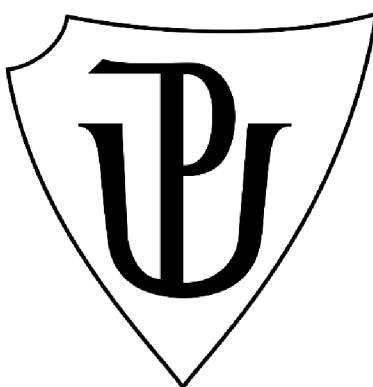


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Prírodovedecká fakulta  
Katedra biochémie



**Metódy detekcie a kvantifikácie včelieho  
vitellogenínu**

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

Autor:	<b>Bc. Eva Hrtánková</b>
Študijný program:	N1406 Biochémia
Študijný odbor:	Biochémia
Forma štúdia:	Prezenčná
Vedúci práce:	<b>Mgr. Silvie Dostálková, Ph.D.</b>
Rok:	2024

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

V Olomouci dňa .....

.....

Podpis študenta

Moja najväčšia vďaka patrí Mgr. Silvii Dostálkovej, PhD. za odborné vedenie, trpezlivosť, neustálu podporu a ochotu pomôcť s každým, často na prvý pohľad nevyriešiteľným problémom. Rovnako by som sa chcela poďakovať Mgr. Jiřimu Danihříkovi, PhD. za všetky cenné rady a pripomienky k pokusom, a tiež za poskytnuté včely. Za včelie matky veľmi pekne ďakujem Mgr. Bronislavovi Grunovi. Za poskytnutie primárnej protilátky proti Vg moja vďaka patrí prof. RNDr. Daliborovi Kodříkovi, CSc.. Osobitné poďakovanie by som chcela venovať mojej spolužiacke a kamarätke Bc. Gabriele Hofericovej za pomoc a podporu pri riešení problémov s optimalizáciami. V neposlednom rade ďakujem celému kolektívu Katedry biochémie za láskavý prístup a možnosť sa na kohokoľvek v prípade potreby s istotou obrátiť.

## Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Bc. Eva Hrtánková
Názov práce	Metódy detekcie a kvantifikácie včelieho vitellogenínu
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Katedra biochémie
Vedúci práce	Mgr. Silvie Dostáľková, Ph.D.
Rok obhajoby	2024

### Abstrakt

Diplomová práca je zameraná na štúdium včelieho proteínu vitellogenínu (Vg), ktorý zohráva kľúčovú úlohu v regulácii života a sociálneho usporiadania včely medonosnej (*Apis mellifera*). V teoretickej časti sú zhrnuté doterajšie poznatky o Vg všeobecne, ich syntéze, pôsobení a výskyte so zameraním na hmyz. Druhá časť literárnej rešerše je venovaná včelieho Vg, jeho štruktúre a špecifickým funkciám v kontexte regulácie života včiel a včelieho spoločenstva. Záver teoretickej časti obsahuje prehľad metód využívaných pre purifikáciu Vg a vitelínov. Praktická časť je zameraná na imunochemickú detekciu Vg v rôznych telových častiach zimných včiel a následne na optimalizáciu jeho purifikácie pomocou nízkotlakovej kvapalinovej chromatografie. Detekcia metódou Western blot potvrdila prítomnosť Vg v mozgu, hltanových žľazách, hlave, hrudníku, tukovom teliesku a hemolymfe zimných včiel. V rámci purifikácie boli optimalizované vhodné podmienky pre chromatografiu na anexe. Najlepšie výsledky boli dosiahnuté s využitím 10× riedenej hemolymfy zimných včiel odoberanej do malého množstva fenyltiomočoviny. Ako ekvilibračný pufoer bol zvolený 30 mmol·l<sup>-1</sup> trietanolamín/HCl (pH 8) a ako elučný pufoer 30 mmol·l<sup>-1</sup> trietanolamín/HCl s prídavkom 1 mol·l<sup>-1</sup> NaCl (pH 8). Elúcia Vg prebiehala s využitím lineárneho gradientu pri prietoku 0,8 ml·min<sup>-1</sup> medzi 40-50 minútou. Ďalší postup bol venovaný finálnemu prečisteniu získaného Vg pomocou afinitnej chromatografie na konkanavalíne A, a tiež gélovej permeačnej chromatografii pre odstránenie proteínov s podobným pI a odlišnou molekulovou hmotnosťou, avšak optimalizácia posledných dvoch typov chromatografií nebola z časových dôvodov dokončená. Získané výsledky poslúžia ako základ pre ďalší výskum Vg a jeho vlastností.

Kľúčové slová	<i>Apis mellifera</i> , vitellogenín, nízkotlaková kvapalinová chromatografia, glykoproteíny, dlhovekosť
Počet strán	89
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Eva Hrtánková
Title	Methods for detection and quantification of honey bee vitellogenin
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Silvie Dostálková, Ph.D.
The year of presentation	2024

### Abstract

This thesis focuses on the study of the bee protein vitellogenin (Vg), which plays a key role in the regulation of life and social organization of the honey bees (*Apis mellifera*). Theoretical part summarizes the current knowledge on Vg, their synthesis, biological function and occurrence in organism with a focus on insects. The second part of the theoretical part is devoted to bee Vg, its structure and specific functions. At the end of the theoretical part there is an overview of methods used for purification of Vg and vitellins. The experimental part is focused on the immunochemical detection of Vg in different body parts of winter bees and subsequently on the optimization of its purification by low-pressure liquid chromatography. Detection by Western blot confirmed the presence of Vg in the brain, hypopharyngeal glands, head, thorax, fat body and haemolymph of winter bees. Regarding to purification, appropriate conditions for chromatography on a HiTrap ANX Sepharose FF 1ml column (Cytiva, USA) were optimized. The best results were obtained using 10-fold diluted hemolymph of winter bees sampled in a solution of presence a small amount of phenylthiourea  $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  triethanolamine/HCl was chosen as the most suitable equilibration buffer and  $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  triethanolamine/HCl with the addition of  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl as the elution buffer. The elution of Vg was carried out using a linear gradient at a flow rate of  $0.8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  between 40-50 min. A further procedure was dedicated to the final purification of the obtained Vg using affinity chromatography (HiTrap Con A 4B 1 ml, Cytiva, USA), and also to the removal of proteins with similar pI and different molar mass by using gel permeation chromatography, however this optimization was not completed due to time constraints. The results obtained will serve as a basis for further research on Vg and its properties.

Keywords	<i>Apis mellifera</i> , vitellogenin, low-pressure liquid chromatography, glycoproteins, longevity
Number of pages	89
Number of appendices	0
Language	Slovak

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>2</b>
2.1 Vitellogeníny .....	2
2.2 Vitellogeníny hmyzu .....	3
2.2.1 Štruktúra .....	3
2.2.3 Regulácia tvorby vitellogenínu a vek hmyzu .....	7
2.2.3.1 Vplyv juvenilného hormónu .....	7
2.2.3.2 Vplyv ekdysteroidných hormónov .....	10
2.2.3.3 Vplyv výživy .....	11
2.3 Vitellogenín včely medonosnej .....	13
2.3.1 Regulácia tvorby včelieho Vg a ovplyvnenie dĺžky života .....	14
2.3.1.1 Vplyv juvenilného hormónu .....	14
2.3.1.2 Vplyv inzulínu podobných peptidov .....	16
2.4 Vitellogenínové receptory .....	19
2.4.1 Vitellogenínový receptor včely medonosnej .....	22
2.5 Metódy pre purifikáciu vitellogenínov a vitelínov .....	24
2.5.1 Ionexová chromatografia.....	24
2.5.2 Chromatografia na konkanavalíne A .....	26
2.5.3 Gélová permeačná chromatografia.....	27
<b>3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ</b> .....	<b>29</b>
3.1 Materiál .....	29
3.1.1 Chemikálie.....	29
3.1.2 Roztoky .....	30
3.1.3 Biologický materiál .....	32
3.1.4 Prístroje a pomôcky .....	32
3.2 Metódy.....	33
3.2.1 Spracovanie biologického materiálu .....	33
3.2.2 Homogenizácia vzoriek .....	34
3.2.3 Stanovenie koncentrácie proteínov Bradfordovou metódou .....	34
3.2.4 Nízkotlaková kvapalinová chromatografia za použitia slabého anexu .....	35
3.2.5 Nízkotlaková kvapalinová chromatografia na Konkanavalíne A.....	36
3.2.6 Gélová permeačná chromatografia.....	37
3.2.7 Zakoncentrovanie vzoriek pomocou Amicon Ultra-4 (100 kDa).....	37
3.2.8 SDS-PAGE za redukčných podmienok .....	37
3.2.9 SDS-PAGE za neredukčných podmienok .....	38
3.2.10 Western blot.....	39

3.2.10.1 Prenos proteínov na membránu .....	39
3.2.10.2 Imunochemická detekcia vitellogenínu .....	39
<b>4 VÝSLEDKY .....</b>	<b>41</b>
4.1 Stanovenie koncentrácie proteínov Bradfordovou metódou .....	41
4.2 Imunochemická detekcia vitellogenínu .....	42
4.3 Nízkotlaková kvapalinová chromatografia za použitia slabého anexu .....	45
4.3.1 Typ vzorky a zavedenie Amicon Ultra-4 (100 kDa) .....	46
4.3.2 Ekvilibračný a elučný pufor .....	50
4.3.3 Typ elúcie .....	54
4.3.4 Objem vzorky .....	57
4.4 Nízkotlaková kvapalinová chromatografia na konkanavalíne A.....	58
4.5 Gélová permeačná chromatografia.....	63
<b>5 DISKUSIA.....</b>	<b>66</b>
<b>6 ZÁVER.....</b>	<b>71</b>
<b>7 LITERATÚRA.....</b>	<b>72</b>
<b>8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK .....</b>	<b>81</b>

## **CIELE PRÁCE**

V teoretickej časti vypracovanie literárnej rešerše na tému:

- Vitellogeníny a ich produkcia v organizme so zameraním na hmyz
- Vitellogenín včely medonosnej, jeho štruktúra a podobnosť s vitellogenínmi iných organizmov
- Metódy purifikácie vitellogenínov a vitellínov

Experimentálna časť zameraná na:

- Detekciu včelieho vitellogenínu v hemolymfe a rôznych tkanivách včiel
- Zavedenie a optimalizácia chromatografických metód pre purifikáciu včelieho vitellogenínu



# 1 ÚVOD

Vitellogeníny (Vg), ako proteíny charakteristické pre vaječný žltok, zohrávajú nezastupiteľnú úlohu vo výžive dozrievajúceho embrya vajcorodých živočíchov. Sú podobné lipoproteínom stavovcov, s ktorými pravdepodobne zdieľajú spoločný pôvod. Štruktúra Vg medzi jednotlivými živočíšnymi druhmi je vysoko konzervovaná, preto sú považované za homologické proteíny vyvinuté z jedného predka.

V organizme hmyzu Vg často zohrávajú okrem výživy vajíčka niekoľko ďalších funkcií. Podieľajú sa napríklad regulácii dĺžky života, imunity, antioxidantnej ochrane, a v prípade eusociálneho hmyzu tiež na kastovom usporiadaní jedincov. Ich syntéza je ovplyvnená najmä juvenilným hormónom, ekdysteroidnými hormónmi a výživou.

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je jedným z najvýznamnejších opelovačov v prírode. Patrí do kategórie eusociálneho hmyzu, čo znamená, že jedinci žijú v spoločenstve s prísne kastovým usporiadaním. Na základe doterajších poznatkov zohráva fosfolipoglykoproteín Vg v regulácii života včiel kľúčovú úlohu. Vďaka jeho komplexnej povahe a štruktúre stále nie sú známe všetky mechanizmy, ktorými ovplyvňuje včelí organizmus. Výskyt Vg bol však detegovaný v takmer všetkých tkanivách včiel, čo potvrdzuje jeho dôležitý význam.

Nakoľko Vg včiel stále nebol kompletne charakterizovaný, pre jeho štúdium je nevyhnutné purifikovať proteínový štandard. Vhodným materiálom je hemolymfa včiel, kde je Vg jedným z najviac zastúpených proteínov. Často využívanou metódou pre purifikáciu Vg je ionexová chromatografia v kombinácii s afinitnou chromatografiou na lektíne konkanavalíne A, ktorý viaže glykoproteíny. Pre oddelenie glykoproteínov s podobným izoelektrickým bodom, ale odlišnou molekulovou hmotnosťou, ako Vg, je možné využiť gélovú permeačnú chromatografiu.

Teoretická časť diplomovej práce poskytuje všeobecný prehľad o Vg hmyzu s detailným zameraním na Vg včiel. V praktickej časti je cieľom detegovať Vg v rôznych telových častiach včiel a optimalizovať jeho purifikáciu pomocou chromatografických metód.

## 2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

### 2.1 Vitellogeníny

Vitellogeníny (Vg) sú proteíny charakteristické hlavne pre samičie pohlavie vajcorodých stavovcov a hmyzu (Hagedorn & Kunkel, 1979; Wallace, 1985). Ich názov je odvodený od pojmu vitellogenéza, ktorý označuje proces tvorby vaječného žltka. Zohrávajú dôležitú úlohu v dozrievajúcom oocyte, kde pôsobia ako prekurzory zásobných proteínov (napr. lipovitellínu a fosfovítínu) (Pan et al., 1969; Wallace, 1985). Majú štruktúru podobnú lipoproteínom stavovcov a predpokladá sa, že sa vyvinuli z jedného spoločného predka (Mann et al., 1999).

Definícia Vg vo všeobecnosti zahŕňa tieto kritériá:

- zvyčajne obsahujú 60 – 90 % proteínov rozpustných vo vaječnom žltku (Bell, 1970; Hagedorn & Judson, 1972)
- miestom syntézy nie je oocyt, ale tukové bunky (bezstavovce), alebo pečeň (stavovce) (Wahli, 1988)
- najvyššie koncentrácie sú prítomné u samíc, avšak v malom množstve boli objavené aj v samčom pohlaví (Trenczek & Engels, 1986)
- sú selektívne prijímané oocytom počas vitellogenézy (Telfer, 1960).

Vg sú vo väčšine organizmov kódované viacerými génmi, čo je pravdepodobne spôsobené duplikáciou génov počas evolúcie (Wallace, 1985). U stavovcov bola pozorovaná korelácia medzi počtom kópií génu *vitellogenínu* (*Vg*), rýchlosťou kladenia a veľkosťou vajíčok. Napr. u rýb sa vo všeobecnosti nachádza viac kópií *Vg* ako u vtákov a plazov, pretože produkujú väčšie množstvo vajíčok (Buisine et al., 2002). Porovnanie genómov cicavcov a vajcorodých stavovcov naznačuje, že *Vg* gény s evolučným prechodom živočíchov od kladenia vajíčok na laktáciu a placentárnu výživu embrya postupne stratili svoju funkciu. Avšak, zvyšky sekvencií s predčasnými stop kodónmi, inzerciami a deléciami boli objavené aj v DNA človeka či psa, čo je zaujímavé z pohľadu vývoja výživy vajíčka počas evolúcie (Brawand et al., 2008).

