinu. U vzorků 15, 25 a 37 vyšla hodnota koncentrace v záporných číslech, proto byly tyto vzorky vyřazeny. Následně byla vypočítána i koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích na 1 mg mateří kašičky. Hodnoty koncentrace proteinů v 1 mg mateří kašičky byly vyneseny do grafu, pro prověření teorie, zda se obsah proteinů mění v závislosti na hmotnosti larvy (jejím stáří a instaru). Viz obrázek 10.



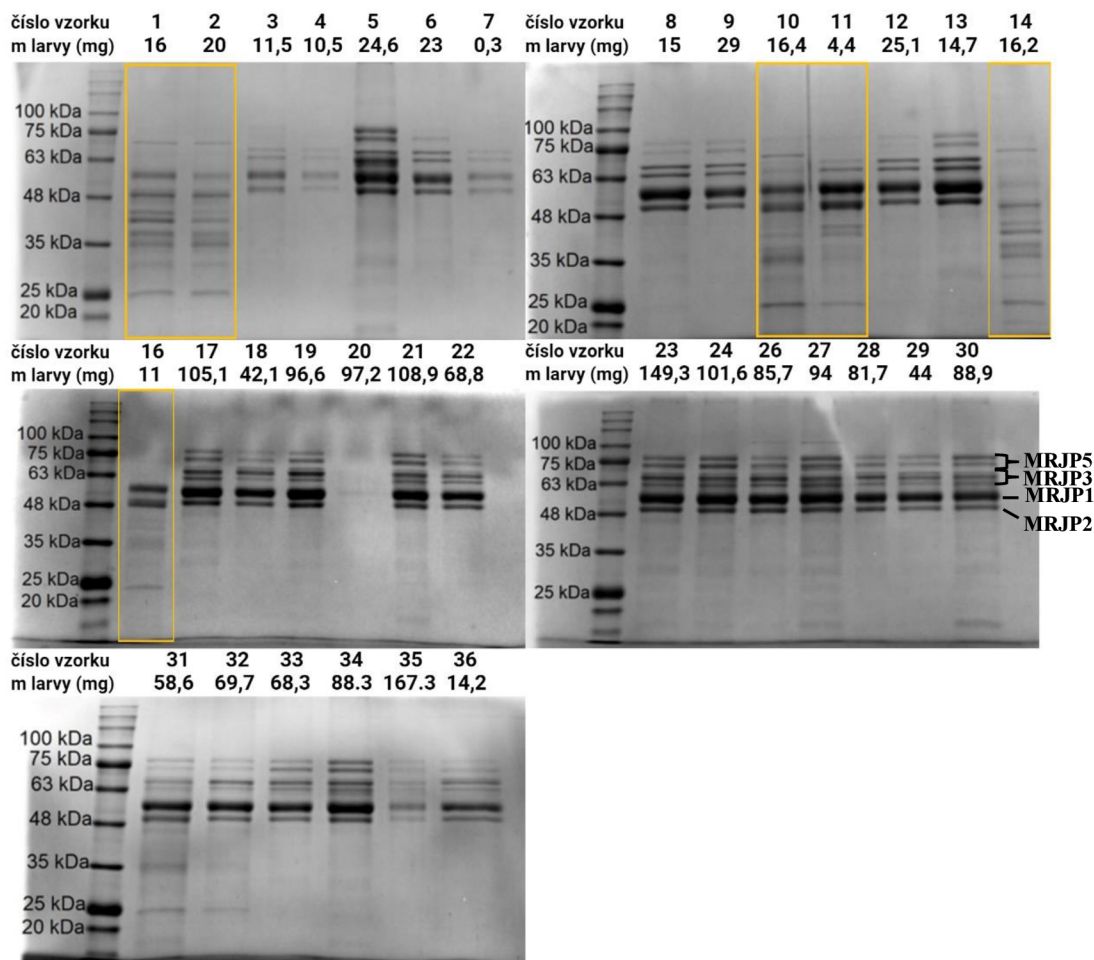
Obr. 10: Vynesení (průměrných u L4 a L5) hodnot koncentrací proteinu [µg] v 1 mg mateří kašičky v rámci jednotlivých instarů. Pro nedostatek vzorků v instaru L1, L3 a LS nebylo možné stanovit průměrnou hodnotu ani směrodatnou odchylku.

I přesto že v každém instaru je nerovnoměrný počet vzorků mohl by graf na obrázku 10 naznačovat, že se hladina proteinů v mateří kaši mění v závislosti na vývojovém stádiu larvy. U instaru L5 je vidět mírný pokles koncentrace proteinů v 1 mg mateří kašičky. Přesto že tato data nejsou zcela průkazná mohla by poskytnout základ dalšímu a rozsáhlejšímu výzkumu. Vyšší počet vzorků a jejich rovnoměrné zastoupení v instarech by mohlo poskytnout průkaznější výsledek. Nerovnoměrné zastoupení larev v jednotlivých instarech bylo v tomto experimentu způsobeno obtížným odběrem mateří kašičky z pláství uchovávaných v mrazicím boxe. Hlavně u stádií L1, L2 a L3 byl odběr nejvíce komplikovaný z důvodu nízké hmotnosti těchto larev. Díky malým rozdílům ve hmotnostech mezi stádii se od sebe špatně rozlišovaly. Další komplikací bylo malé množství mateří kašičky u mladých larev, kdy díky uchování v mrazicím boxe často došlo k vysušení mateří kašičky mrazem a nebyla tudíž vhodná pro experiment.

4.3 Detekce proteinového složení pomocí barviva CBB G-250

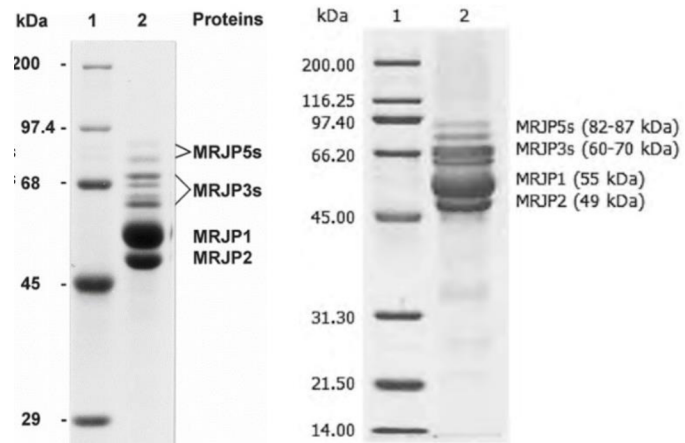
Vzorky mateří kašičky naředěné na koncentraci 100 µg/ml proteinu byly rozděleny pomocí metody SDS-PAGE a následně vizualizovány CBB G-250. Po vizualizaci rozdělení jednotlivých proteinů na základě molekulové hmotnosti bylo možné odhadnout, jaké proteiny se ve vzorcích nacházejí, a zjistit, zda se se změnou stáří larvy mění i proteinové složení mateří kašičky. Viz obrázek 11. Většina vzorků vykazuje jednotný proteinový profil obsahující bandy v rozmezí 48-100 kDa. Po srovnání s výsledky výzkumů mateří kašičky uvedenými v článcích (Hu et al., 2019; Schmitzová et al., 1998) (viz obrázek 12) je patrné, že výsledek analýzy (proteinové složení) je velmi podobný až shodný. Jak je již zmíněno v kapitole 2.4.1.2 o proteinovém složení mateří kašičky, nejvíce jsou zde zastoupeny MRJP proteiny. Protein MRJP1 by podle (Hu et al., 2019) měl mít molekulovou hmotnost 55 kDa, MRJP2 49 kDa a skupiny MRJP3 a MRJP5 proteinů by měly mít molekulové hmotnosti mezi 60-70 kDa a 82-87 kDa. Podle odhadu byl nejvíce zastoupeným proteinem MRJP1, což souhlasí s dosavadními poznatky o složení mateří kašičce. Co se však liší je intenzita bandů napříč jednotlivými vzorky.