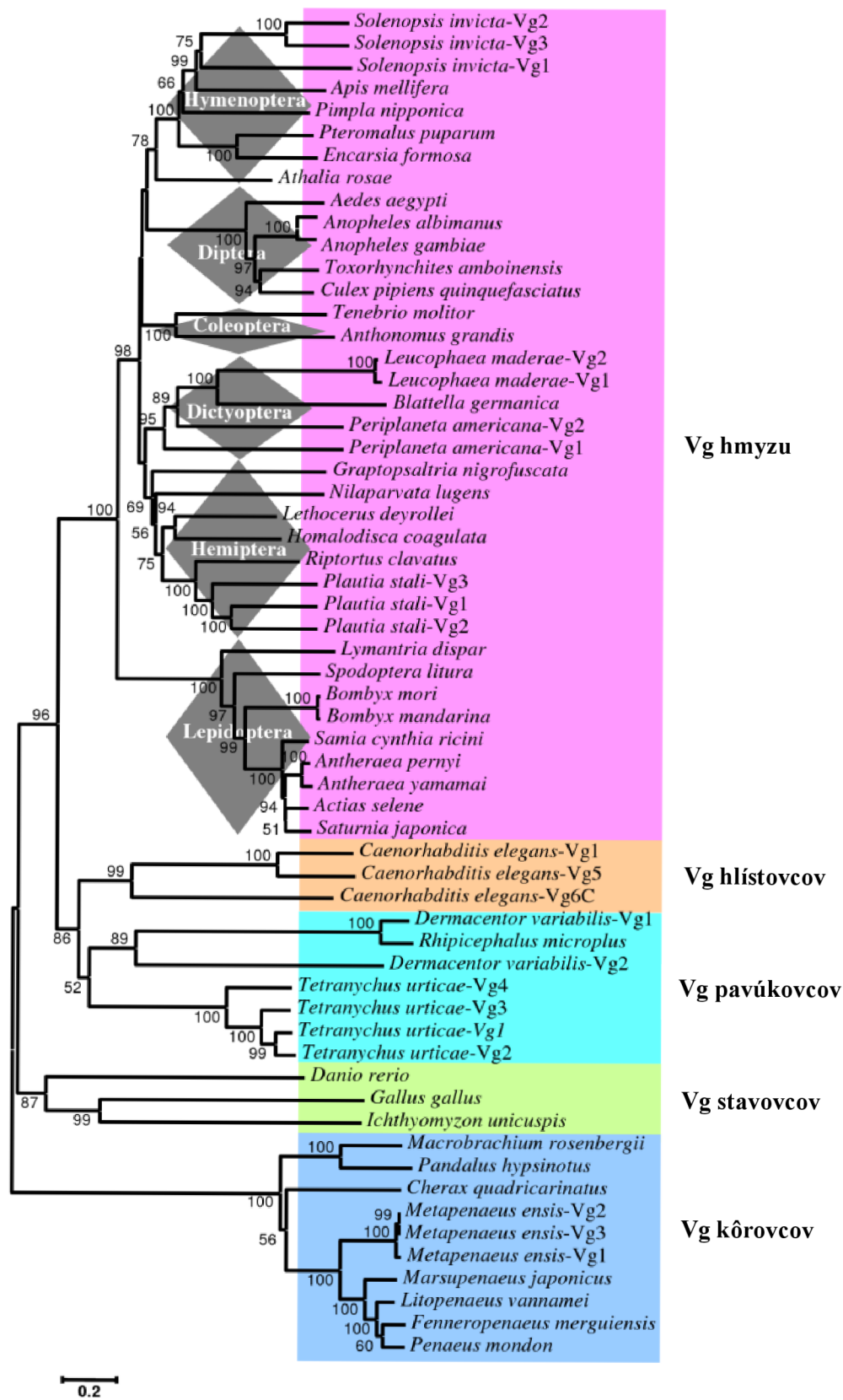
## 2.2 Vitellogenínny hmyzu

### 2.2.1 Štruktúra

Hmyzie Vg sú pomerne veľké proteíny syntetizované ako približne 200 kDa prekurzory zo 6-7 kb veľkého Vg mRNA transkriptu. Počet génov kódujúcich Vg sa líši v závislosti od druhu hmyzu. Primárny prekurzor môže podliehať proteolytickému štiepeniu na niekoľko polypeptidov prostredníctvom subtilizínových endoproteáz (EC 3.4.21.62). Štiepenie prebieha na špecifickom mieste R/K)XX(R/K (Barr, 1991; Rouillé et al., 1995), avšak toto neplatí pre zástupcov podradu *Apocrita* z radu blanokřídlcov (*Hymenoptera*), kam patrí napríklad včela medonosná (*Apis mellifera*). Štiepne miesto u včiel bolo predikované na oblasť medzi reziduami 335 a 427 v okolí polyserínovej spojky (Havukainen et al., 2012).

U väčšiny druhov hmyzu s nedokonalou premenou (*Hemimetabola*) vzniká viac polypeptidov z jedného Vg transkriptu (Tufail et al., 2005). Napríklad u švába madeirského (*Leucophaea maderae*) boli identifikované 4 polypeptidy (112, 100, 92 a 55 kDa) (Tufail & Takeda, 2002). Naopak, Vg zástupcov hmyzu s dokonalou premenou (*Holometabola*) častejšie nepodliehajú štiepeniu vôbec, alebo vznikajú iba dva polypeptidy (napr. komár tropický, *Aedes aegypti*) (Tufail et al., 2005). U včely medonosnej, ktorá patrí medzi zástupcov hmyzu s dokonalou premenou, sú známe 3 Vg polypeptidy (180, 150, 40 kDa) (Seehuus et al., 2007; Havukainen et al., 2011).

Porovnanie sekvencií Vg medzi hmyzom, hlístovcami a stavovcami v štúdiu od Chen et al. (1997) ukázalo, že štruktúra týchto proteínov je vysoko konzervovaná. Vg teda možno považovať za homologické proteíny diferencované z jedného spoločného predka (Obr. 1). Najväčšia variabilita sa nachádza v oblasti polyserínových domén hmyzu a stavovcov, ktoré nie sú homologické. Z fylogenetických rekonštrukcií vyplýva, že Vg hmyzu vykazujú najväčšiu variabilitu, a že sérový proteín cicavcov, apolipoproteín B-100, sa vyvinul z predka Vg (Chen et al., 1997).



Obr. 1: Fylogenetický strom Vg rôznych druhov živočíchov. Prevzaté a upravené podľa Tufail & Takeda (2012).

Najvýznamnejšou charakteristickou črtou hmyzích Vg je existencia polyserínovej spojky, ktorá je prítomná väčšinou na N-konci sekvencie (Tufail & Takeda, 2008). Výnimkou sú niektoré blanokrídlovce, ktorým táto doména chýba, ako napríklad lumok (*Pimpla nipponica*) (Nose et al., 1997). Vg väčšiny komárov a švábov sa odlišujú tým, že polyserínová spojka sa nachádza na C- aj N-konci (Tufail & Takeda, 2008). Polyserínová doména je medzi druhmi veľmi variabilná a jej význam pravdepodobne spočíva v tom, že pôsobí ako niekoľkonásobné fosforylačné miesto (Tufail & Takeda, 2008; Tufail et al., 2005; Havukainen et al., 2012). Zároveň vykazuje vysokú koncentráciu záporného náboja, čo by mohlo byť zodpovedné za rozpustnosť Vg, alebo chelataciu niektorých esenciálnych iónov, ako napríklad  $\text{Ca}^{2+}$  alebo  $\text{Fe}^{2+}$  (Tufail & Takeda, 2008). Ďalším významom fosforylácie by mohla byť ochrana pred štiepením Vg na fragmenty (Havukainen et al., 2012).

C-koncová časť hmyzích Vg obsahuje vysoko konzervovanú štruktúru cys reziduí, a následný GL/ICG motív. Podobná sekvencia bola rozpoznaná vo Vg stavovcov (Mouchel et al., 1996; Tufail & Takeda, 2008). Navyše, motív DGXR sa nachádza 17 – 19 reziduí pred GL/ICG takmer u všetkých hmyzích Vg (Obr. 2). GL/ICG motív a cys reziduá sú nevyhnutné pre oligomerizáciu vitellínov (Vn) stavovcov. Vn predstavujú skupinu zásobných proteínov, ktorých prekursorom je Vg, a slúžia ako zdroj aminokyselín (AMK) pre dozrievajúce embryo (Raikhel & Dhadialla, 1992; Mouchel et al., 1996; Tufail & Takeda, 2002; Tufail & Takeda, 2008).

Keďže Vg slúžia hlavne ako zásobné a transportné proteíny, viažu sa na ne esenciálne makromolekuly nevyhnutné pre výživu vajíčka. Obsah lipidov naviazaných na hmyzie Vg môže byť 6,9 – 15,7 % a líši sa v závislosti od druhu. To isté platí pre naviazané sacharidy, ktorých množstvo sa pohybuje medzi 1 % – 14 %, pričom Vg zástupcov radu *Lepidoptera* (motýle) nesú najmenej sacharidov (Engelmann, 1979).

**A**

2442	-----KIEVMTPFMTLRVYKMSHTASVEVSG-WTFGQLAGLLGTYDGEIMGNDWMTPSGS	<i>Pandalus hypsinotus</i> Vg
1496	--LN--KNTLKFSDSDVTVQFDGYNARIHLSA-LYRNQCCGLCGHYDNEKETEFYDAENQ	<i>Caenorhabditis elegans</i> Vg-6
1362	-----	<i>Danio rerio</i> Vg-1
1643	GPHDPPVVKLTNSLKTFFKLLFDGMNFFVWVNP-LYQGKTCGLCSNYDNEPYHEFVTPENW	<i>Rhipicephalus microplus</i> Vg-1
1657	--LPKKSVMVLSQPNVAFVYENQRFLLQASN-IYRNKTRGLCGNMDGEEITDLLTPNEC	<i>Rhyparobia maderae</i> Vg
1618	--HKDGLVINIEDDRIRAIYDGQRFVFTQ--DYRNSTRGICGRMSGEQRDDYLTPEG-	<i>Bombyx mori</i> Vg
1929	--YPNKDLEVSFFGGKLFATDGYRARFFSDY-SFYNNFVGLCGTNGGEYFDEFVTPDQC	<i>Aedes aegypti</i> Vg
1875	--TDNGEVQVSSSHGIAVYHDSGANFIIDADS-YHRGEVRGLCGTYSGDKYTDFTPNKC	<i>Nilaparvata lugens</i> Vg
1639	--RPDGTGLVSSKYDIDAWYDQORVQIKASG-KYRSDIRGLCGNFDGEPDNDFSPKDC	<i>Pimply nipponica</i> Vg
1615	--MGDRFIGLTSDFVSLALDGERVMLKASE-DYRYSVRGLCGNFDHDS TNDVFGPKNC	<i>Apis mellifera</i> Vg
1667	--LPNNELKVEVH-DAFYVIFDGGTVKLTAVNSKFRDASRGLCGTFDGEQETDFLAPNNC	<i>Tenebrio molitor</i> Vg

**B**

2534	VRQ---EPFMKMCFAARNACHVARAYSAMCATKGVKEVFLGC-----	<i>Pandalus hypsinotus</i> Vg
1612	TEQVAIVERQHEICFTQKPVLRCON---GKSQESKKQKVTSVYCLPSSNSWARRQMRER	<i>Caenorhabditis elegans</i> Vg-6
1362	-----	<i>Danio rerio</i> Vg-1
1783	RHE--Y-PTHHKYPPHHEPYPTAN---LQREG-----	<i>Rhipicephalus microplus</i> Vg-1
1885	VVITRVRRDTRVCFSAEPLKTCID---NSRAADTRIQQQFICLPDS-PAFEHYLKLKIK	<i>Rhyparobia maderae</i> Vg
1758	RQQVQFYENHGDICITTSRVPSCQS---HCRAGDYKIQHVQVTCCKSLDHDFRMYKEQIK	<i>Bombyx mori</i> Vg
2110	QHQQHFEQGDRIKCFSLRPLPVCHS---KCAATEKISKYFDVHC-EKDSTQAKKYKSEIG	<i>Aedes aegypti</i> Vg
2017	KLIQDVKNNGDQVCI SIRPVKCKQK---GFSPAGSSEKEVDVYVCM SHG-KNAQFWINQIF	<i>Nilaparvata lugens</i> Vg
1780	TLRTKVIIEEDQICFSLRPLPTCAE---GCTANRTKPKVMPMHCM PKN-IAAERMADRIK	<i>Pimply nipponica</i> Vg
1744	IHRTQVKETDDKICFTMRPVVSCAS---GCTAVETKSKPYKFHCMEKN-EAAMKLLKRIE	<i>Apis mellifera</i> Vg
1793	RMQTQYMEQGVNVCFTLRPLPLCKD---GCAPRATVSKQVDVYCASRSMRSVGVWVWNEIL	<i>Tenebrio molitor</i> Vg

2534	-----	<i>Pandalus hypsinotus</i> Vg
1651	REPLAQWPEHKLRNLRDQPQMEERTVRVAVDQKCDKFDY	<i>Caenorhabditis elegans</i> Vg-6
1362	-----	<i>Danio rerio</i> Vg-1
1783	-----	<i>Rhipicephalus microplus</i> Vg-1
1913	KGINPDFTR-----KKNFVQLEVKIPTKCIKSQ-	<i>Rhyparobia maderae</i> Vg
1782	KGQNPVSG-----IPSVK--QFKVPVTCQP---	<i>Bombyx mori</i> Vg
2139	RGYTPDFKS-----FAPHKTYKFNYPKSCVYKAY	<i>Aedes aegypti</i> Vg
2045	QGGYVKLEQ-----KQHNATFMKNIPQRCVRDN-	<i>Nilaparvata lugens</i> Vg
1807	QGANPDFSQ-----KSYTKKNGFDIPVGC HAA--	<i>Pimply nipponica</i> Vg
1770	KGANPDL SQ-----KPVSTTEELTVPFVCKA---	<i>Apis mellifera</i> Vg
1821	KGASPDFSE-----QTASRKRMEVPQSCMPRH-	<i>Tenebrio molitor</i> Vg

Obr. 2: Znárodnenie niektorých konzervovaných sekvencií na C-koncovnej časti Vg u zástupcov rôznych druhov živočíchov. Vytvorené v programe ClustalW, proteínové sekvencie boli prevzaté z databázy NCBI (december, 2023). Pomlčky slúžia na zarovnanie sekvencií, vo farebných rámkoch sú označené opakujúce sa motívy.