Proteinové složení u vzorků 1,2, 10, 11, 14 a 16 (viz obrázek 11) je zcela nebo částečně rozdílné od složení zbytku vzorků, které se shodovalo i s výsledky dle (Hu et al., 2019; Schmitzová et al., 1998) Vzorky s rozdílným proteinovým složením jsou na obrázku 11 označeny žlutým ohraničením. Hmotnosti larev, od kterých byly odebrány vzorky 1, 2, 10, 11, 14 a 16, jsou v rozmezí 4,4-20 mg. Mohlo by se zdát, že v této fázi života larvy se mění proteinové složení mateří kašičky, avšak u ostatních vzorků, které také zapadají do tohoto intervalu hmotností byl nalezen očekávaný proteinový profil. Jeden z možných důvodů vysvětlující změnu složení by mohlo být naštěpení vzorku z důvodu přítomnosti proteas. Dalším možným důvodem by mohla být degradace způsobena nedostatečně šetrným zacházením se vzorkem (nedostatečné chlazení vzorku při odběru mateří kašičky).



Obr. 11: Výsledky elektroforetické separace metodou SDS-PAGE a následné vizualizace pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue. Všechny vzorky jsou označeny číslem vzorku i hmotností larvy, od které byly odebrány. Většina vzorků s výjimkou žlutě vyznačených vykazují velmi podobný proteinový profil. Liší se u nich více či méně intenzita bandů, která je přímo úměrná hladině proteinů ve vzorku. Vzorky se žlutým označením vykazují rozdílné proteinové složení. U vzorku 20 došlo z důvodu absence proteinů nejspíše k technické chybě.

Rozdílnou intenzitou bandů mezi jednotlivými vzorky se zatím žádný článek nezabývá. Na obrázku 12 jsou vyobrazeny výsledky prozatím nejpodobnějších experimentů (Hu et al., 2019; Schmitzová et al., 1998). Avšak ty se zabývaly pouze proteinovým profilem směšného vzorku mateří kaše.



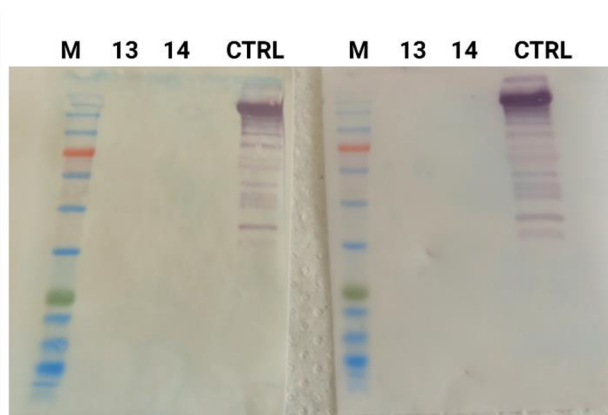
Obr. 12: Výsledky vizualizace proteinů po rozdělení podle molekulové hmotnosti uvedených v článku (Hu et al., 2019) (vlevo) a článku (Schmitzová et al., 1998) (vpravo).

4.4 Metoda Western blot

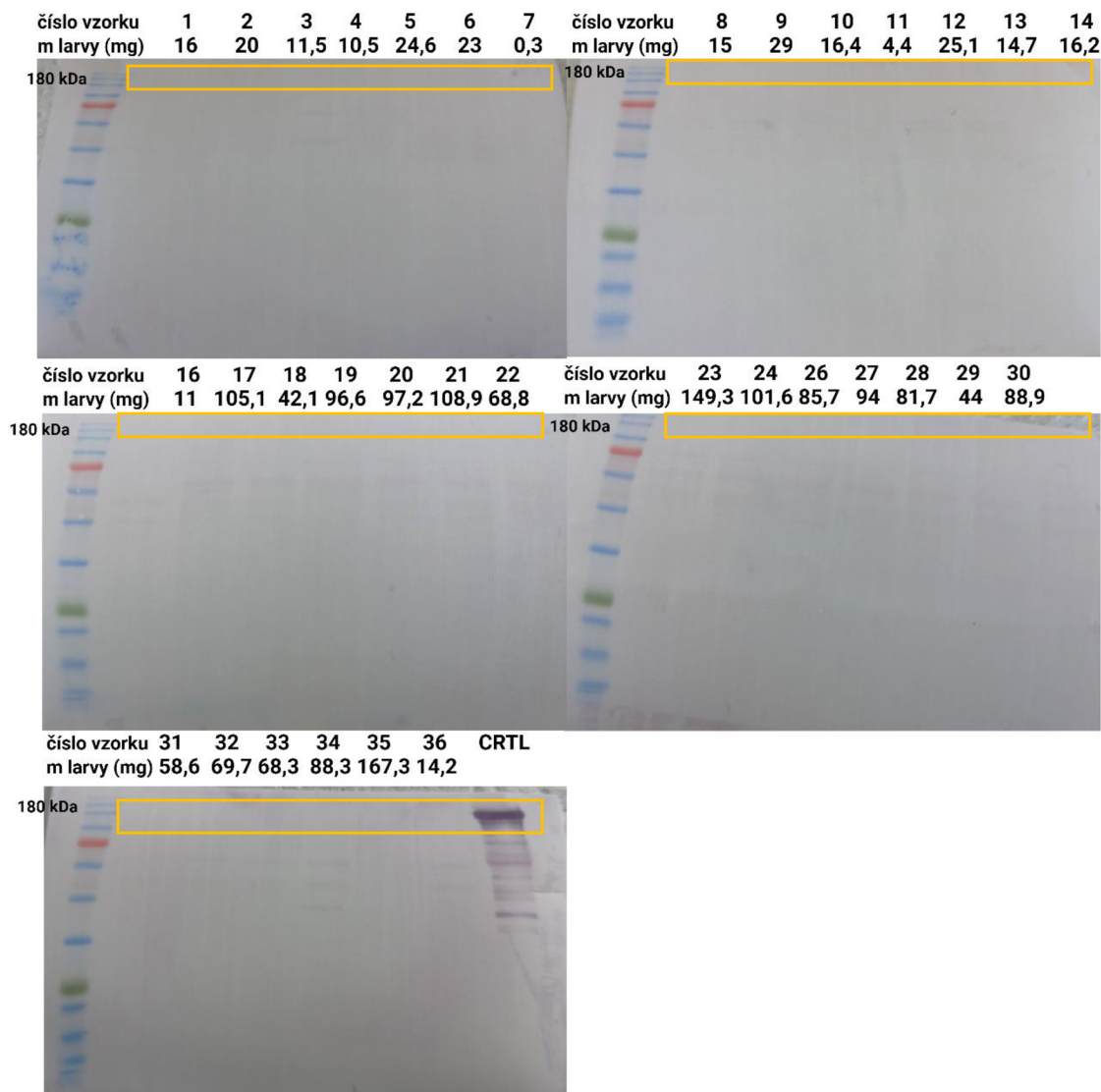
Stejně jako u předchozí metody byly proteiny ve vzorcích odebrané mateří kaše rozděleny pomocí SDS-PAGE nebo tricínové SDS-PAGE elektroforézy. Po přenosu proteinů z gelu na membránu byla provedena imunodetekce, díky které bylo možné potvrdit přítomnost konkrétních proteinů či peptidů (Vg, defensinu-1, abaecinu a hymenoptaecinu) ve vzorcích mateří kašičky.

4.4.1 Imunodetekce vitellogeninu

I v rámci této bakalářské práce byla nově potvrzena již výše zmiňovaná teorie, která tvrdila, že Vg není v mateří kašičce přítomen. Tato teorie byla poprvé podpořena a potvrzena imunodetekcí Vg v mateří kaši pomocí specifické protilátky ve srovnání s kontrolou (hemolymfa včelích matek). Hemolymfa včelích matek byla jako pozitivní kontrola zvolena z důvodu vysokého obsahu Vg, byla naředěna v poměru 1:9 a je na obrázcích 13 a 14 označena jako CTRL. U vzorku s kontrolou je jasně patrný band v oblasti 180 kDa, který odpovídá molární hmotnosti proteinu Vg. Viditelnost dalších bandů u tohoto vzorku může naznačovat vysokou koncentraci proteinů ve vzorku nebo nižší specifitu protilátky. Byla provedena také optimalizace této metody (viz obrázek 13). Pro vylepšení detekce Vg byl experiment proveden na dvou různých membránách nitrocelulosoové a PVDF, kdy PVDF membrána se ukázala jako vhodnější, díky ostřejšímu zobrazení bandů.



Obr. 13: Na levé straně je vidět výsledek barvení proteinů s navázanou protilátkou s použitím nitrocelulosoové membrány. Vpravo je pak vidět výsledek barvení proteinů s navázanou protilátkou s použitím PVDF membrány. Pro optimalizaci byly použity vzorky 13, 14 a kontrolní vzorek hemolymfy včelích matek naředěný v poměru 1:9.

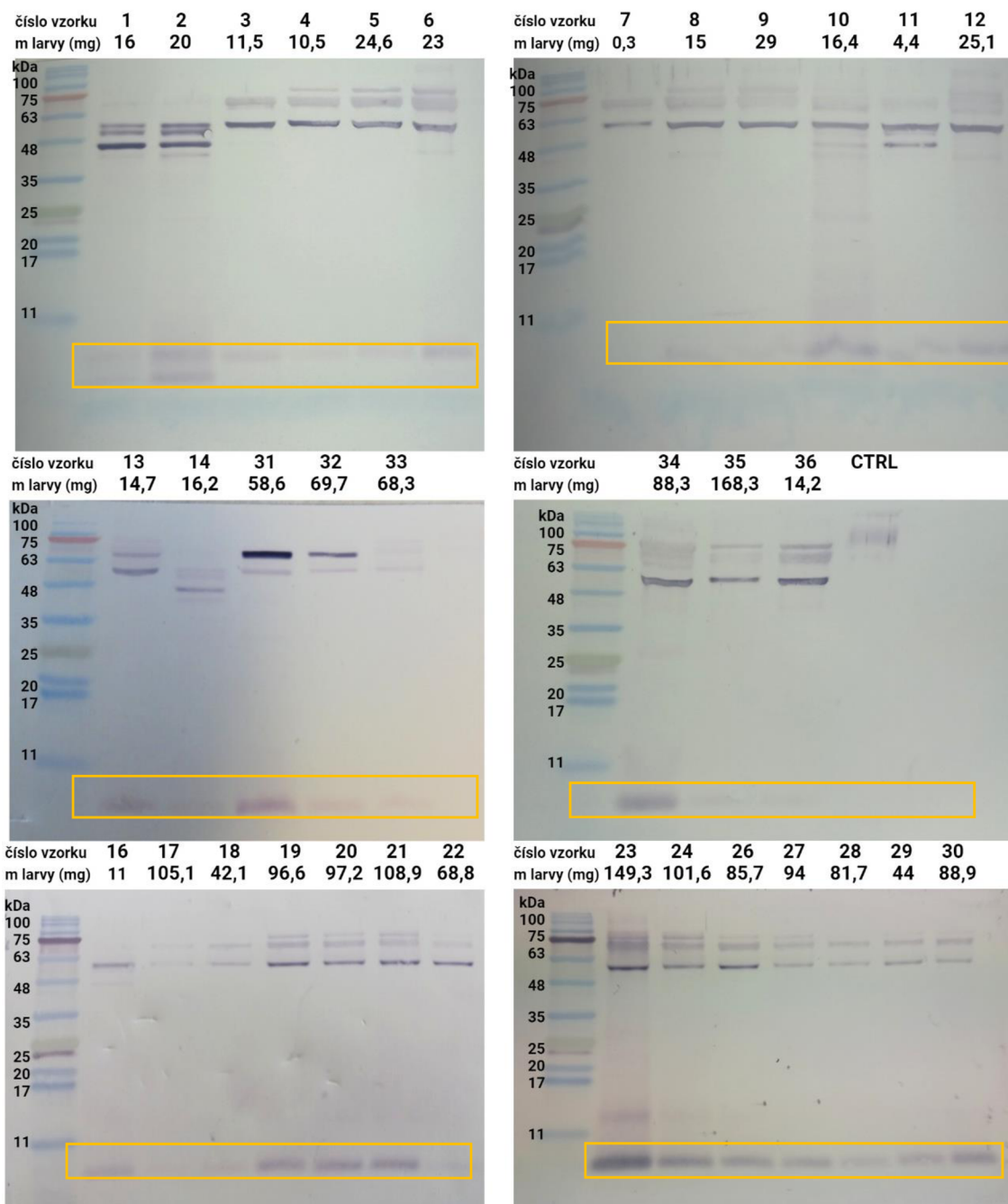


Obr. 14: Snímky výsledků imunodetekce proteinu Vg v mateří kašičce odebrané larvám různého stáří. Jednotlivé vzorky jsou označeny číslem vzorku a také hmotností larvy, od které byly odebrány. Pod označením CTRL se nachází kontrolní vzorek hemolymfy včelích matek.

Důkaz o nepřítomnosti Vg v mateří kašičce může mít velký přínos pro výzkum mechanismu transportu fragmentů mikrobů a bakterií tělem včely medonosné. Bylo prokázáno je, že Vg slouží jako transportní protein pro fragmenty mikrobů a bakterií v hemolymfě. Dále bylo potvrzeno, že dochází k přenosu imunitní paměti z včely dělnice na larvu (Contreras-Garduño et al., 2016) avšak mechanismus není přesně znám. Vystává tedy otázka, jakým způsobem dochází k přenosu imunitní paměti, pokud v mateří kašičce není Vg přítomný. Tímto se otevřela nová možnost dalšího výzkumu, která by mohly navazovat na výsledky v této práci.

4.4.2 Imunodetekce royalisinu

Royalisin je jedním z AmP, které se v mateří kašičce přirozeně vyskytují. Pro detekci royalisinu byla použita protilátka na detekci defensinu-1, který se od royalisinu liší pouze záměnou jedné aminokyseliny a vazebná místa pro protilátku se tak neliší. Royalisin má molekulovou hmotnost 5,5 kDa. Pokud se podíváme na výsledky imunodetekce tohoto AmP, jsou jasně patrné bandy v oblasti, která by odpovídala jeho molekulové hmotnosti. Tyto bandy jsou žlutě vyznačeny. Na membránách jsou ale i výraznější bandy, a to v oblasti MRJP proteinů. Nejvíce se protilátka vážala na MRJP1 a proteinovou skupinu MRJP3. Toto navázání mohlo být způsobeno nejspíše výskytem podobné vazebné domény, jaká se vyskytuje i na royalisinu, nebo se royalisin přímo odštěpuje z proteinu MRJP1. Na C-konci proteinu MRJP1 se prokazatelně nacházejí prekurzory ze kterých se následně odštěpí AmP jelleiny 1-3 (Fontana et al., 2004). Je tedy otázka, zda by mohlo jít i u royalisinu o stejný princip nebo zda se jedná pouze o nižší specifitu protilátky. Zda se jedná o nižší specifitu protilátky a zda se tedy navazuje i na jiné proteiny by šlo prověřit například pomocí metody ELISA nebo pomocí imunoprecipitace. Pro kontrolu správného fungování metody detekce byl použit kontrolní vzorek obsahující defensin-1 konjugovaný s BSA. Tato kontrola je na obrázku 15 označena jako CTRL.