A – pre hmyz charakteristická sekvencia DG(XR) (ohraničené červenou), s výnimkou Vg *T. molitor* (Coleoptera), *N. lugens* (Hemiptera) a *R. maderae* (Dictyoptera), kde bola nájdená iba časť tohto motívu. U vyšších druhov živočíchov, z ktorých je na obrázku znázornená Vg sekvencia *R. microplus* (pavúkovce), *D. rerio* (stavovce), *C. elegans* (hlístovce), *P. hypsinotus* (kôrovce) sa objavuje iba časť tohto motívu, alebo úplne chýba (*D. rerio*, *P. hypsinotus*). Neďaleko DG(XR) je konzervovaná sekvencia GLCG alebo GICG (ohraničené zelenou), ktorá bola s malými zmenami objavená na rovnakom mieste aj u vyšších druhov živočíchov (okrem *D. rerio*).

B – cys reziduá na C-konci Vg (ohraničené modrou) charakteristické pre väčšinu živočíchov.

### 2.2.3 Regulácia tvorby vitellogenínu a vek hmyzu

Tvorba Vg u hmyzu je vo väčšine prípadov riadená najmä juvenilným hormónom (JH) a ekdyteroidnými hormónmi (EH) (hlavne 20-hydroxyekdyson). JH zohráva kľúčovú úlohu v tvorbe Vg napríklad u kobyliiek (Wyatt et al., 1987), alebo švábov (Engelmann, 1984), EH vplývajú na vitellogenézu hlavne u komárov (Racioppi et al., 1986) a múch (Adams & Filipi, 1988).

JH je gonádotropný, seskviterpenoidný hormón tvorený v endokrínnej žľaze *corpora allata* umiestnenej v blízkosti mozgu (Williams, 1959; Röller et al., 1967). V štádiu pred dosiahnutím dospelosti zabraňuje predčasnej metamorfóze, pričom táto funkcia je konzervovaná vo väčšine známych prípadov. U dospelých samičiek JH ovplyvňuje vitellogenézu a reprodukciu. Pre eusociálny hmyz, kde jedinci žijú v mnohopočetných kolóniách s prísne kastovým usporiadaním, je JH v kombinácii s Vg dôležitým regulátorom dĺžky života (Hartfelder, 2000).

Ekdyteroidné hormóny tvoria skupinu steroidných hormónov, ktorých tvorba je stimulovaná protorakotropným hormónom. U hmyzu sa podieľajú najmä na regulácii zvliekania, metamorfózy, rozmnožovania a embryonálneho vývoja (Dinan, 2003).

#### 2.2.3.1 Vplyv juvenilného hormónu

Regulácia syntézy Vg prostredníctvom JH závisí na prítomnosti transkripčného faktora Met (z angl. methoprene-tolerant) a proteínu Taiman (Tai; niekde uvádzaného aj ako FISC, alebo SRC). Met bol identifikovaný ako receptor JH, ktorý sa viaže na JH s pomerne vysokou afinitou. Na Met nasadá Tai, ktorý predstavuje homológ so steroidným receptorovým koaktivátorom cicavcov. Receptorový komplex JH-Met/Tai následne aktivuje transkripciu cieľových génov (Jindra et al., 2013). V tukovom teliesku dospelého hmyzu je tento komplex nevyhnutný pre spustenie syntézy Vg a následnú vitellogenézu, čo bolo potvrdené u rôznych druhov hmyzu, ako napríklad kobylika sťahovavá (*Locusta migratoria*) (Guo et al., 2014; Wang et al., 2017), potemník hnedý (*Tribolium castaneum*) (Charles et al., 2011), komár tropický (*A. aegypti*) (Li et al., 2011), alebo orientálna ovocná muška (*Bactrocera dorsalis*) (Yue et al., 2018).

Pre štúdium mechanizmu pôsobenia JH na syntézu Vg bola použitá, ako modelový organizmus, kobylika sťahovavá. Princíp regulácie spočíva v tom, že JH-Met/Tai receptorový komplex aktivuje transkripciu génov *Mcm4*, *Mcm7* (z angl. mitochromosome maintenance; helikázy, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu pri replikácii DNA), *Cdc6* (z angl. cell division cycle 6; proteín nevyhnutný pre tvorbu prereplikačného komplexu), *Cdk6*

(z angl. cyclin dependent kinase; proteín regulujúci expresiu génov súvisiacich s bunkovým cyklom) a *E2f1* (z angl. E2 factor-1; transkripčný faktor nevyhnutný pre reguláciu bunkového cyklu). JH tiež indukuje defosforyláciu transkripčného faktora FoxO (z angl. forkhead box O transcription factor), ktorý následne spúšťa transkripciu génov *Cdc2* a *Orc5* (z angl. origin recognition complex), rovnako zodpovedných za reguláciu bunkového cyklu (Obr. 3). Umlčanie týchto génov u samičky kobyľky viedlo k výraznému zníženiu polyploidie tukového telieska, a tým aj poklesu expresie *Vg*, zastaveniu dozrievania oocytov a zhoršenej produkcii vajíčok. Polyploidia tukového telieska znamená, že dochádza k tvorbe tukových buniek s viac ako dvoma kópiami genómu. To sa deje prostredníctvom špecifického typu bunkového cyklu pozostávajúceho z po sebe nasledujúcich G a S fáz bez mitózy, najčastejšie vo výrazne metabolicky aktívnych tkanivách (Guo et al., 2014; Wu et al., 2016; Wu et al., 2018; Wu et al. 2020).

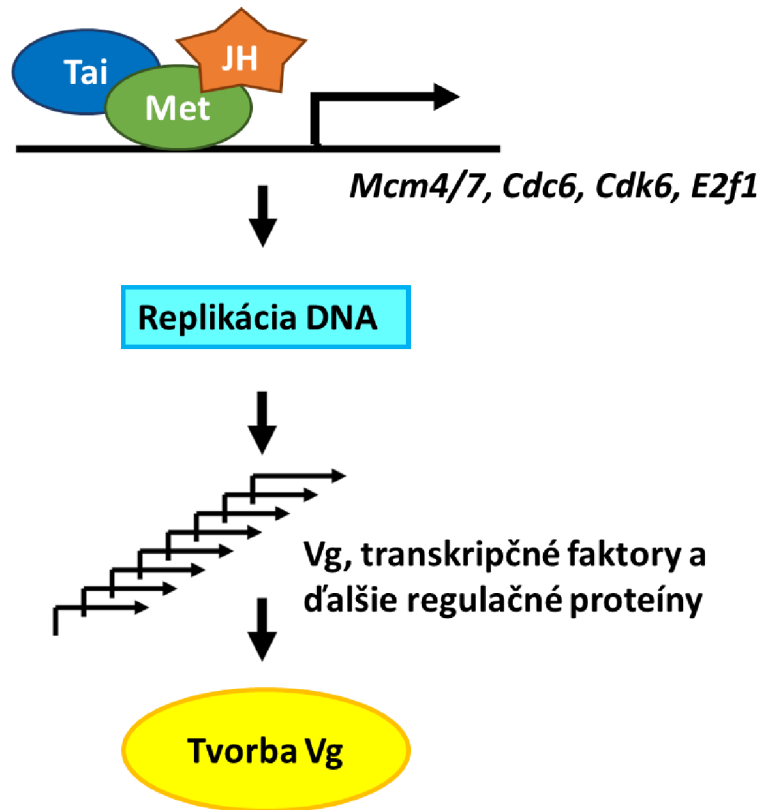
V prípade niektorých druhov eusociálneho hmyzu z rodu blanokřídlavcov však bolo dokázané, že JH pôsobí ako negatívny regulátor syntézy *Vg*. Takýto mechanizmus regulácie bol pozorovaný napríklad u mravcov (Azevedo et al., 2015; Zhang et al., 2021), a včiel (Fluri et al., 1982).

Rozdiel v dĺžke života matiek v kolóniách eusociálneho hmyzu oproti ostatným jedíncom spoločenstva je natoľko pozoruhodný, že sa stal predmetom výskumu mnohých vedeckých prác. Vo väčšine prípadov v živočíšnej ríši platí, že daňou za schopnosť energeticky náročnej reprodukcie je skoršia úmrtnosť (Reznick, 1985). U hmyzu je tento kompromis sprostredkovaný, okrem iného, tiež juvenilným hormónom, ktorý stimuluje expresiu *Vg*, ako hlavného proteínu vaječného žltka, a zároveň pôsobí imunosupresívne (Rantala et al., 2003; Franssens et al., 2006; Li et al., 2011; Yue et al., 2018). Výnimkou sú práve matky druhov eusociálneho hmyzu, ktoré vykazujú vysokú schopnosť reprodukcie v kombinácii s najdlhšou životnosťou v danom spoločenstve. Predpokladá sa, že tento zaujímavý obrat je spôsobený tým, že JH stratil svoju gonádotrofnú funkciu (tzn. ako stimulant reprodukcie), ale imunosupresívna úloha ostala zachovaná (Fluri et al., 1982; Corona et al., 2007; Pamminer et al., 2016).

Matky druhu mravca obyčajného (*Lasius niger*) sa môžu dožiť až 28 rokov. Bolo dokázané, že umelé podanie JH znižuje mieru kladenia vajíčok mravčích matiek, čo naznačuje, že JH nielen stratil, ale obrátil svoju funkciu v reprodukcii. Taktiež bola zaznamenaná horšia odolnosť voči patogénom. Vplyv na samotnú expresiu *Vg* však JH v tomto prípade nevykazoval (Pamminer et al., 2016).



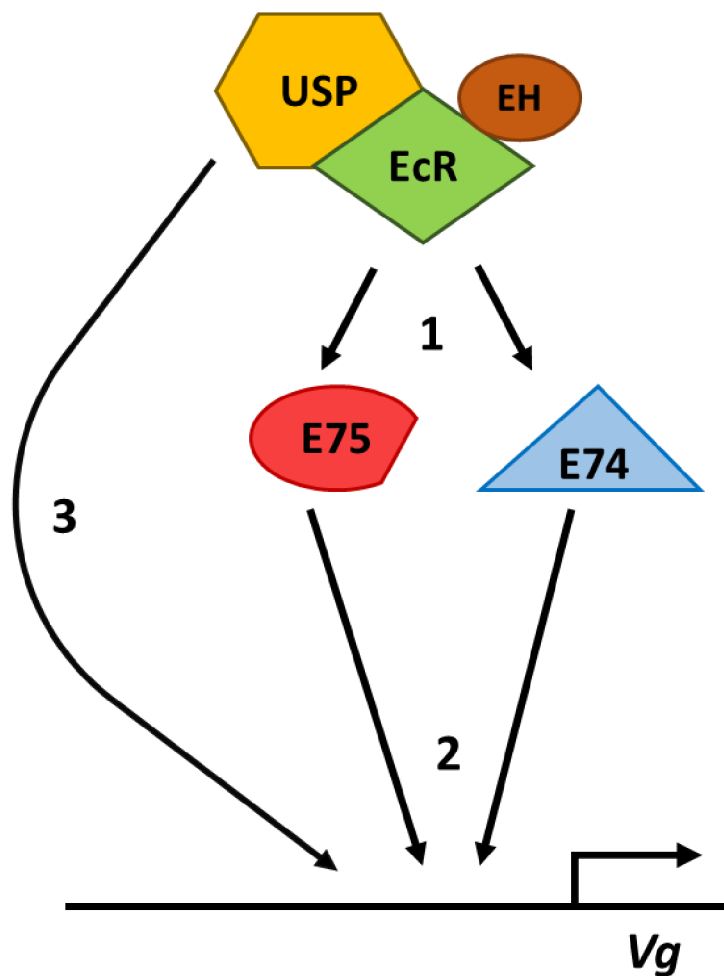
Podobný mechanizmus, kedy JH zmenil svoju funkciu a pôsobí ako negatívny regulátor dĺžky života, sa prejavuje aj u včiel. V tomto prípade zároveň negatívne reguluje aj tvorbu Vg (Fluri et al., 1982; Amdam & Omholt, 2003; Corona et al., 2007). Vplyv JH na syntézu včelieho Vg bude rozobraný v ďalších kapitolách.



Obr. 3: Predpokladaný mechanizmus pozitívnej regulácie tvorby Vg prostredníctvom JH u kobyľky sťahovavej. Komplex transkripčných faktorov Tai a Met po aktivácii JH spúšťa transkripciu helikáz *Mcm 4/7* a génov *Cdc6*, *Cdk6* a *E2f*. Tie následne regulujú replikáciu DNA, bunkový cyklus, a tým nepriamo aj transkripciu *Vg* (prevzaté a upravené podľa Guo et al., 2014; Wu et al. 2016; Wu et al. 2018).

### 2.2.3.2 Vplyv ekdysteroidných hormónov

EH sú zodpovedné za tvorbu *Vg* napríklad u komára tropického (Hansen et al., 2004), či endoparazitickej osy *Pteromalus puparum* (Dong et al., 2009). Receptor pre EH je heterodimér zložený z dvoch jadrových receptorov: EcR (ekdysonový receptor) a USP (z angl. ultraspiracle protein). Predpokladá sa, že gén *Vg* obsahuje väzbové miesto pre tento komplex aktivovaný EH. Zároveň komplex EcR/USP aktivuje transkripciu tzv. skorých génov (napr. *E74* a *E75*), ktoré sa následne rovnako, ako jadrový receptorový komplex, viažu na *Vg* sekvenciu a aktivujú jeho transkripciu (Obr. 4) (Raikhel et al., 2002).



Obr. 4: Priama a nepriama regulácia tvorby *Vg* u komára tropického riadená EH. EH aktivuje jadrový komplex USP/EcR, ktorý následne spúšťa transkripciu génov *E74* a *E75* (1). Tie pôsobia ako transkripčné faktory pre *Vg* (2). Zároveň sa aj samotný komplex USP/EcR-EH viaže na *Vg* sekvenciu (3), a spúšťa tak prepis génu priamo (prevzaté a upravené podľa Raikhel et al., 2002).

### 2.2.3.3 Vplyv výživy

Tvorba prekursorov proteínov vaječného žltka je u mnohých druhov hmyzu podmienená dostatočným príjmom živín. Signálna dráha serín/treonínovej kinázy TOR (z angl. target of rapamycin) zohráva kľúčovú úlohu pri regulácii rastu buniek a metabolizmu. Kaskáda je regulovaná príjmom živín. Pokiaľ je v potrave dostatok aminokyselín, dochádza k aktivácii TOR a proteosyntéze (Raught et al., 2001; Jacinto & Hall, 2003).

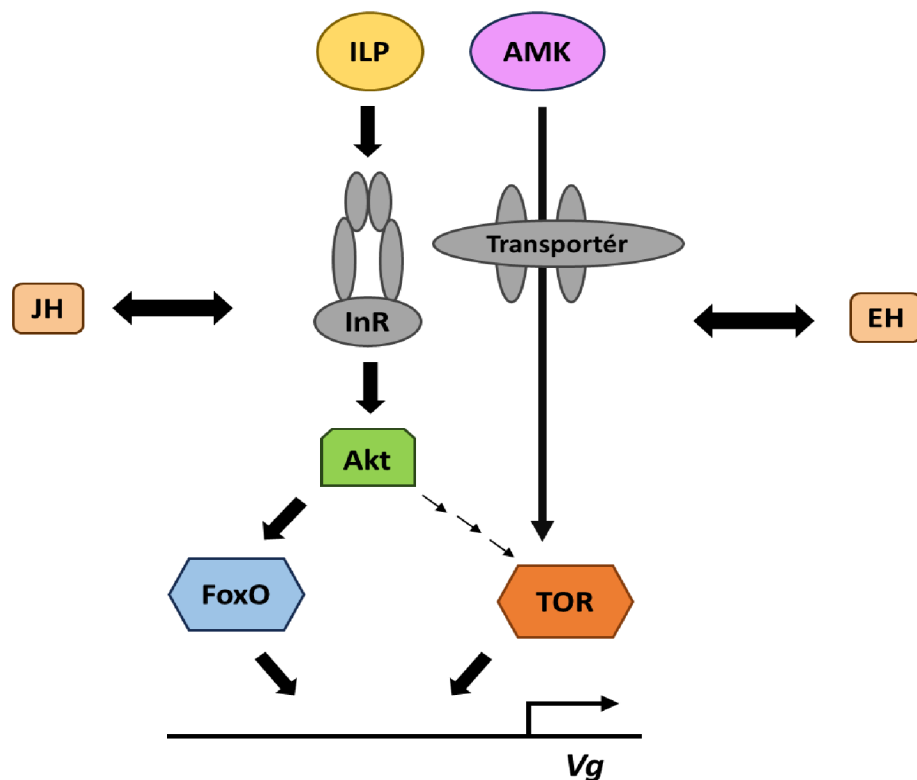
Druhou dôležitou signálnou dráhou, ktorá reguluje metabolizmus a je závislá na obsahu nutrientov v hemolymfe (HL) hmyzu, je dráha inzulínu podobných peptidov (IIS, z angl. insulin/insulin-like growth peptide signaling). Inzulínu podobné peptidy (ILP, z angl. insulin like peptides) sú exprimované najmä v mozgu a pôsobia ako neurotransmitery, rastové faktory, regulátory metabolizmu a reprodukcie. Vstup do cieľových tkanív je sprostredkovaný pomocou receptora InR (z angl. insulin-like receptor) (Wu & Brown, 2006; Badisco et al., 2013). Expresia ILP bola zaznamenaná aj v periférnych tkanivách, napr. u koníka krdľového (*Schistocerca gregaria*) (Badisco et al., 2008). ILP pôsobia prostredníctvom regulácie fosforylácie transkripčného faktora FoxO, ktorý v defosforylovanom stave prestupuje do jadra a pôsobí ako represor syntézy *Vg*. Po aktivácii IIS dochádza k aktivácii kinázy Akt (synonymum pre proteínkinázu B), ktorá fosforyluje FoxO, a tým dochádza k spusteniu transkripcie *Vg* (Sheng et al., 2011).

Dráhy IIS a TOR sú prepojené prostredníctvom regulačných proteínov (Obr. 5). Dokopy tak na základe nutričného stavu organizmu ovplyvňujú metabolické procesy spojené so zvýšenými nárokmi na spotrebu energie, ako je napríklad rast alebo reprodukcia (Wu & Brown, 2006; Badisco et al., 2013). TOR môže byť podobne, ako transkripčný faktor FoxO, regulovaný kinázou Akt. Na rozdiel od FoxO však k aktivácii TOR prostredníctvom Akt nedochádza priamo, ale cez kaskádu ovplyvnenia fosforylácie niekoľkých ďalších proteínových substrátov. U komára tropického bolo zistené, že aktivovaný TOR v jadre reguluje funkciu transkripčných faktorov GATA, ktoré ovplyvňujú expresiu *Vg* (Park et al., 2006; Badisco et al., 2013)

IIS/TOR signalizácia vplýva na syntézu *Vg* priamo (opísané vyššie), alebo nepriamo prostredníctvom regulácie tvorby EH a JH. Hansen et al. (2004) dokázali, že pri nedostatočnom príjme AMK u komára tropického dochádza k poklesu hladiny EH a s tým spojenej zníženej tvorby *Vg*. Podobný mechanizmus bol potvrdený aj u rusa domového (*Blattella germanica*), kde inhibícia dráhy IIS viedla k výraznému poklesu

tvorby JH a následne zníženej expsie *Vg* (Abrisqueta et al., 2014). U chrobáka potemníka hnedého dráhy IIS a TOR priamo vplyvajú na reguláciu expsie *Vg*, ale ovplyvňujú aj tvorbu JH a priebeh vitellogenézy (Parthasarathy & Palli, 2011).

Dráha inzulínu podobných peptidov je podobne, ako JH, významným regulátorom dĺžky života hmyzu. Mechanizmus bol študovaný napríklad u drozofily obyčajnej (*Drosophila melanogaster*), kde sa ukázalo, že inhibícia IIS je spojená s dlhším životom mušiek, zvýšenej rezistencií voči oxidačnému stresu a hladovaniu (Tatar et al., 2001; Broughton et al., 2005). Zároveň k predĺženiu života drozofil významne prispieva konzumácia potravy bohatej na sacharidy a chudobnej na proteíny (Min & Tatar, 2006). U včiel bol pozorovaný opačný efekt, kedy je zvýšený prísun sacharidov spojený s kratšou dĺžkou života (Corona et al., 2007). Tento jav bude bližšie rozobraný v nasledujúcich kapitolách.

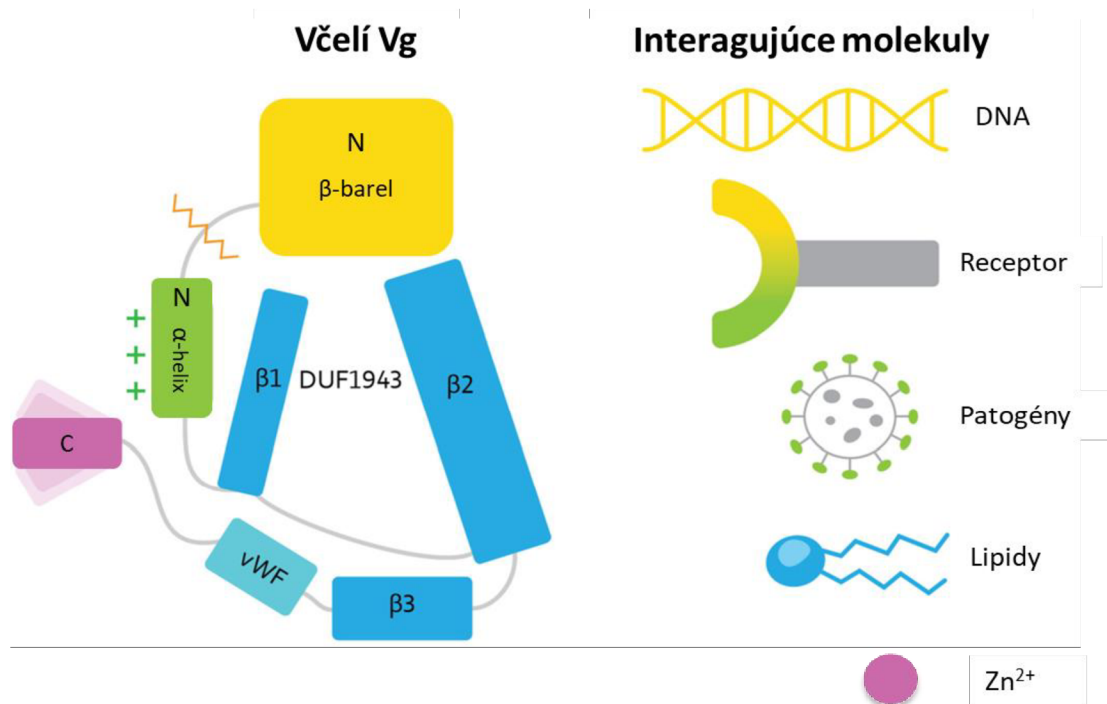


Obr 5.: Tvorba *Vg* riadená príjmom živín. Inzulínu podobné peptidy tvorené v mozgu sprostredkujú IIS signalizáciu, ktorá závisí najmä na príjme sacharidov. ILP sa v cieľových tkanivách viaže na receptor a dochádza k aktivácii kinázy Akt, ktorá fosforyluje transkripčný faktor FoxO. Nefosforylovaný FoxO pôsobí ako represor syntézy *Vg* a po fosforylácii sa ruší jeho inhibičný účinok. Funkcia kinázy TOR je aktivovaná pri zvýšenom príjme aminokyselín a nepriamo tiež prostredníctvom dráhy IIS, konkrétne kinázy Akt. TOR po aktivácii prestupuje do jadra a aktivuje transkripčné faktory zodpovedné za syntézu *Vg*. Kaskády IIS a TOR sú u niektorých živočíchov nepriamo ovplyvnené aj JH a EH. Prevzaté a upravené podľa Badisco et al. (2013), Parthasarathy & Palli (2011), Sheng et al. (2011), Wu et al. (2021).

### 2.3 Vitellogenín včely medonosnej

Včelí Vg (Q868N5; UniProt KB 18.4. 2024) je fosfolipoglykoproteín o veľkosti 180 kDa (Wheeler & Kawooya, 1990), ktorý môže byť štiepený na dva menšie fragmenty (150 kDa alebo 40 kDa). Väčší fragment prislúcha C-koncovej doméne Vg, menší je naopak tvorený N-koncovou doménou (Seehuus et al., 2007; Havukainen et al., 2011). Izoelektrický bod včelieho Vg je približne 6,3 (Expasy, 8.4. 2024).

Predikovaná štruktúra včelieho Vg (Obr. 6) je na N-konci tvorená  $\alpha$ -helixami a  $\beta$ -barelom, ktoré sú oddelené polyserínovou spojkou (Havukainen et al., 2011). N-koniec obklopuje veľkú hydrofóbnu dutinu, kde dochádza k väzbe lipidov. Táto dutina je tvorená  $\beta$ -listami a doménou DUF1943 s doposiaľ nejasnou funkciou. Nasleduje doména von Willebrandovho faktora typu D (vWFD), za ktorou sa nachádza C-koniec spojený s vWFD pravdepodobne prostredníctvom flexibilnej spojky (Leipart et al., 2022b).



Obr. 6: Ilustračné znázornenie štruktúry včelieho Vg a molekúl, ktoré s ním reagujú. N-koncová doména je tvorená  $\beta$ -barelovou (žltá) a  $\alpha$ -helikálnou (zelená) časťou, ktorá má na povrchu vysokú koncentráciu kladného náboja. Medzi nimi, v okolí polyserínovej spojky, sa nachádza štiepne miesto (oranžová vlnovka). Hydrofóbna dutina pre väzbu lipidov je tvorená tromi  $\beta$ -listami (modrá), medzi ktorými sa nachádza doména DUF1943. Doména vWFD je znázornená bledomodrou a C-koniec fialovou. Farby interagujúcich molekúl korešpondujú s farbou miesta, na ktoré sa v štruktúre včelieho Vg viažu. Predikovaná väzba  $Zn^{2+}$  na C-konci pravdepodobne súvisí s antioxidačnou ochranou (prevzaté a upravené podľa Leipart et al., 2022a).

Včelí Vg je prevažne monomér, avšak ukazuje sa, že pravdepodobne dochádza aj k tvorbe homodiméru. Vo svojej štruktúre obsahuje dve hydrofóbne, negatívne nabité dutiny, z ktorých jedna je menšia, a druhá väčšia. Menšia je viac konzervovaná a mohla by slúžiť ako väzobné miesto pre receptor Vg. Väčšia je považovaná za väzobné miesto pre rôzne lipidy (Havukainen et al., 2011; Leipart et al., 2022a).

Štruktúra Vg medzi včelami z rôznych regiónov nie je definitívne rovnaká. Doteraz bolo nájdených viac ako 100 nesynonymných jednonukleotidových polymorfizmov (dochádza k ovplyvneniu AMK sekvencie) najmä v oblastiach zodpovedných za väzbu nutrientov a patogénov. Predpokladanou príčinou tohto javu je adaptácia včiel na rôzne podmienky prostredia (Leipart et al., 2022a).

Expresia včelieho Vg prebieha najmä v tukovom teliesku, ktoré pozostáva z dvoch typov buniek – oenocytov a trofocytov, pričom syntéza Vg prebieha výhradne v trofocytoch. U matiek a krmíčiek je Vg exprimovaný tiež v tukových bunkách prítomných v hlave a zadočku (Corona et al., 2007). Ďalej bola tvorba zaznamenaná vo vaječníkoch matky a robotníc (Guidugli et al., 2005; Cardoso-Júnior et al., 2021) a v strednom čreve robotníc (Harwood & Amdam, 2021). Jeho prítomnosť bola detegovaná ešte v hltanových žľazách robotníc (Amdam et al., 2003; Seehuus et al., 2007), mozgu krmíčiek (Münch et al., 2015), či imunitných bunkách (Hystad et al., 2017).

Okrem výživy embrya má včelí Vg niekoľko ďalších významných funkcií. Podieľa sa na rozdelení včiel do kást (Nelson et al., 2007), antioxidačnej ochrane (Havukainen et al., 2013), imunitě (Amdam et al., 2004; Salmela et al., 2015), či dĺžke života (Corona et al., 2007; Havukainen et al., 2013). Ukazuje sa tiež, že Vg pravdepodobne reguluje transkripciu génov v mozgu zodpovedných za ovplyvnenie správania a fyziológiu včiel. Mechanizmus ešte nie je objasnený, no predpokladom je, že Vg pôsobí na mozog prostredníctvom signálnych dráh, ktoré majú pôvod v periférnych tkanivách (Wheeler et al., 2013). Najnovšie zistená funkcia bola popísaná v štúdií od Salmela et al. (2022), z ktorej vyplýva, že 40 kDa fragment by mohol slúžiť ako transkripčný faktor, pretože je translokovaný do jadra trofocytov.