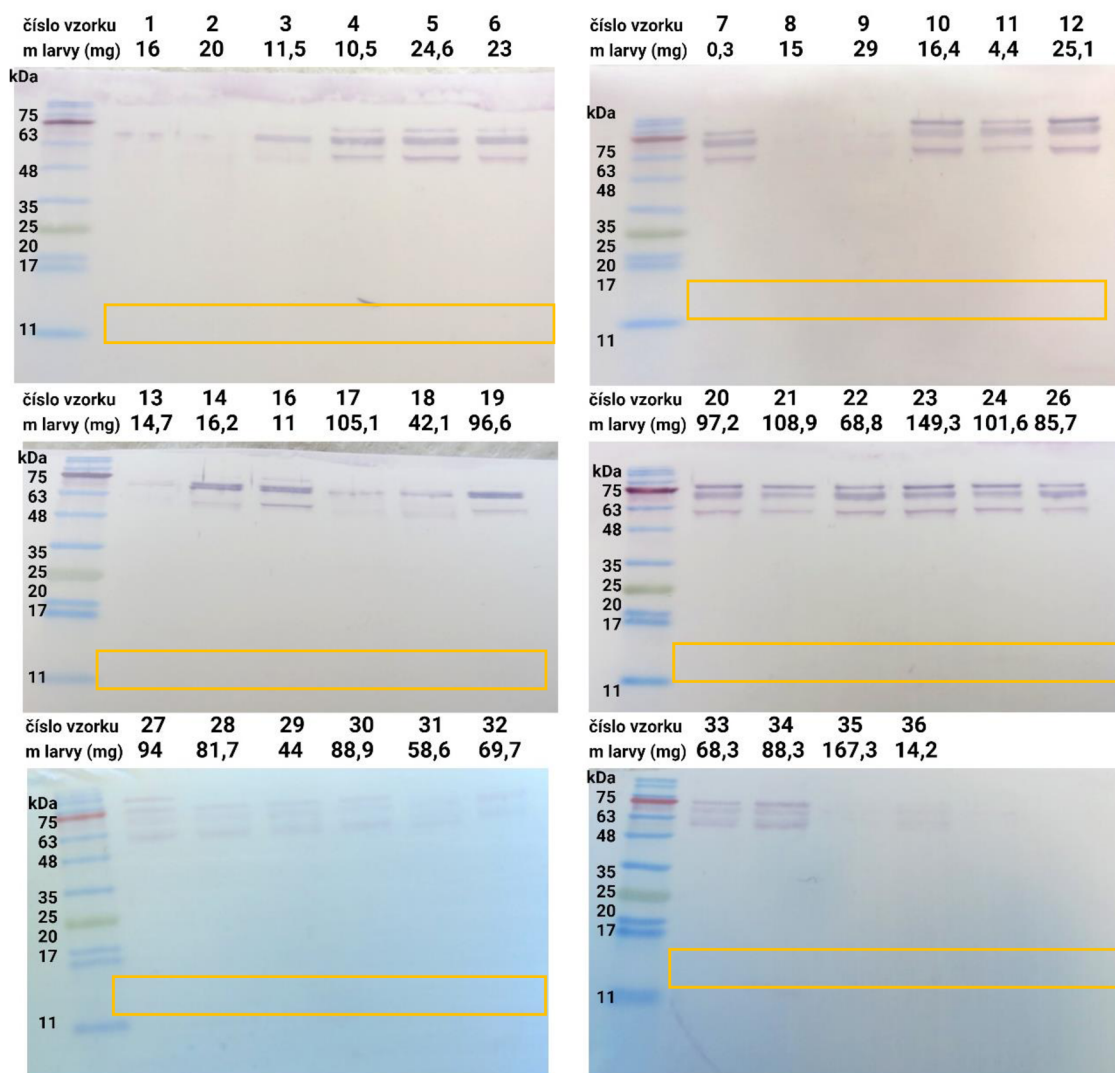
Obr. 15: Snímky výsledků imunodetekce AmP royalisinu v mateří kaši odebrané larvám různého stáří. Jednotlivé vzorky jsou označeny číslem a také hmotností larvy, od které byly odebrány. Pod označením CTRL se nachází kontrolní vzorek Defensinu-1 konjugovaný s BSA.

Při literární rešerši k této bakalářské práci jsem doposud nenarazila na článek, který by se zabýval analýzou AmP v mateří kašičce touto metodou. Výsledky získané v této práci sice přímo nedokazují že se jedná o royalisin, jde pouze o odhad. Pro ověření a další zpřesnění by bylo nutné peptid analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie. Pokud by se tento odhad dalším výzkumem potvrdil, můžeme se domnívat, že AmP royalisin může s velkou pravděpodobností zásadně ovlivnit imunitní systém a zdraví larev v různých stádiích vývoje. Bandy značící jeho přítomnost se objevily ve všech vzorcích bez ohledu

na instar. Při pohledu na intenzitu jednotlivých bandů je však patrné, že by se mohla v závislosti na stáří larvy měnit jeho koncentrace.

4.4.3 Imunodetekce hymenoptaecinu

Hymenoptaecin patří mezi AmP, které se přirozeně vyskytují v hemolymfě včely medonosné. Účelem experimentu bylo zjistit, zda se v mateří kašičce tento AmP vyskytuje nebo ne. Doposud nevyšel žádný článek, který by nepřítomnost tohoto AmP v mateří kašičce prokázal nebo který by podrobil tento sekret analýze pomocí metody western blot s imunodetekcí na hymenoptaecin. Zatím se pouze předpokládalo, že hymenoptaecin se vyskytuje převážně v hemolymfě. Molekulová hmotnost hymenoptaecinu je přibližně 12,4 kDa (Daníhlík et al., 2015).

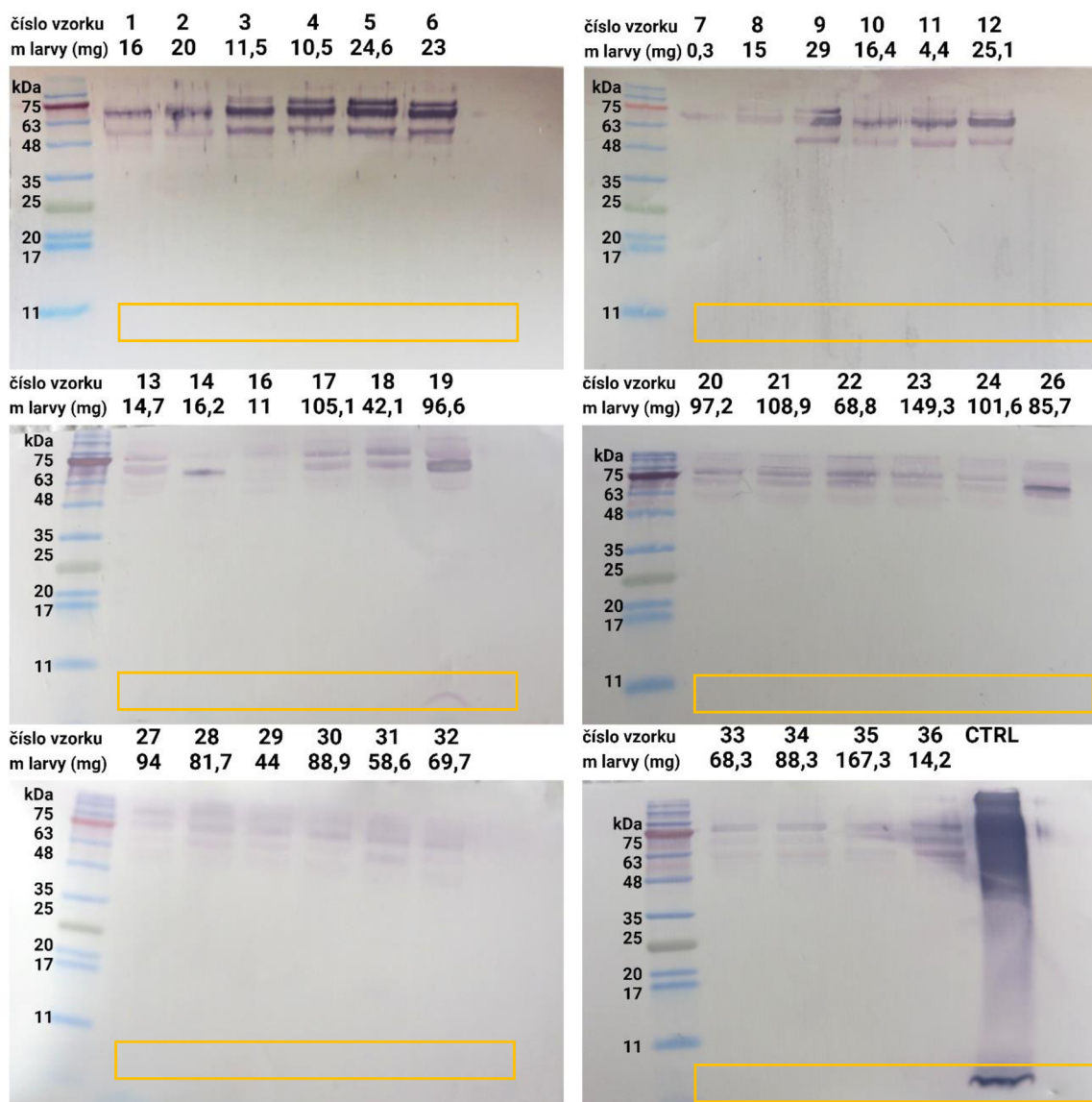


Obr. 16: Snímky výsledků imunodetekce AmP hymenoptaecinu v mateří kaši odebrané larvám různého stáří. Jednotlivé vzorky jsou označeny číslem a také hmotností larvy, od které byly odebrány. Výsledek na přítomnost hymenoptaecinu v mateří kaši je negativní. Oblast molekulové hmotnosti, ve které by se bandy označující peptid hymenoptaecin nacházely, jsou žlutě označeny.

Bandy označující přítomnost tohoto peptidu by se tedy měly vyskytovat ve žlutě označené oblasti na obrázku 16. Jelikož je však tato oblast prázdná nebyla přítomnost hymenoptaecinu v mateří kaši dokázána. Detekované bandy v oblasti mezi 55-100 kDa by mohly být opět způsobeny navázáním protilátky na MRJP proteiny. Důvodem může být podobné vazebné místo na proteinu nebo nižší specifita protilátky. Stejně jako u ostatních AmP by se dala tato teorie prokázat metodou ELISA nebo imunoprecipitací.

4.4.4 Imunodetekce abaecinu

Abaecin je stejně jako hymenoptaecin AmP, který se přirozeně vyskytuje v hemolymfě včely medonosné. Jeho přítomnost v mateří kaši nebyla dosud prokázána. Existovala opět pouze teorie, že se v mateří kaši nevyskytuje. Tuto myšlenku potvrzují snímky imunodetekce tohoto peptidu viz obrázek 17, které vykazují negativní výsledek (nepřítomnost bandů) v oblasti 4,8 kDa (odpovídá molekulové hmotnosti abaecinu). Zmíněná oblast je na snímcích žlutě vyznačena. Jako kontrola byl použitý roztok abaecinu konjugovaný s BSA, kvůli vysoké koncentraci byl protilátkou označen celý sloupec. I přes zkrácení vysokou koncentrací vzorku jsou patrné dva bandy. Jeden označuje abaecin konjugovaný s BSA a druhý samostatný abaecin, který mohl degradovat.



Obr. 17: Snímky výsledků imunodetekce AmP abaecinu v mateří kaši odebrané larvám různého stáří. Jednotlivé vzorky jsou označeny číslem a také hmotností larvy, od které byly odebrány. Výsledek na přítomnost abaecinu v mateří kaši je negativní. Oblast molekulové hmotnosti, ve které by se bandy označující peptid abaecin nacházely, jsou žlutě označeny.

Analýza AmP royalisinu, hymenoptaecinu a abaecinu určitě poskytla základní informace a přehled o složení mateří kašičky, avšak nejsou to zdaleka všechny AmP, které se v ní mohou vyskytovat. Mohou se zde nacházet jelleiny, apidaeciny atd (Daníhlík et al., 2015). Pokud bychom chtěli důkladně prozkoumat vlastnosti a procesy, kterých se mateří kašička účastní, bylo by potřeba udělat komplexnější analýzu složení a analyzovat její složení v různých situacích života včely. Může to být hlavně pozorování změn ve složení mateří kašičky, jak u různě starých larev (částečně se zabývá i tato práce), tak ale i například po podání patogenů včelám dělnicím. Všechna tato měření by mohla podhalit skryté mechanismy imunitního primingu u hmyzu.

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši zabývající se stěžejně imunitním primingem hmyzu. Pro doplnění kontextu a pochopení základních informací o tomto procesu jsou úvodní kapitoly věnovány i imunitnímu systému hmyzu s konkrétním zaměřením na včelu medonosnou. Důkladněji byla rozebrána hlavně kapitola o buněčné a humorální imunitě, která s imunitním primingem úzce souvisí. Dále bylo představeno několik základních mechanismů stimulace imunitního systému. Na samotné téma imunitního primingu bylo následně nahlíženo z několika úhlů. U spousty druhů hmyzu se imunitní priming vyskytuje pouze v jedné generaci. Ale u některých druhů, příkladem může být včela medonosná, byla vyřčena teorie o tzv. transgeneračním imunitním primingu, při kterém by docházelo k přenosu imunitní paměti z rodiče na potomka v rámci reprodukčního cyklu. Jsou výzkumy jejichž výsledky tuto teorii potvrzují, avšak nebyla ještě plně prokázána. Praktická část práce se zabývala analýzou složení, konkrétně proteinového složení, potravy včelích larev tedy mateří kašičkou. K rozboru složení mateří kašičky byla použita metoda pro stanovení hladiny proteinů (Bradfordova metoda), metoda, která tyto proteiny rozdělí a je pak možné je odhadem identifikovat (SDS-PAGE) a imunodetekční metoda Western blot, která detekuje určitý protein pomocí primární a sekundární protilátky.

V této práci bylo dosaženo následujících výsledků:

- Byla stanovena hladina celkových proteinů ve vzorcích mateří kašičky odebrané larvám různého stáří. Výsledky naznačují, že by se hladina těchto proteinů mohla v závislosti na stáří larvy měnit.
- Proteiny nacházející se v mateří kašičce byly rozděleny pomocí SDS-PAGE elektroforézy a mohly tak být po srovnání s výsledky ostatních výzkumů odhadem identifikovány.
- Imunodetekční metodou western blot byla detekována přítomnost AmP royalisinu, hymenoptaecinu, abaecinu a proteinu vitellogeninu. U hymenoptaecinu, abaecinu a vitellogeninu byly výsledky na jejich přítomnost v mateří kaši negativní. Royalisin byl s velkou pravděpodobností detekován, ale stoprocentně by se tento výsledek mohl potvrdit pomocí identifikace peptidu pomocí hmotnostní spektrometrie.

Další práce navazující na toto téma by se mohla zaměřit na přesnou identifikaci rozdělených proteinů a potvrzení přítomnosti royalisinu v mateří kašičce. Podrobnější

výzkum by si také zasloužil i rozbor hladiny proteinu pro jednotlivá vývojová stádia larev.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ahmed, S., Sajjadian, S. M., & Kim, Y. (2022). HMGB1-Like Dorsal Switch Protein 1 Triggers a Damage Signal in Mosquito Gut to Activate Dual Oxidase via Eicosanoids. *Journal of Innate Immunity*, 14(6). <https://doi.org/10.1159/000524561>
- Amdam, G. V., & Omholt, S. W. (2002). The regulatory anatomy of honeybee lifespan. *Journal of Theoretical Biology*, 216(2). <https://doi.org/10.1006/jtbi.2002.2545>
- Amdam, G. V., Aase, A. L. T. O., Seehuus, S. C., Kim Fondrk, M., Norberg, K., & Hartfelder, K. (2005). Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology*, 40(12). <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.08.004>
- Amdam, G. V., Ihle, K. E., & Page, R. E. (2009). Regulation of honeybee worker (*Apis mellifera*) life histories by vitellogenin. In *Hormones, Brain and Behavior Online*. <https://doi.org/10.1016/B978-008088783-8.00029-2>
- Anselme, C., Vallier, A., Balmand, S., Fauvarque, M. O., & Heddi, A. (2006). Host PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(10). <https://doi.org/10.1128/AEM.00942-06>
- Ao, J. qun, Ling, E., & Yu, X. Q. (2008). A Toll receptor from *Manduca sexta* is in response to *Escherichia coli* infection. *Molecular Immunology*, 45(2). <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2007.05.019>
- Ardia, D. R., Gantz, J. E., Schneider, B. C., & Strebel, S. (2012). Costs of immunity in insects: An induced immune response increases metabolic rate and decreases antimicrobial activity. *Functional Ecology*, 26(3). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.01989.x>
- Bergin, D., Murphy, L., Keenan, J., Clynes, M., & Kavanagh, K. (2006). Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes and Infection*, 8(8). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.03.005>
- Bíliková, K., Hanes, J., Nordhoff, E., Saenger, W., Klauđiny, J., & Šimúth, J. (2002). Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: Purification and molecular characterization. *FEBS Letters*, 528(1–3). [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03272-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03272-6)
- Blandin, S., & Levashina, E. A. (2004). Thioester-containing proteins and insect immunity. *Molecular Immunology*, 40(12). <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.010>
- Boman, H. G., & Hultmark, D. (1987). Cell-free immunity in insects. In *Annual review of microbiology* (Vol. 41). <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.000535>
- Bork, P., Downing, A. K., Kieffer, B., & Campbell, I. D. (1996). Structure and distribution of modules in extracellular proteins. In *Quarterly Reviews of Biophysics* (Vol. 29, Issue 2). <https://doi.org/10.1017/s0033583500005783>
- Bowdish, D. M. E., & Gordon, S. (2009). Conserved domains of the class A scavenger receptors: Evolution and function. In *Immunological Reviews* (Vol. 227, Issue 1). <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00728.x>