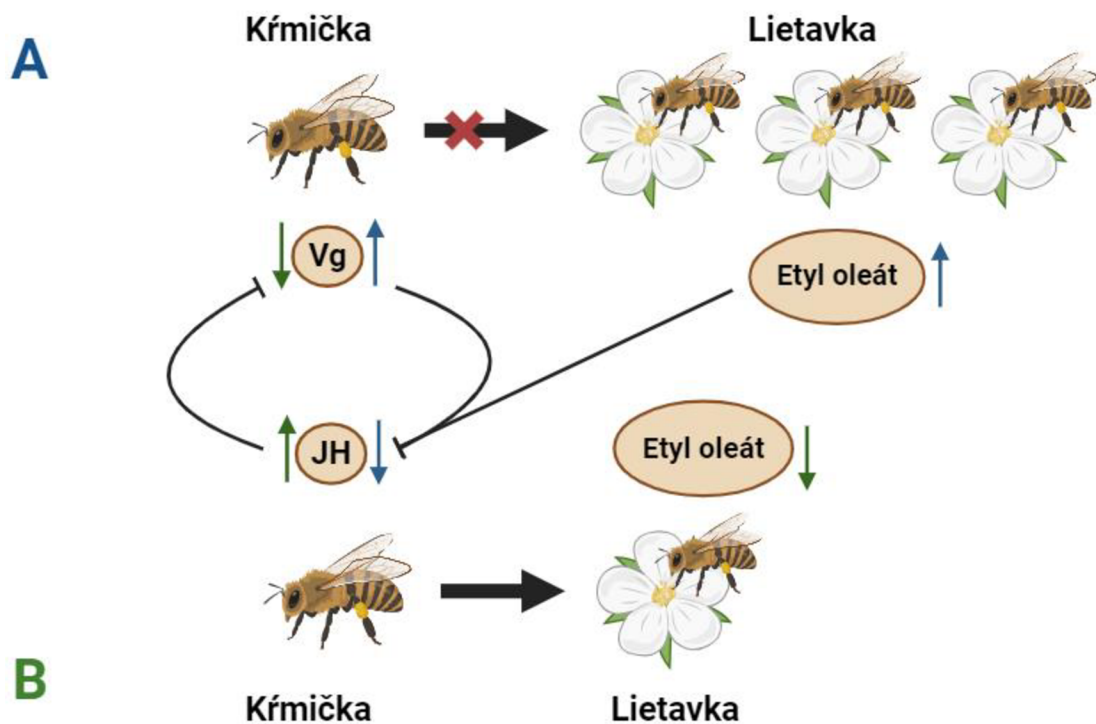
### **2.3.1 Regulácia tvorby včelieho Vg a ovplyvnenie dĺžky života**

#### **2.3.1.1 Vplyv juvenilného hormónu**

Expresia včelieho Vg je regulovaná najmä JH. Na rozdiel od väčšiny druhov hmyzu však u včiel Vg a JH inhibujú tvorbu jeden druhého. Tento mechanizmus je pre včely charakteristický, a naznačili ho už v štúdií od Fluri et al. (1982), kde zistili,

že koncentrácie JH a Vg sa líšia vždy nepriamo úmerne v rámci rôzneho veku včelích robotníc.

Amdam & Omholt (2003) neskôr predstavili tzv. teóriu modelu dvoch represorov (Obr. 7), ktorá popisuje, ako vzájomné ovplyvňovanie tvorby JH a Vg priamo súvisí so správaním včiel. U mladých robotníc, ktorých úlohou je najskôr čistiť bunky v úli a neskôr starať sa o plod, je prítomná vysoká hladina Vg v kombinácii s nízkou koncentráciou JH. Klesajúca expresia Vg priamo súvisí s prechodom robotnice do štádia tzv. lietavky, ktorá opúšťa úl a zbiera potravu. Transformácia správania včely zo starania sa o úl na hľadanie potravy je spojená s množstvom fyziologických zmien regulovaných najmä prostredníctvom Vg a JH. Princípom modelu dvoch represorov teda je, že prechod včelej robotnice do staršieho fenotypu (lietavka) je pod kontrolou tzv. vnútorného a vonkajšieho represora centrálného nervového systému a výsledkom je ovplyvnenie syntézy JH. Ako vnútorný represor pôsobí Vg. Vonkajším represorom je feromón etyl oleát, ktorý odovzdávajú staršie včely mladým včelám fyzickým kontaktom (Leoncini et al., 2004). Dostatok lietaviek a nimi produkovaný hormón tak v mladších včelách vyvoláva fyziologickú odpoveď, ktorá vedie k zotrvaní v štádiu mladšieho fenotypu. Nedostatok vonkajšieho represora vedie k iniciácii tvorby JH, čím je inhibovaná tvorba Vg. Vyčerpanie zásob Vg ďalej spúšťa pozitívnu spätnú väzbu, ktorá neustále aktivuje centrálny nervový systém a udržiava včelu v štádiu podnecujúcom zbieranie potravy (Amdam & Omholt, 2003).



Obr. 7: Grafické znázornenie modelu dvoch represorov. Prechod včely zo štádia křmičky (mladší fenotyp) do štádia lietavky (starší fenotyp) je na základe teórie od Amdam & Omholt (2003) závislý na prítomnosti vnútorného represora (Vg) a vonkajšieho represora produkovaného lietavkami (feromón etyl oleát).

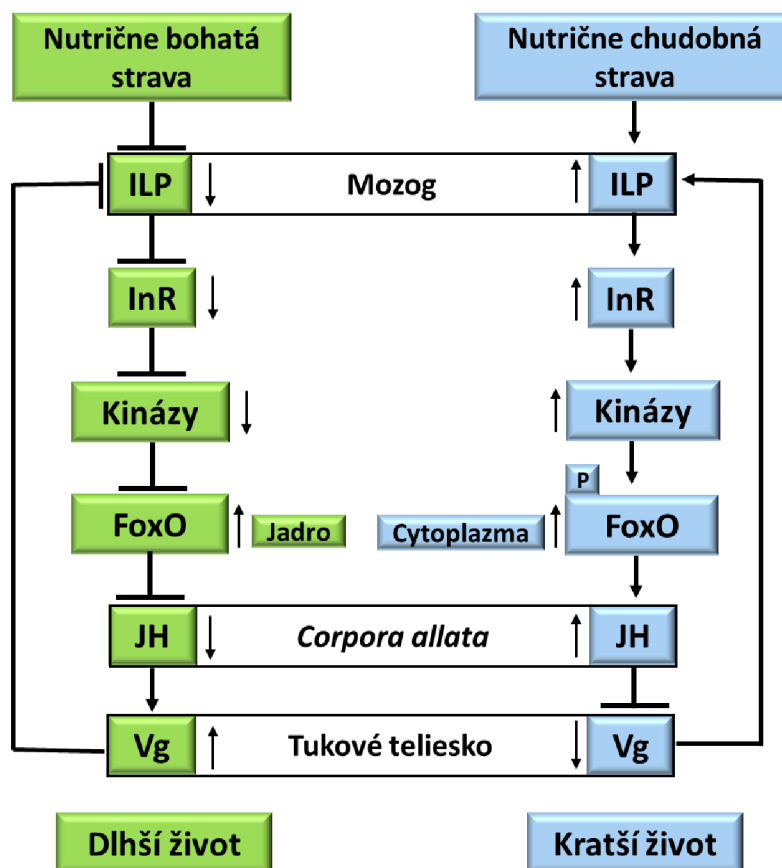
A – Zvýšená koncentrácia represorov negatívne ovplyvňuje syntézu JH a s tým súvisiaci prechod robotnice do štádia lietavky (modré šípky).

B – Pri poklese hladiny Vg a etyl oleátu dochádza k tvorbe JH, ktorý podnecuje správanie súvisiace so zberom potravy (zelené šípky). Vytvorené pomocou programu Biorender.

### 2.3.1.2 Vplyv inzulínu podobných peptidov

U včiel Corona et al. (2007) navrhli model, akým by dráha IIS závislá na dostupnosti živín mohla ovplyvňovať ich dĺžku života (Obr. 8). Teoreticky, čím má včela nižší prísun energie, tým sa dožíva nižšieho veku. Potrava bohatá na sacharidy a chudobná na proteíny spúšťa IIS dráhu a ILP sa viažu na receptor InR. To vedie k fosforylácii transkripčného faktora FoxO v cytoplazme, ktorý neinhibuje tvorbu JH. JH však následne blokuje expresiu Vg a nízka hladina Vg ešte viac prispieva k aktivácii IIS. V prípade vysokého prísunu živín dochádza k inhibícii IIS. Nefosforylovaný FoxO prechádza do jadra a inhibuje tvorbu JH, čo vedie k zvýšenej syntéze Vg a zároveň inhibícii dráhy IIS (Corona et al. 2007).





Obr. 8: Teoretický model, ako obsah nutričov ovplyvňuje dĺžku života včiel. Vyšší príjem živín (zelená) vedie k inhibícii signalizácie pomocou ILP. Nedochádza k fosforylácii transkripčného faktora FoxO, ktorý potom prechádza do jadra a inhibuje tvorbu JH. Nízka koncentrácia JH vedie k zvýšenej expresii *Vg* v tukovom teliesku, čo súvisí s dlhším životom včiel. Vysoká koncentrácia *Vg* zároveň v negatívnej spätnej väzbe ovplyvňuje syntézu ILP. Naopak, potrava chudobnejšia na živiny (modrá) vedie k stimulácii tvorby ILP, čo následne pozitívne ovplyvňuje fosforyláciu FoxO. Fosforylovaný FoxO neprestupuje do jadra a tvorba JH tak nie je ovplyvnená. Zvýšená koncentrácia JH inhibuje expresiu *Vg*, a to vedie k zníženiu dĺžky života. Prevzaté a upravené podľa Corona et al. (2007).

V organizme včiel boli detegované dva inzulínu podobné peptidy – ILP1 a ILP2 (Wheeler et al., 2006), ktoré môžu byť exprimované v nervovom alebo periférnom tkanive robotníč (Corona et al., 2007; Ament et al., 2008). Presný mechanizmus ich pôsobenia je však stále pomerne nejasný.

Ukazuje sa, že expresia *ILP1* v mozgu lietaviek narastá s koncentráciou JH, avšak tiež súvisí s dĺžkou života matiek (Corona et al., 2007). Lietavky majú spravidla nižší prísun nutričov v potrave, pretože konzumujú najmä nektár bohatý na sacharidy. Naopak, mladé včely prijímajú oveľa väčšie množstvo proteínov z peľu, čo pozitívne vplyva aj na syntézu *Vg* (Amdam et al., 2006; Nelson et al., 2007; Ament et al., 2008). Avšak,

expresia *IPLI* môže počas štádia lietavky opäť klesnúť bez ovplyvnenia jej správania, preto je spojitosť so správaním stále nejednoznačná (Corona et al., 2007; Ament et al., 2008). V periférnom tkanive bola zaznamenaná expresia *ILP1* iba v tukových bunkách oenocytoch, kde sa predpokladá, že zohráva úlohu pri metabolizme lipidov. Na rozdiel od mozgu, periférne exprimovaný *ILP1* súvisí s vyššou hladinou Vg a tento proces je závislý na obsahu nutričov prijatých v potrave (Ament et al., 2008; Ament et al., 2011; Nilsen et al., 2011; Ihle et al., 2014).

Expresia *ILP2* bola zaznamenaná v oboch typoch tukových buniek – trofocytoch aj oenocytoch (Nilsen et al., 2011). Podľa doterajších štúdií hladina tohto inzulínu podobného peptidu nezávisí na zložení potravy včely (Ament et al., 2011; Nilsen et al., 2011; Ihle et al., 2014). Predpokladá sa, že *ILP2* u včiel funguje ako pozitívny indikátor stavu živín a zahŕňa signalizáciu hladiny bielkovín aj tukových zásob. V mozgu by signál o vysokom nutričnom stave mohol inhibovať IIS dráhu a následne tak syntézu JH. So zvyšujúcim sa vekom robotníc klesá expresia *ILP2* v tukovom teliesku a expresia *ILP1* v mozgu sa zvyšuje. *ILP1* potom aktivuje IIS signalizáciu a syntézu JH, čo vedie tiež k mobilizácii a poklesu energetických zásob z tukového telieska (Ament et al., 2008; Nilsen et al., 2011).

Vo všeobecnosti je podľa doterajších poznatkov expresia receptorov *InR* v mozgu robotníc pomerne konštantná, na rozdiel od tukových buniek, kde sa mení v závislosti na fenotype. U lietaviek bola zaznamenaná vyššia expresia *InR1* a *InR2* ako u krmíčiek, z čoho vyplýva, že lietavky sú pravdepodobne citlivejšie na reguláciu prostredníctvom *ILP* (Ament et al., 2008; Nilsen et al., 2011). Napriek tomu, že inhibícia IIS dráhy neovplyvňuje dĺžku života včiel, umlčanie expresie *InR* vedie k poklesu dĺžky života (Ihle et al., 2019).

## 2.4 Vitellogenínové receptory

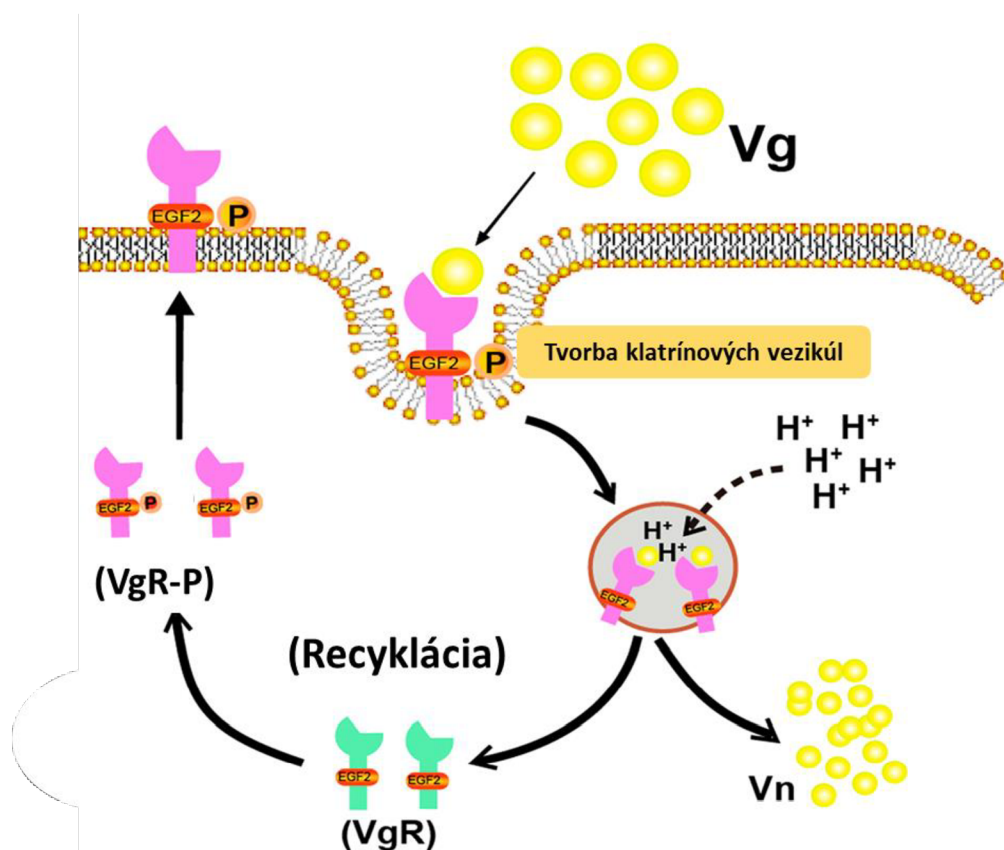
Transport Vg do buniek prebieha prostredníctvom endocytózy sprostredkovanej špecifickým vitellogenínovými receptormi (VgR) (Dhadialla et al., 1992). Ich sekvencia bola popísaná napríklad u komára tropického (Sappington et al., 1996), červeného mravca ohnivého (*Solenopsis invicta*) (Chen et al., 2004), rusa domového (Ciudad et al., 2006), alebo švába madeirského (Tufail & Takeda, 2007), pričom vo všetkých štúdiách bol výskyt VgR detegovaný predovšetkým vo vaječníkoch.