- Božič, J., & Valentinčič, T. (1995). Quantitative analysis of social grooming behavior of the honey bee *Apis mellifera carnica*. *Apidologie*, 26(2). <https://doi.org/10.1051/apido:19950207>
- Callewaert, L., & Michiels, C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. In *Journal of Biosciences* (Vol. 35, Issue 1). <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0015-5>
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., & Tempst, P. (1993). Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)53143-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)53143-4)
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., & Tempst, P. (1989). Apidaecins: Antibacterial peptides from honeybees. *EMBO Journal*, 8(8). <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08368.x>
- CASTEELS, P., AMPE, C., RIVIERE, L., van DAMME, J., ELICONE, C., FLEMING, M., JACOBS, F., & TEMPST, P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*, 187(2). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15315.x>
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., & Tempst, P. (1994). Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)61943-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)61943-5)
- Castillo, J., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2011). Blood feeding and insulin-like peptide 3 stimulate proliferation of hemocytes in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Pathogens*, 7(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002274>
- Cerenius, L., & Söderhäll, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. In *Immunological Reviews* (Vol. 198). <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>
- Chamilos, G., Samonis, G., & P. Kontoyiannis, D. (2012). *Drosophila melanogaster* As a Model Host for the Study of Microbial Pathogenicity And the Discovery of Novel Antimicrobial Compounds. *Current Pharmaceutical Design*, 17(13). <https://doi.org/10.2174/138161211795703744>
- Contreras-Garduño, J., Lanz-Mendoza, H., Franco, B., Nava, A., Pedraza-Reyes, M., & Canales-Lazcano, J. (2016). Insect immune priming: ecology and experimental evidences. In *Ecological Entomology* (Vol. 41, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/een.12300>
- Cooper, D., & Eleftherianos, I. (2017). Memory and specificity in the insect immune system: Current perspectives and future challenges. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00539>
- Cornman, R. S., Tarpay, D. R., Chen, Y., Jeffreys, L., Lopez, D., Pettis, J. S., vanEngelsdorp, D., & Evans, J. D. (2012). Pathogen webs in collapsing honey bee colonies. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043562>
- Costa-Leonardo, A. M., Laranjo, L. T., Janei, V., & Haifig, I. (2013). The fat body of termites: Functions and stored materials. In *Journal of Insect Physiology* (Vol. 59, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.03.009>
- Danihlík, J., Aronstein, K., & Petřivalský, M. (2015). Antimicrobial peptides: A key component of honey bee innate immunity. In *Journal of Apicultural Research* (Vol. 54, Issue 2). <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>

- Decoville, M., Giacomello, E., Leng, M., & Locker, D. (2001). DSP1, an HMG-like protein, is involved in the regulation of homeotic genes. *Genetics*, *157*(1). <https://doi.org/10.1093/genetics/157.1.237>
- Dickel, F., Bos, N. M. P., Hughes, H., Martín-Hernández, R., Higes, M., Kleiser, A., & Freitak, D. (2022). The oral vaccination with *Paenibacillus* larvae bacterin can decrease susceptibility to American Foulbrood infection in honey bees—A safety and efficacy study. *Frontiers in Veterinary Science*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.946237>
- Doublet, V., Labarussias, M., de Miranda, J. R., Moritz, R. F. A., & Paxton, R. J. (2015). Bees under stress: Sublethal doses of a neonicotinoid pesticide and pathogens interact to elevate honey bee mortality across the life cycle. *Environmental Microbiology*, *17*(4). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12426>
- Downes, J. A. (1965). Adaptations of Insects in the Arctic. *Annual Review of Entomology*, *10*(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.en.10.010165.001353>
- Dubovskiy, I. M., Kryukova, N. A., Glupov, V. V., & Ratcliffe, N. A. (2016). Encapsulation and nodulation in insects. In *Invertebrate Survival Journal* (Vol. 13).
- Eleftherianos, I., & Sachar, U. (2020). Thioester-containing proteins in the drosophila melanogaster immune response against the pathogen photorhabdus. In *Insects* (Vol. 11, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/insects11020085>
- Estrada, N., Velázquez, E., Rodríguez-Jaramillo, C., & Ascencio, F. (2016). Carbohydrate Moieties and Cytoenzymatic Characterization of Hemocytes in Whiteleg Shrimp *Litopenaeus vannamei*. *International Journal of Cell Biology*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/9032181>
- Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J. L., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G. J., Zou, Z., & Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, *15*(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>
- Fallon, J. P., Troy, N., & Kavanagh, K. (2011). Pre-exposure of *Galleria mellonella* larvae to different doses of *Aspergillus fumigatus* conidia causes differential activation of cellular and humoral immune responses. *Virulence*, *2*(5). <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17811>
- Fontana, R., Mendes, M. A., De Souza, B. M., Konno, K., César, L. M. M., Malaspina, O., & Palma, M. S. (2004). Jelleines: A family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*, *25*(6). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.03.016>
- Fratini, F., Cilia, G., Mancini, S., & Felicioli, A. (2016a). Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. In *Microbiological Research* (Vol. 192). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.007>
- Fratini, F., Cilia, G., Mancini, S., & Felicioli, A. (2016b). Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. In *Microbiological Research* (Vol. 192). <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.007>
- Fujimoto, K., Masuda, K. I., Asada, N., & Ohnishi, E. (1993). Purification and characterization of prophenoloxidasases from pupae of drosophila melanogaster1. *Journal of Biochemistry*, *113*(3). <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a124040>
- Fujita, T., Kozuka-Hata, H., Ao-Kondo, H., Kunieda, T., Oyama, M., & Kubo, T. (2013). Proteomic analysis of the royal jelly and characterization of the functions of its derivation glands in the honeybee. *Journal of Proteome Research*, *12*(1). <https://doi.org/10.1021/pr300700e>

- Gan, L., Chen, S., & Jensen, G. J. (2008). Molecular organization of Gram-negative peptidoglycan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(48). <https://doi.org/10.1073/pnas.0808035105>
- Gandhe, A. S., John, S. H., & Nagaraju, J. (2007). Noduler, A Novel Immune Up-Regulated Protein Mediates Nodulation Response in Insects. *The Journal of Immunology*, *179*(10). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.10.6943>
- Gillespie, J. P., Kanost, M. R., & Trenczek, T. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology*, *42*. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.611>
- Hartfelder, K., & Engels, W. (1998). Social insect polymorphism: hormonal regulation of plasticity in development and reproduction in the honeybee. In *Current topics in developmental biology* (Vol. 40). [https://doi.org/10.1016/s0070-2153\(08\)60364-6](https://doi.org/10.1016/s0070-2153(08)60364-6)
- Havukainen, H., Münch, D., Baumann, A., Zhong, S., Halskau, Ø., Krogsgaard, M., & Amdam, G. V. (2013). Vitellogenin recognizes cell damage through membrane binding and shields living cells from reactive oxygen species. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(39). <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465021>
- Havukainen, H., Underhaug, J., Wolschin, F., Amdam, G., & Halskau, Ø. (2012). A vitellogenin polyserine cleavage site: Highly disordered conformation protected from proteolysis by phosphorylation. *Journal of Experimental Biology*, *215*(11). <https://doi.org/10.1242/jeb.065623>
- Hellgren, O., Sheldon, B. C., & Buckling, A. (2010). In vitro tests of natural allelic variation of innate immune genes (avian β -defensins) reveal functional differences in microbial inhibition. *Journal of Evolutionary Biology*, *23*(12). <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2010.02115.x>
- Hillyer, J. F. (2016). Insect immunology and hematopoiesis. *Developmental and Comparative Immunology*, *58*. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.12.006>
- Hillyer, J. F., Schmidt, S. L., & Christensen, B. M. (2003). Rapid phagocytosis and melanization of bacteria and plasmodium sporozoites by hemocytes of the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Parasitology*, *89*(1). [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0062:RPAMOB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0062:RPAMOB]2.0.CO;2)
- Hoffmann, J. A., & Reichhart, J. M. (2002). Drosophila innate immunity: An evolutionary perspective. In *Nature Immunology* (Vol. 3, Issue 2). <https://doi.org/10.1038/ni0202-121>
- Hrithik, M. T. H., Ahmed, S., & Kim, Y. (2023). Damage signal induced by *Bacillus thuringiensis* infection triggers immune responses via a DAMP molecule in lepidopteran insect, *Spodoptera exigua*. *Developmental and Comparative Immunology*, *139*. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104559>
- Hu, F. L., Bíliková, K., Casabianca, H., Daniele, G., Salmen Espindola, F., Feng, M., Guan, C., Han, B., Křištof Kraková, T., Li, J. K., Li, L., Li, X. A., Šimúth, J., Wu, L. M., Wu, Y. Q., Xue, X. F., Xue, Y. B., Yamaguchi, K., Zeng, Z. J., ... Zhou, J. H. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* royal jelly research. *Journal of Apicultural Research*, *58*(2). <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1286003>
- Hultmark, D. (2003). Drosophila immunity: Paths and patterns. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 15, Issue 1). [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(02\)00005-5](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(02)00005-5)
- Jenthro, E., & Weis, S. (2021). DAMPs and Innate Immune Training. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 12). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.699563>