VgR patria do rodiny lipoproteínových receptorov s nízkou hustotou (LDLR). U hmyzu sa jedná o 180-214 kDa veľké proteíny, na rozdiel od VgR stavovcov, ktoré sú približne dvakrát menšie (Ferez, 1993; Sappington et al., 1995).

Štruktúra LDLR je vo všeobecnosti vysoko konzervovaná, a obsahuje niekoľko základných charakteristík. Tie zahŕňajú väzbovú doménu pre ligand, prekursorovú homologickú doménu epidermálneho rastového faktora (EGF, z angl. epidermal growth factor), YWXD opakovania, transmembránovú doménu a cytoplasmatickú doménu (Sappington & Raikhel, 1998; Guidugli-Lazzarini et al., 2008).

Väzbová doména pozostáva z viacerých klastrov na cys bohatých domén typu A, pričom VgR stavovcov majú iba jeden klaster (Sappington & Raikhel, 1998). Na cys bohaté domény sú charakteristickou štruktúrnou črtou LDLR. Jedná sa o homologické, konzervované aminokyselinové sekvencie s vysokým obsahom záporného náboja, čo umožňuje väzbu pozitívne nabitých molekúl (Ullman et al., 1995; Sappington & Raikhel, 1998). EGF pozostáva z cys domén typu B a sekvencie YWXD. Tieto štruktúrne prvky sa vyskytujú nezávisle od seba v rôznych proteínoch a sprostredkovávajú interakcie proteín-proteín. Na základe tohto zistenia je možné predpokladať, že prekursorová oblasť epidermálneho rastového faktora by sa mohla podieľať na dimerizácii VgR (Sappington & Raikhel, 1998).

Mechanizmus transportu Vg prostredníctvom VgR spočíva v endocytóze komplexu Vg/VgR do vnútra bunky. Po prenesení molekuly Vg na vnútornú stranu membrány dochádza k tvorbe klatrínových vezikúl, z ktorých vznikajú vezikulárne tubulárne štruktúry, tzv. skoré endozómy. Spojením niekoľkých skorých endozómov dochádza k tvorbe žltkových teliesok (neskoré endozómy) a Vg sa potom ukladá v žltkových granulách ako Vn (Obr. 9) (Raikhel & Dhadialla, 1992). Endocytóza Vg/VgR je riadená fosforyláciou receptora. U kobyľky sťahovavej fosforyláciu pravdepodobne reguluje JH (Tufail & Takeda, 2009; Jing et al., 2021).

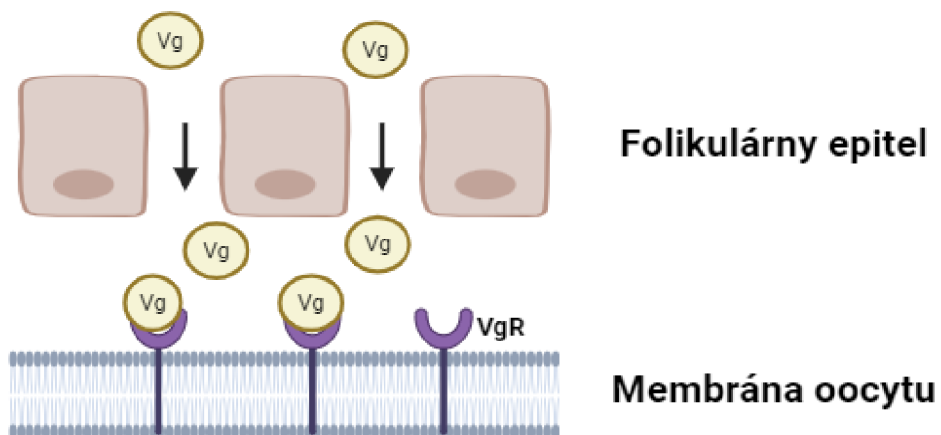


Obr. 9: Mechanizmus transportu Vg do oocyty. U kobyľky sťahovavej bolo dokázané, že VgR je riadený fosforyláciou. Vg sa viaže na VgR v membráne oocyty a prostredníctvom klatrínových vezikul a je endocytovaný do bunky. Okyslenie endozómu vedie k defosforylácii VgR a uvoľneniu Vg, ktorý sa ukladá vo forme Vn (zásobná forma Vg). Následne dochádza k recyklácii receptora a jeho opätovnej aktivácii prostredníctvom fosforylácie. Prevzaté a upravené podľa Jing et al. (2021).

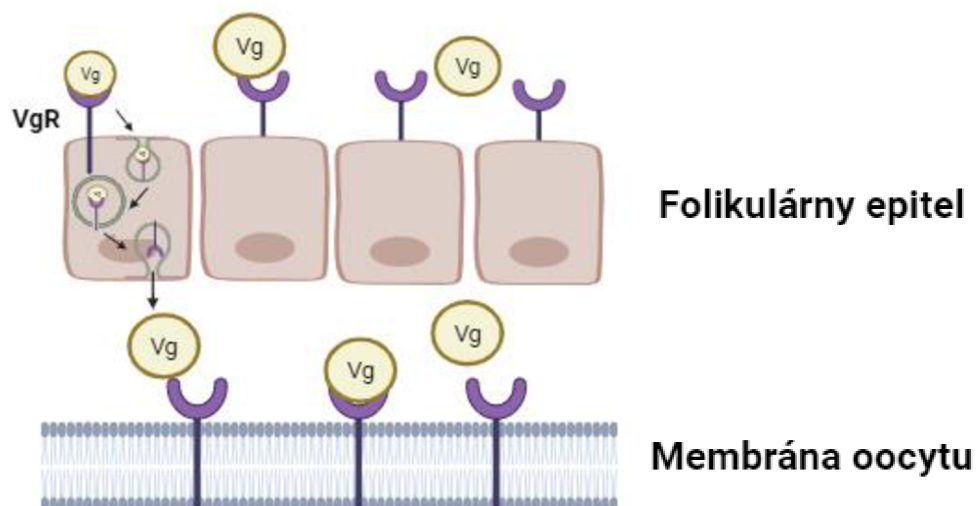
Transport Vg do folikulu sa líši v závislosti na druhu hmyzu (Obr. 10). Napr. u kobyľky sťahovavej (Lauverjat et al., 1984) alebo komára tropického (Raikhel & Lea, 1991) bola zistená paracelulárna cesta prieniku Vg k povrchu oocyty. V priebehu oogenézy dochádza vo folikulárnom epitely k rozšíreniu medzibunkových priestorov, čo umožňuje priamy prísun HL k oocyty. Na jeho povrchu sa nachádzajú VgR, ktoré Vg transportujú priamo do vnútra bunky prostredníctvom endocytózy (Raikhel & Dhadialla, 1992).

U blanokřídlavcov štúdie naznačujú, že transport Vg do folikulu je transcelulárny. To znamená, že VgR sa nachádzajú už na povrchu folikulu. Tento jav bol pozorovaný napríklad v prípade mravcov, včiel, alebo ôs (Ronnau et al., 2016; Dohanik et al., 2018).

## Paracelulárna cesta prieniku Vg do oocytu



## Transcelulárna cesta prieniku Vg do oocytu



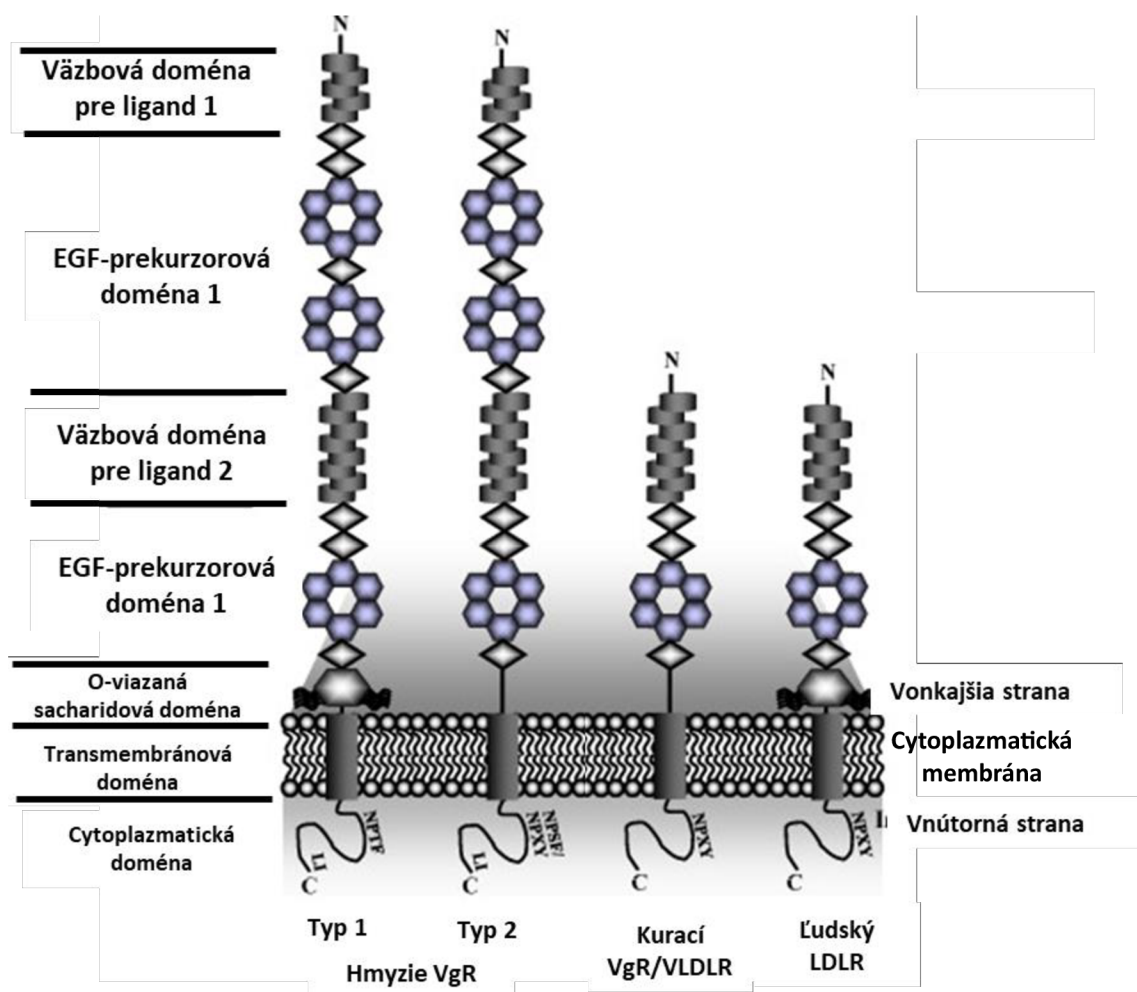
Obr. 10: Schematické znázornenie odlišných typov prieniku Vg do oocytu. Paracelulárna cesta prieniku bola zistená napríklad u kobyľky sťahovavej, alebo komára tropického. Vg v tomto prípade prestupuje cez rozšírené medzibunkové priestory vo folikulárnom epitely a na membráne oocytu nasadá na receptor. Pri transcelulárnej ceste prieniku Vg do oocytu, ktorá je charakteristická pre niektoré blanokrídlovce, nedochádza k rozšíreniu medzibunkových priestorov vo folikulárnom epitely. VgR sa okrem membrány oocytu nachádza tiež na povrchu epitelových buniek a Vg prechádza k membráne oocytu endocytózou po nasadnutí na receptor. Vytvorené pomocou programu Biorender.

### 2.4.1 Vitellogenínový receptor včely medonosnej

VgR *A. mellifera* je proteín o veľkosti 205 kDa (Amdam et al., 2003). Rovnako, ako ostatné hmyzie VgR, patrí do skupiny LDLR. Jeho predikovaná štruktúra obsahuje dve väzobné domény pre ligand. V prvej doméne sa nachádzajú 4 cys klastre a v druhej 8 cys klastrov (Guidugli-Lazzarini et al., 2008). Táto štruktúrna črta VgR včiel vykazuje podobnosť napr. s receptormi blanokřídlcov, konkrétne červeného mravca ohnivého, alebo parazitickej osy *Nasonia vitripennis*. Naopak, odlišuje sa od štruktúry VgR napr. komára tropického, rusa domového, či švába madeirského, ktoré majú v prvej cys doméne 5 klastrov (Obr. 11) (Sappington et al., 1996; Chen et al., 2004; Ciudad et al., 2006; Tufail & Takeda, 2007).

Za každou väzbovou doménou pre ligand nasleduje doména epidermálneho rastového faktora, obsahujúca cys klastre typu B aj YWXD opakovania. Včelí VgR sa podobne, ako iné VgR viaže na membránu prostredníctvom O-viazaného sacharidového zvyšku. V cytoplazmatickej doméne sa nachádzajú sekvencie na tvorbu klatrínových vezikul (Guidugli-Lazzarini et al., 2008).

Vzhľadom na rozmanitosť funkcií Vg u včiel bola prítomnosť VgR imunochemickou detekciou potvrdená okrem vajíčok matiek aj v hltanových žľazách robotníc (Amdam et al., 2003) a meraním génovej expzie v tukovom teliesku, hlave a v nízkej koncentrácii tiež v strednom čreve (Guidugli-Lazzarini et al., 2008).