- Kurata, S. (2014). Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity. *Developmental and Comparative Immunology*, 42(1). <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.06.006>
- Laughton, A. M., Boots, M., & Siva-Jothy, M. T. (2011). The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology*, 57(7). <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.04.020>
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. In *Annual Review of Immunology* (Vol. 25). <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- Leonardi, M. S., Crespo, E. A., Raga, J. A., & Fernández, M. (2012). Scanning electron microscopy of *Antarctophthirus microchir* (Phthiraptera: Anoplura: Echinophthiriidae): Studying morphological adaptations to aquatic life. *Micron*, 43(9). <https://doi.org/10.1016/j.micron.2012.03.009>
- Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. In *Peptides* (Vol. 37, Issue 2). <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001>
- Lima, P. R. de, & Brochetto-Braga, M. R. (2003). Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 9(2). <https://doi.org/10.1590/s1678-91992003000200002>
- Liu, Y., Zhao, X., Naeem, M., & An, J. (2018). Crystal structure of peptidoglycan recognition protein SA in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Protein Science*, 27(4). <https://doi.org/10.1002/pro.3383>
- Ma, C., & Kanost, M. R. (2000). A β 1,3-glucan recognition protein from an insect, *Manduca sexta*, agglutinates microorganisms and activates the phenoloxidase cascade. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11). <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.7505>
- Malecová, B., Ramser, J., O'Brien, J. K., Janitz, M., Júdová, J., Lehrach, H., & Šimúth, J. (2003). Honeybee (*Apis mellifera* L.) mrjp gene family: Computational analysis of putative promoters and genomic structure of mrjp1, the gene coding for the most abundant protein of larval food. *Gene*, 303(1–2). [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)01174-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)01174-5)
- Manning, J. C., Romero, A., Habermann, F. A., García Caballero, G., Kaltner, H., & Gabius, H. J. (2017). Lectins: a primer for histochemists and cell biologists. In *Histochemistry and Cell Biology* (Vol. 147, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1524-6>
- Mayer, S., Raulf, M. K., & Lepenies, B. (2017). C-type lectins: their network and roles in pathogen recognition and immunity. In *Histochemistry and Cell Biology* (Vol. 147, Issue 2). <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1523-7>
- Melcarne, C., Lemaitre, B., & Kurant, E. (2019). Phagocytosis in *Drosophila*: From molecules and cellular machinery to physiology. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 109. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2019.04.002>
- Melliou, E., & Chinou, I. (2005a). Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23). <https://doi.org/10.1021/jf051550p>
- Melliou, E., & Chinou, I. (2005b). Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23). <https://doi.org/10.1021/jf051550p>

- Meunier, J. (2015). Social immunity and the evolution of group living in insects. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 370, Issue 1669). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0102>
- Mollah, M. M. I., Ahmed, S., & Kim, Y. (2021). Immune mediation of HMG-like DSP1 via Toll-Spätzle pathway and its specific inhibition by salicylic acid analogs. *PLoS Pathogens*, 17(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1009467>
- Mosrin-Huaman, C., Canaple, L., Locker, D., & Decoville, M. (1998). DSP1 gene of *Drosophila melanogaster* encodes an HMG-domain protein that plays multiple roles in development. *Developmental Genetics*, 23(4). [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6408\(1998\)23:4<324::AID-DVG7>3.0.CO;2-T](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6408(1998)23:4<324::AID-DVG7>3.0.CO;2-T)
- Myllymäki, H., & Rämet, M. (2014). JAK/STAT Pathway in *Drosophila* Immunity. In *Scandinavian Journal of Immunology* (Vol. 79, Issue 6). <https://doi.org/10.1111/sji.12170>
- NAPPI, A. J., & VASS, E. (1993). Melanogenesis and the Generation of Cytotoxic Molecules During Insect Cellular Immune Reactions. In *Pigment Cell Research* (Vol. 6, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1993.tb00590.x>
- Nation, Sr., J. L. (2021). Insect Physiology and Biochemistry. In *Insect Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1201/b18758>
- Pearson, A., Lux, A., & Krieger, M. (1995). Expression cloning of dSR-CI, a class C macrophage-specific scavenger receptor from *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.92.9.4056>
- Pech, L. L., & Strand, M. R. (2000). Plasmatocytes from the moth *Pseudoplusia includens* induce apoptosis of granular cells. *Journal of Insect Physiology*, 46(12). [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00083-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00083-4)
- Pettis, J. S., & Pankiw, T. (1998). Grooming behavior by *Apis mellifera* L. in the presence of *Acarapis woodi* (Rennie) (Acari: Tarsonemidae). *Apidologie*, 29(3). <https://doi.org/10.1051/apido:19980304>
- Pham, L. N., Dionne, M. S., Shirasu-Hiza, M., & Schneider, D. S. (2007). A specific primed immune response in *Drosophila* is dependent on phagocytes. *PLoS Pathogens*, 3(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030026>
- Philips, J. A., Rubin, E. J., & Perrimon, N. (2005). *Drosophila* RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science*, 309(5738). <https://doi.org/10.1126/science.1116006>
- Piñera, A. V., Charles, H. M., Dinh, T. A., & Killian, K. A. (2013). Maturation of the immune system of the male house cricket, *Acheta domesticus*. *Journal of Insect Physiology*, 59(8). <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.05.008>
- Piulachs, M. D., Guidugli, K. R., Barchuk, A. R., Cruz, J., Simões, Z. L. P., & Bellés, X. (2003). The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: Structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(4). [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00021-3)
- Purcell, A. H., & Almeida, R. P. P. (2004). Insects as Vectors of Disease Agents. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. <https://doi.org/10.1081/e-eps-120010496>
- Raikhel, A. S., & Dhadialla, T. S. (1992). Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology*, 37(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001245>

- Ramadan, M. F., & Al-Ghamdi, A. (2012a). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.12.007>
- Ramadan, M. F., & Al-Ghamdi, A. (2012b). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2011.12.007>
- Ramanathan, A. N. K. G., Nair, A. J., & Sugunan, V. S. (2018). A review on Royal Jelly proteins and peptides. In *Journal of Functional Foods* (Vol. 44). <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.008>
- Ratcliffe, N. A. (1985). Invertebrate immunity - A primer for the non-specialist. In *Immunology Letters* (Vol. 10, Issue 5). [https://doi.org/10.1016/0165-2478\(85\)90100-2](https://doi.org/10.1016/0165-2478(85)90100-2)
- REMBOLD, H., KREMER, J.-P., & ULRICH, G. M. (1980). CHARACTERIZATION OF POSTEMBRYONIC DEVELOPMENTAL STAGES OF THE FEMALE CASTES OF THE HONEY BEE, APIS MELLIFERA L. *Apidologie*, 11(1). <https://doi.org/10.1051/apido:19800104>
- Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-associated molecular patterns in inflammatory diseases. In *Immune Network* (Vol. 18, Issue 4). <https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27>
- Roy, M. C., Ahmed, S., & Kim, Y. (2022). Dorsal switch protein 1 as a damage signal in insect gut immunity to activate dual oxidase via an eicosanoid, PGE2. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.994626>
- Royet, J., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (2005). Sensing and signaling during infection in Drosophila. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 17, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2004.12.002>
- Sabatini, A. G. (2009a). Quality and standardisation of Royal Jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(1). <https://doi.org/10.3896/ibra.4.01.1.04>
- Sabatini, A. G. (2009b). Quality and standardisation of Royal Jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(1). <https://doi.org/10.3896/ibra.4.01.1.04>
- Sadd, B. M., & Schmid-Hempel, P. (2006). Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. *Current Biology*, 16(12). <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.047>
- Salmela, H., Amdam, G. V., & Freitak, D. (2015). Transfer of Immunity from Mother to Offspring Is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin. *PLoS Pathogens*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005015>
- Schleifer, K. H., & Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological Reviews*, 36(4). <https://doi.org/10.1128/br.36.4.407-477.1972>
- Schmid-Hempel, P. (2005). Natural insect host-parasite systems show immune priming and specificity: Puzzles to be solved. In *BioEssays* (Vol. 27, Issue 10). <https://doi.org/10.1002/bies.20282>
- Schmid-Hempel, P. (2021). Evolutionary Parasitology. In *Evolutionary Parasitology*. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198832140.001.0001>
- Schmitzová, J., Klaudivy, J., Albert, Š., Schröder, W., Schreckengost, W., Hanes, J., Júdová, J., & Šimúth, J. (1998). A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera* L. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(9). <https://doi.org/10.1007/s000180050229>