Obr. 11: Porovnanie štruktúr hmyzích VgR s LDLR stavovcov. Všetky receptory z LDLR skupiny zdieľajú päť rovnakých domén. Hmyzie VgR majú v porovnaní s ostatnými typmi LDLR dve kópie domény pre väzbu ligandu a EGF prekurzorovej domény. Tak isto môžu byť rozdelené do dvoch typov. Typ 1 obsahuje v prvej väzbovej doméne 5 cys reziduí viažúcich ligand a bol nájdený napr. u komára tropického, švába madeirského, či rusa domového. Typ 2 má na konci prvej domény 4 cys reziduá (napr. u včely medonosnej alebo červeného mravca ohnivého). V druhej doméne hmyzích VgR sa nachádza v oboch typoch 8 cys reziduí, podobne ako v prípade kuracieho VgR. Pre porovnanie, ľudský LDLR má iba 7 väzobných cys reziduí. O-viazaná sacharidová doména je prítomná u všetkých známych hmyzích VgR typu 1, v prípade VgR typu 2 je jej výskyt variabilný. Prevzaté a upravené podľa Tufail & Takeda (2009).

## 2.5 Metódy pre purifikáciu vitellogenínov a vitellínov

Na purifikáciu Vg a Vn sa najčastejšie využíva ionexová (IEX) alebo afinitná chromatografia, prípadne ich kombinácia (Chinzei et al., 1981; Wheeler & Kawooya, 1990; Liu et al., 2009; Havukainen et al. 2011; Leipart et al, 2022b). Ako materiál pre získanie Vg slúži telová tekutina živočícha, alebo u hmyzu tiež tukové teliesko. Vn, ako proteíny špecifické pre oocyt, sa získavajú z vajíčok dospelých samíc (Chinzei et al., 1981; Wheeler & Kawooya, 1990; Liu et al., 2009; Havukainen et al., 2011). V niektorých štúdiách, napr. pre izoláciu Vg z kapra (*Cyprinus carpio*) bola použitá aj gélová permeačná chromatografia (Fukada et al., 2003; Liu et al., 2009)

Ionexová chromatografia je vhodná na odstránenie proteínov s odlišným izoelektrickým bodom (pI) (Sun et al., 2011). Pokiaľ je vo vzorke viac proteínov s podobným pI, ktoré pomocou sa pomocou IEX nedajú odseparovať, je možné využiť afinitnú chromatografiu s lektínom konkanavalínom A (KonA), ktorý viaže sacharidy (Boyd, 1963; Edelman et al., 1972). Keďže Vg sú väčšinou glykozylované (Engelmann, 1979; Gottlieb & Wallace, 1982; Rosanova et al., 2002), viažu sa na KonA s pomerne vysokou afinitou (Wheeler & Kawooya, 1990; Havukainen et al., 2011).

Najviac zastúpené sú okrem Vg v HL včiel apolipoforín (pI 8,64;  $M_w$  377 kDa), transferín (pI 6,77;  $M_w$  79 kDa) a hexameríny (Hex) (Isani et al., 2023; Expasy, 8.4. 2024). Hex tvoria skupinu zásobných proteínov hmyzu. U včiel sú prítomné najmä Hex110 (pI 6,43;  $M_w$  112 kDa), Hex70a (pI 6,46;  $M_w$  81 kDa), Hex70b (pI 6,72;  $M_w$  80 kDa) a Hex70c (pI 7,94;  $M_w$  81 kDa) (Danty et al., 1998; Martins et al., 2010; Expasy, 8.4. 2024). V prípade letnej generácie dospelých robotníc bola zaznamenaná iba expresia *Hex70a* (Martins et al., 2010; Lee & Kim, 2017), u zimnej generácie je exprimovaný aj *Hex110* (Ward et al., 2022), ktorý sa tvorí tiež vo vaječníkoch plodných matiek (Martins et al., 2010).

### 2.5.1 Ionexová chromatografia

Princípom IEX je adsorbcia nabitých molekúl na opačne nabitý povrch poréznych médií. Sila týchto interakcií a adsorbčná kapacita sa mení nepriamo úmerne s vodivosťou a závisí od náboja analytov a matrice, dielektrickej konštanty prostredia, či koncentracii ostatných nabitých iónov vo vzorke (Janson, 2011).

Proteíny sú nabité molekuly a menia svoj náboj v závislosti od pH, v ktorom sa nachádzajú. Hodnota pH, pri ktorej má proteín nulový náboj, je daná ako pI. Pokiaľ je pH prostredia vyššie ako pI, proteín má záporný náboj. V opačnom prípade nesie proteín



kladný náboj (Kodíček et al., 2018). Zmena náboja proteínov v závislosti na pH sa často využíva na ich separáciu pomocou IEX.

Za ionexy sa označujú zlúčeniny, ktoré môžu mať kyslé alebo zásadité vlastnosti. Tie so zásaditými vlastnosťami sa nazývajú anexy, pretože obsahujú kladne nabité funkčné skupiny a dochádza na nich k výmene aniónov. Kyslé ionexy, alebo inak tzv. katexy, obsahujú záporne nabité skupiny a prebieha na nich výmena kationov. Konkrétnym príkladom ionexu môže byť celulóza, dextrans, agaróza, polyakrylamid, či oxid kremičitý (Janson, 2011).

Ionexy sa delia na slabé a silné (Tab. 1). Toto pomenovanie nemá nič spoločné so schopnosťou viazať proteíny, ale vyjadruje, do akej miery sa ionizácia funkčných skupín matrice mení v závislosti na pH. Silné ionexy sú pomerne stabilné a v širokom rozmedzí pH nemenia náboj. Naproti tomu, slabé ionexy sú na zmeny pH citlivé a ich náboj sa mení v závislosti na pH a zložení pufru. Regulácia náboja väzbových skupín zmenou pH zabezpečuje možnosť lepšieho rozlíšenia, avšak nastavenie optimálnych podmienok separácie je oveľa náročnejšie (Janson, 2011; Sun et al., 2011).

Tab. 1: Prehľad niektorých základných ionexov Prevzaté a upravené podľa Sun et al. (2011).

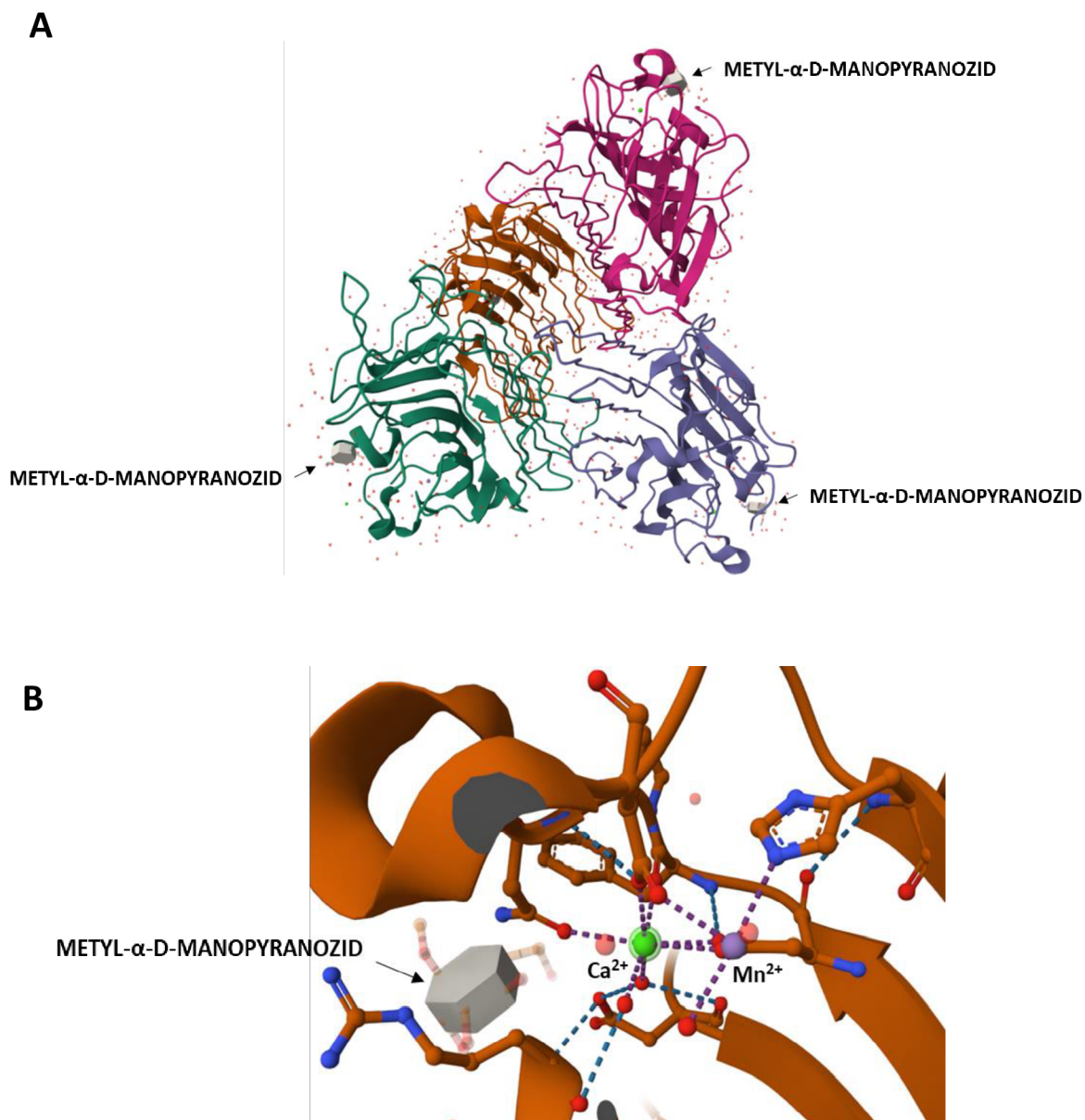
Ligand	Štruktúra	Typ ionexu
Supfopropyl (SP)	$-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CH_2CH_2SO_3^-$	Silný katex
Metyl sulfonát (S)	$-O-CH_2CHOHCH_2OCH_2CHOHCH_2SO_3^-$	Silný katex
Karboxymetyl (CM)	$-O-CH_2COO^-$	Slabý katex
Kvartérny amín (Q)	$-O-CH_2N^+(CH_3)_3$	Silný anex
Dietylamoetyl (DEAE)	$-O-CH_2CH_2NH(CH_2CH_3)_2$	Slabý anex
Dietylaminopropyl (ANX)	$-O-CH_2CHOHCH_2NH(CH_2CH_3)_2$	Slabý anex

Väzbu makromolekul na ionex do veľkej miery ovplyvňuje zloženie tzv. ekvilibračného (väzbového) pufru (ekv.), v ktorom sa rozpustená vzorka nanáša na kolónu. Vo všeobecnosti sa využíva pufr s pH, ktoré sa od pI proteínu líši o 0,5-1 jednotku, aby bol proteín vhodne nabitý v závislosti od použitia katexu alebo anexu. Koncentrácia solí väzbového pufru býva väčšinou nízka (20 – 50 mmol·l<sup>-1</sup>). Najčastejším postupom elúcie proteínu z kolóny je zvýšenie koncentrácie solí vo väzbovom pufri. Ióny solí súťažia s proteínom o väzbu na maticu a pri ich vysokej koncentrácii dochádza k vytesneniu a elúcii biomolekuly. Pre elúciu je možné využiť tiež zmenu pH (na anexe zvýšenie, na katexe zníženie pH). Elúcia proteínu z kolóny môže prebiehať postupnou, konštantnou zmenou pufru (lineárnym gradientom, alebo krok za krokom), či nárazovou výmenou puftrov (Janson, 2011; Sun et al., 2011).

### **2.5.2 Chromatografia na konkanavalíne A**

Konkanavalín A je lektín pochádzajúci z bôbovitej rastliny *Canavalia ensiformis*. Lektíny tvoria skupinu proteínov, ktoré dokážu s vysokou špecifitou rozpoznávať a viazať sacharidy (Boyd, 1963; Edelman et al., 1972).

Štruktúra KonA v roztoku závisí na pH. V kyslom pH (nižšie ako 6) tvorí diméry a v pH vyššom ako 7 má štruktúru tetraméru. Obsahuje väzobné miesta pre sacharidy (konkrétne manózu alebo glukózu), a tiež pre ióny Ca<sup>2+</sup> a Mn<sup>2+</sup>, ktorých prítomnosť je pre naviazanie sacharidu nevyhnutná (Edelman et al., 1972). Väzba medzi KonA a sacharidom vzniká prostredníctvom vodíkových väzieb so sacharidovými hydroxylmi. Štyri vodíkové väzby spájajú molekulu sacharidu s -NH skupinami lektínu a dve vodíkové väzby sa nachádzajú medzi sacharidom a aminokyselinovými zvyškami naviazanými na Ca<sup>2+</sup>. Bivalentné ióny Ca<sup>2+</sup> a Mn<sup>2+</sup> sa nezúčastňujú väzby sacharidu priamo, ale pomáhajú pri stabilizácii štruktúry väzobného miesta (Obr. 12). Hlavnou funkciou Ca<sup>2+</sup> je orientovať AMK zvyšky do správnej polohy pre väzbu sacharidu. Prítomnosť Mn<sup>2+</sup> zase zabezpečuje správnu orientáciu AMK zvyškov, ktoré viažu Ca<sup>2+</sup> (Derewenda et al., 1989).

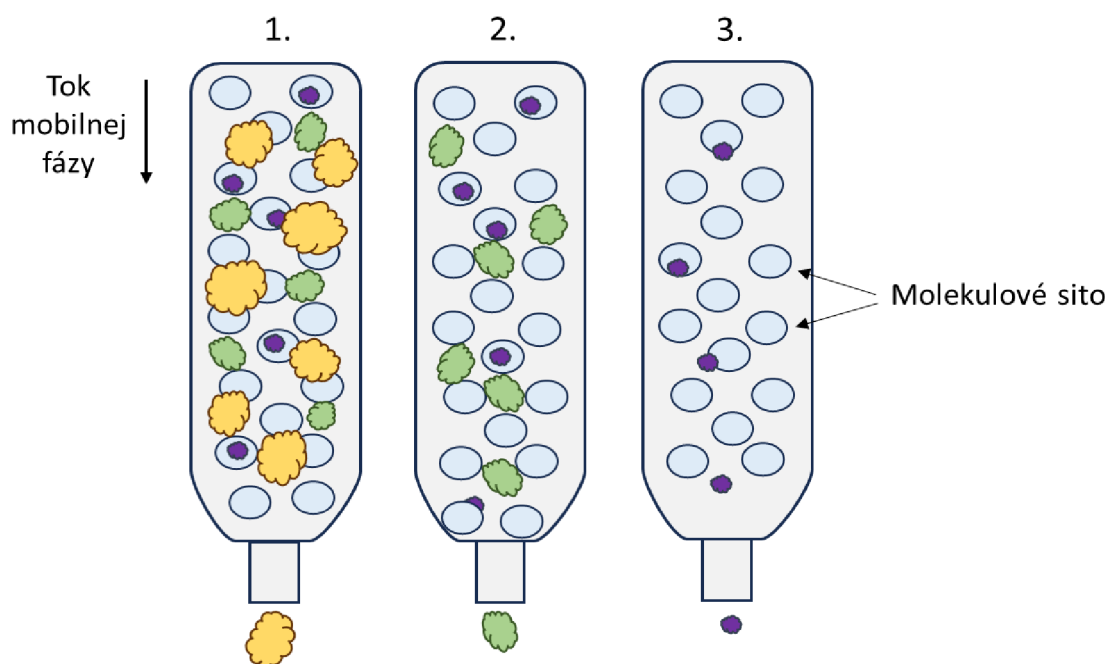


Obr. 12: Štruktúra konkanavalínu A s naviazaným ligandom (A) a detailné zobrazenie umiestnenia  $\text{Ca}^{2+}$  (zelená guľička) a  $\text{Mn}^{2+}$  (fialová guľička) voči manopyranozidu (B) (PDB databáza, 13.12.2023).