- Schwarz, R. S., Moran, N. A., & Evans, J. D. (2016). Early gut colonizers shape parasite susceptibility and microbiota composition in honey bee workers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(33). <https://doi.org/10.1073/pnas.1606631113>
- Seehuus, S. C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., & Amdam, G. V. (2006). Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.0502681103>
- Shiratsuchi, A., Mori, T., Sakurai, K., Nagaosa, K., Sekimizu, K., Lee, B. L., & Nakanishi, Y. (2012). Independent recognition of *Staphylococcus aureus* by two receptors for phagocytosis in *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry*, 287(26). <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.333807>
- Shokal, U., & Eleftherianos, I. (2017a). Evolution and function of thioester-containing proteins and the complement system in the innate immune response. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 8, Issue JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00759>
- Shokal, U., & Eleftherianos, I. (2017b). Thioester-containing Protein-4 regulates the *drosophila* immune signaling and function against the pathogen *photorhabdus*. *Journal of Innate Immunity*, 9(1). <https://doi.org/10.1159/000450610>
- Simone-Finstrom, M. D., & Spivak, M. (2012). Increased resin collection after parasite challenge: A case of self-medication in honey bees? *PLoS ONE*, 7(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034601>
- Šimúth, J. (2001a). Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie*, 32(1). <https://doi.org/10.1051/apido:2001112>
- Šimúth, J. (2001b). Some properties of the main protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Apidologie*, 32(1). <https://doi.org/10.1051/apido:2001112>
- Siva-Jothy, M. T., Moret, Y., & Rolff, J. (2005). Insect Immunity: An Evolutionary Ecology Perspective. In *Advances in Insect Physiology* (Vol. 32). [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(05\)32001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(05)32001-7)
- Stokes, B. A., Yadav, S., Shokal, U., Smith, L. C., & Eleftherianos, I. (2015). Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals. *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00019>
- Stroschein-Stevenson, S. L., Foley, E., O'Farrell, P. H., & Johnson, A. D. (2006). Identification of *Drosophila* gene products required for phagocytosis of *Candida albicans*. *PLoS Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040004>
- Sułek, M., Kordaczuk, J., & Wojda, I. (2021). Current understanding of immune priming phenomena in insects. *Journal of Invertebrate Pathology*, 185. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2021.107656>
- SUSSMAN, A. S. (1949). The functions of tyrosinase in insects. *The Quarterly Review of Biology*, 24(4). <https://doi.org/10.1086/397215>
- Takahashi, D., Dai, H., Hiromasa, Y., Krishnamoorthi, R., & Kanost, M. R. (2014). Self-association of an insect β -1,3-glucan recognition protein upon binding laminarin stimulates prophenoloxidase activation as an innate immune response. *Journal of Biological Chemistry*, 289(41). <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.583971>
- Tamura, S., Amano, S., Kono, T., Kondoh, J., Yamaguchi, K., Kobayashi, S., Ayabe, T., & Moriyama, T. (2009). Molecular characteristics and physiological

- functions of major royal jelly protein 1 oligomer. *Proteomics*, 9(24). <https://doi.org/10.1002/pmic.200900541>
- Tan, J., Xu, M., Zhang, K., Wang, X., Chen, S., Li, T., Xiang, Z., & Cui, H. (2013). Characterization of hemocytes proliferation in larval silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 59(6). <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.03.008>
- Tokura, A., Fu, G. S., Sakamoto, M., Endo, H., Tanaka, S., Kikuta, S., Tabunoki, H., & Sato, R. (2014). Factors functioning in nodule melanization of insects and their mechanisms of accumulation in nodules. *Journal of Insect Physiology*, 60(1). <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.11.003>
- Trenczek, T., Zillikens, A., & Engels, W. (1989). Developmental patterns of vitellogenin haemolymph titre and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 35(6). [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(89\)90054-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(89)90054-1)
- Tufail, M., & Takeda, M. (2008). Molecular characteristics of insect vitellogenins. In *Journal of Insect Physiology* (Vol. 54, Issue 12). <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.08.007>
- Valanne, S., Wang, J.-H., & Rämet, M. (2011). The Drosophila Toll Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 186(2). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302>
- Vilmos, P., & Kurucz, É. (1998). Insect immunity: Evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*, 62(2). [https://doi.org/10.1016/S0165-2478\(98\)00023-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2478(98)00023-6)
- Wang, X., Zhang, Y., Zhang, R., & Zhang, J. (2019). The diversity of pattern recognition receptors (PRRs) involved with insect defense against pathogens. In *Current Opinion in Insect Science* (Vol. 33). <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.05.004>
- Werner, T., Borge-Renberg, K., Mellroth, P., Steiner, H., & Hultmark, D. (2003). Functional diversity of the Drosophila PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *Journal of Biological Chemistry*, 278(29). <https://doi.org/10.1074/jbc.C300184200>
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., & Hultmark, D. (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25). <https://doi.org/10.1073/pnas.97.25.13772>
- Wheeler, D. E., & Kawooya, J. K. (1990). Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 14(4). <https://doi.org/10.1002/arch.940140405>
- Wilson, R., Chen, C., & Ratcliffe, N. A. (1999). Innate Immunity in Insects: The Role of Multiple, Endogenous Serum Lectins in the Recognition of Foreign Invaders in the Cockroach, *Blaberus discoidalis*. *The Journal of Immunology*, 162(3). <https://doi.org/10.4049/jimmunol.162.3.1590>
- Wyatt, G. R. (1961). The Biochemistry of Insect Hemolymph. *Annual Review of Entomology*, 6(1). <https://doi.org/10.1146/annurev.en.06.010161.000451>
- Wytrychowski, M., Daniele, G., & Casabianca, H. (2012). Combination of sugar analysis and stable isotope ratio mass spectrometry to detect the use of artificial sugars in royal jelly production. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(5). <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5934-6>

- Yi, H. Y., Chowdhury, M., Huang, Y. D., & Yu, X. Q. (2014). Insect antimicrobial peptides and their applications. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 98, Issue 13). <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5792-6>
- Yoshida, H., Kinoshita, K., & Ashida, M. (1996). Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*, 271(23). <https://doi.org/10.1074/jbc.271.23.13854>
- Zelensky, A. N., & Gready, J. E. (2005). The C-type lectin-like domain superfamily. In *FEBS Journal* (Vol. 272, Issue 24). <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x>
- Zhang, W., Tettamanti, G., Bassal, T., Heryanto, C., Eleftherianos, I., & Mohamed, A. (2021). Regulators and signalling in insect antimicrobial innate immunity: Functional molecules and cellular pathways. In *Cellular Signalling* (Vol. 83). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110003>
- Zhong, X., Xu, X. X., Yi, H. Y., Lin, C., & Yu, X. Q. (2012). A Toll-Spätzle pathway in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(7). <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.03.009>
- Zhu, Y., Yu, X., & Cheng, G. (2020). Insect C-Type Lectins in Microbial Infections. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1204). https://doi.org/10.1007/978-981-15-1580-4_5

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AA	akrylamid
AmP	antimikrobiální peptid
APS	persíran amonný
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát
BIS	bisakrylamid
BSA	hovězí sérová albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CTRL	kontrolní vzorek
DAMP	molekulární vzorce asociované s poškozením
DTT	dithiotreitol
K-Pi	K-fosfátový pufr
NBT	nitrotetrazoliová modř
PAMP	molekulární vzorce asociované s patogeny
PO	fenoloxidasa
proPO	profenoloxidasa
PRR	pattern recognition receptor
PVDF	polyvinilidenfluorid
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	diskontinuální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS
TBS	solný roztok pufrovaný tris
TBS-T	tween 20 v TBS
TEMED	N,N'-tetramethylendiamin
TgIP	transgenerační imunitní priming
Vg	vitellogenin