### 2.5.3 Gélová permeačná chromatografia

Gélová permeačná chromatografia (GPC) je separačná metóda slúžiaca na rozdelenie molekúl podľa molekulovej hmotnosti. Kolóna býva naplnená poréznu zosieťovanou gélovou maticou s definovanou veľkosťou pórov. Príkladom môže byť dextrans, polyakrylamid alebo agaróza. Molekuly väčšie, ako dutiny v matici sa nezachytia a vytečú z kolóny ihneď po nanesení vzorky. Čím je molekula menšia, tým viac penetruje do pórov gélu. Pri elúcii teda dochádza k postupnému uvoľňovaniu molekúl z kolóny od najväčších po najmenšie (Obr. 13) (Sun et al., 2011).

Keďže pri GPC je nežiadúce, aby matrix reagovala s analytom, pre nanesenie vzorky sa využívajú pufre s vyššou koncentráciou solí ( $0,05 - 0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Neiónovým medzimolekulovým interakciám je možné vyhnúť sa malým prídavkom detergentu, etylénglykolu alebo acetonitrilu (Janson, 2011).



Obr. 13: Ilustračné znázornenie gélovej permeačnej chromatografie. Najväčšie molekuly (žltá) vytečú z kolóny ihneď po nanesení vzorky na kolónu (1.), pretože sa nezachytávajú do pórov molekulového sita. Molekuly so strednou molekulovou hmotnosťou (zelená) sa eluujú neskôr (2.), pretože sú spomaľované pórmi v matici, do ktorých sa včleňujú. Najmenšie molekuly (fialová) prestupujú až do poréznych častíc gélu a sú preto z kolóny eluované ako posledné (3.). Vytvorené v powerpointe.

## 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Akrylamid (AA) (Sigma-Aldrich, USA)
- Bisakrylamid (BIS) (MP Biomedicals, USA)
- Bromfenolová modrá (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB G-250) (Bio-Rad, USA)
- Disodná soľ EDTA (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Dithiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Etanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Fenyltiomočovina (PTU) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Glycín (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Hovädzí sérový albumín (BSA) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid horečnatý (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Chlorid manganatý (Carl Roth, Nemecko)
- Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)
- Chlorid vápenatý (Lach-Ner, Česká republika)
- Kozia anti-králičia IgG protilátka s naviazanou chrenovou peroxidasou (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Kyselina fosforečná (Lach-Ner, Česká republika)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-ner, Česká republika)
- Kyselina octová (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- L-histidín (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Marker molekulovej hmotnosti Serva Triple Color protein standard III pre SDS-PAGE elektroforézu (Serva, Nemecko)
- Metanol (Lach-Ner, Česká republika)
- Metyl- $\alpha$ -D-manopyranozid (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- *n*-butanol (Sigma-Aldrich, Nemecko)

- N,N'-tetramethylendiamin (TEMED) (Carl Roth, Nemecko)
- Nitrotetrazoliová modrá (NBT) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Persíran amónny (APS) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Polyklonálna králičia protilátka proti Vg (Biologické centrum CAS, České Budějovice)
- Ponceau S (Merck, Nemecko)
- Protease Inhibitor Cocktail P9599 (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Sephacryl S-200 HR (Cytiva, USA)
- Síran amónny (Lach-Ner, Česká republika)
- Sušené nízкотučné mlieko (Carl Roth, Nemecko)
- Trietanolamín (TEA) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Tris(hydroxymetyl)aminometán (Tris) (MP Biomedicals, Francúzsko)
- Tween-20 (Carl Roth, Nemecko)

### 3.1.2 Roztoky

- 0,02% bromfenolová modrá
- 10% (w/v) SDS
- 10% persíran amónny
- 60% glycerol
- akrylamid-N,N'-methylbisakrylamid: 30 % (w/v) AA, 0,8 % BIS (w/v) vo vode
- CBB G-250 zásobný roztok: 0,58 mmol·l<sup>-1</sup> CBB G-250, 25 % EtOH a 50 % kyselina fosforečná
- CBB G-250 koloidný farbiaci roztok: 0,15 % (w/v) CBB G-250, 12,5% síran amónny, 20% metanol, 12,3% kyselina fosforečná
- CBB G-250 fixačný roztok: 50% metanol, 10% kyselina octová
- farbiaci roztok Ponceau S: 0,2% (w/v) Ponceau S v 10% (v/v) kyseliny octovej
- premývací roztok pre Amicon: 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NaOH
- premývací roztok 1 pre anexovú kolónu: 1 mol·l<sup>-1</sup> NaOH
- premývací roztok 2 pre anexovú kolónu: 2 mol·l<sup>-1</sup> NaCl
- pufoer blotovací: 0,048 mol·l<sup>-1</sup> Tris, 0,039 mol·l<sup>-1</sup> glycín, 20 % (v/v) methanol (pH 8,3)
- pufoer do deliaceho gélu: 1,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 8,8)
- pufoer do zaostrovaného gélu: 0,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 6,8)

- pufoer ekv. pre anexovú chromatografiu (1): 30 mmol·l<sup>-1</sup> TEA/HCl (pH 8)
- pufoer ekv. pre anexovú chromatografiu (2): 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl (pH 7,4)
- pufoer elučný (eluč.) pre anexovú chromatografiu (1): 30 mmol·l<sup>-1</sup> TEA/HCl, 1 mol·l<sup>-1</sup> NaCl (pH 8)
- pufoer eluč. pre anexovú chromatografiu (2): 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl, 1 mol·l<sup>-1</sup> NaCl (pH 7,4)
- pufoer eluč. pre anexovú chromatografiu (3): 20 mmol·l<sup>-1</sup> L-His/HCl, 1 mol·l<sup>-1</sup> NaCl (pH 5,6)
- pufoer ekv. pre KonA chromatografiu (1): 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl, 0,5 mol·l<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·l<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub> 1 mmol·l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> (pH 7,4)
- pufoer ekv. pre KonA chromatografiu (2): 50 mmol·l<sup>-1</sup> kyselina octová/NaOH, 0,5 mol·l<sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·l<sup>-1</sup> MnCl<sub>2</sub> 1 mmol·l<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> (pH 6)
- pufoer eluč. pre KonA chromatografiu (1): 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris, 0,5 mol·l<sup>-1</sup> NaCl, 0,5 mol·l<sup>-1</sup> metyl- $\alpha$ -D-manopyranozid (pH 7,4)
- pufoer eluč. pre KonA chromatografiu (2): 50 mmol·l<sup>-1</sup> kys. octová/NaOH, 0,5 mol·l<sup>-1</sup> metyl- $\alpha$ -D-manopyranozid (pH 4)
- pufoer elektródový pre SDS-PAGE: 0,025 mol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl, 0,192 mol·l<sup>-1</sup> glycín, 0,1% (w/v) SDS (pH 8,3)
- pufoer fosfátový (PBS) s inhibítormi proteáz: 0,137 mol·l<sup>-1</sup> NaCl, 2,68 mmol·l<sup>-1</sup> KCl, 10 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,38 mmol·l<sup>-1</sup> K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Protease Inhibitor Cocktail P9599 (riedenie 1000 $\times$ ), 1 mmol·l<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA (pH 7,4)
- pufoer pre detekciu alkalické fosfatasy: 100 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl, 50 mmol·l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 100 mmol·l<sup>-1</sup> Tris-HCl (pH 9,5)
- pufoer pre gélovú permeačnú chromatografiu: 30 mmol·l<sup>-1</sup> TEA/HCl, 50 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl (pH 8)
- pufoer pre elektroforézu za neredukujúcich podmienok: 5% SDS, 25% glycerol
- pufoer regeneračný pre KonA: 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl, 0,5 mol·l<sup>-1</sup> NaCl (pH 8,5)
- pufoer vzorkovací (2 $\times$  Laemmli): 0,125 mol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl, 4% (w/v) SDS, 20% glycerol, 0,2 mol·l<sup>-1</sup> DTT, 0,02% (w/v) bromfenolová modrá (pH 6,8)
- roztok BCIP: 5% BCIP v 100% DMF
- roztok NBT: 10% NBT v 70% DMF
- TBS pracovný pufoer pre imunodetekciu (5 $\times$  TBS): 100 mmol·l<sup>-1</sup> Tris, 2,5 mmol·l<sup>-1</sup> NaCl (pH 7,5)

- Tween v TBS (TBS-T): 0,15 ml Tween-20 a 300 ml 1x TBS
- vodou nasýtený *n*-butanol

### 3.1.3 Biologický materiál

Včely letnej a zimnej generácie vyliahnuté a chované v laboratórnych podmienkach, poskytnuté Mgr. Jiřím Danihlíkom, PhD.. Kŕmené 50% sacharózou a peľovou náhradou UltraBee. Včelie matky zo včelstiev, ktoré boli poskytnuté včelárom Mgr. Bronislavem Grunou.

### 3.1.4 Prístroje a pomôcky

- Analytické váhy Denver Summit (Denver Instrument, USA)
- Amicon Ultra-4 centrifugačné filtračné skúmavky, cut off 100 kDa (Merck Millipore, Nemecko)
- Aparatúra pre SDS-PAGE (Bio-Rad, USA)
- Automatické pipety (Eppendorf, Nemecko)
- Blotovacie zariadenie Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA)
- Blotovacia membrána nitrocellulosová Amersham Hybond-ECL, priemer pórov 0,2  $\mu\text{m}$  (GE Healthcare, USA)
- Blotovací papier ALBET (ScienceLab, USA)
- Centrifúga 5418 R (Eppendorf, Nemecko)
- Centrifúga Rotanta 460R (Hettich, Nemecko)
- Filter VacuCap<sup>TM</sup> 0,22  $\mu\text{m}$  (Pall Lab USA)
- Oscilačný mlynček MM 400 (Retsch, Nemecko)
- Inkubátor Dry Bath (Major Science, USA)
- Kolónka HiTrap ANX Sepharose FF, 1 ml (Cytiva, USA)
- Kolónka HiTrap Con A 4B, 1 ml (Cytiva, USA)
- Komerčné gradientové gély 4-20% (Bio-Rad, USA)
- Magnetická miešačka Big Squid (IKA, Nemecko)
- Mikrodoštička TPP, 96 jamiiek (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Mikrodoštičkový spektrofotometer PowerWave XS (BioTek Instruments, USA)
- Mikroskúmavky (Eppendorf, Nemecko)
- Nízkotlakový kvapalinový chromatograf BioLogic LP (Bio-Rad, USA)
- Podložka pre zobrazenie gélov White Tray (Bio-Rad, USA)
- Predvážky (Ranwag, Česká republika)



- Stereolupa BEL binokulár (Bel photonics, Taliansko)
- Trepačka Bio Shaker 3D (BioSan, Lotyšsko)
- Ultrazvukový čistič Elmasonic S 50 R (Simply Sonic s.r.o., Česká Republika)
- Vortex V-1 plus (BioSan, Lotyšsko)
- Zdroj elektrického napätia PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)
- Zobrazovacie zariadenie pre gély Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)

## 3.2 Metódy

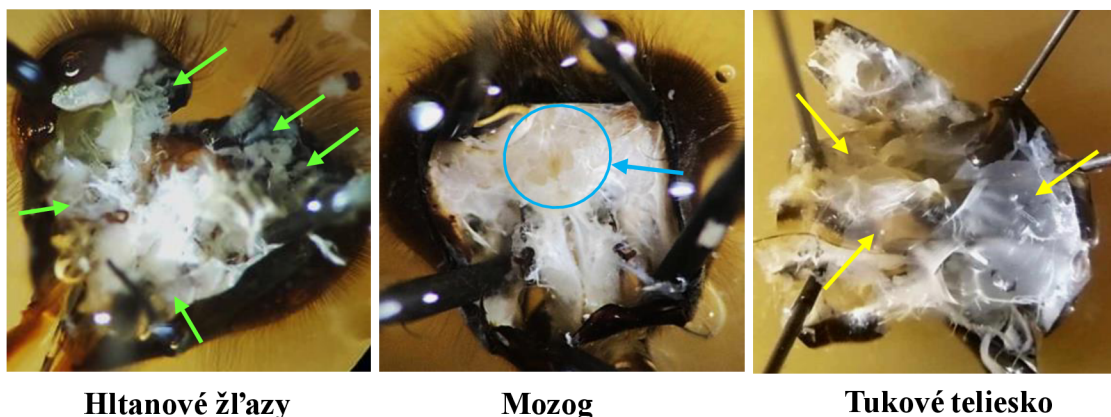
### 3.2.1 Spracovanie biologického materiálu

Pre analýzu bola použitá HL včiel, hrudník, tukové teliesko, hltanové žľazy, črevo a mozog (Obr. 14).

HL bola odoberaná z hrudnej časti matiek a včelích robotníc po rozstrihnutí ostrými manikúrovými nožničkami medzi hrudňou a bruškom. Stlačením hrudníka medzi prstami bola vytlačená kvapka HL, ktorá bola odobratá automatickou pipetou. Z robotníc boli odobraté približne 2  $\mu$ l, z matiek 4  $\mu$ l. HL bola umiestnená do mikroskúmavky s malým množstvom PTU (slúži ako inhibítor fenoloxidázovej reakcie) a uskladnená pri  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  pre ďalšie použitie. Druhá sada vzoriek HL bola odobratá do roztoku PBS s inhibítormi proteáz (10  $\mu$ l HL do 90  $\mu$ l PBS) a rovnako uskladnená pri  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Tukové teliesko bolo odoberané zo zadočkov zimných včiel. Zadočky boli najskôr pomocou pinzety zbavené čriev, následne boli prestrihnuté, roztvorené, a pomocou entomologických špendlíkov prichytené na kontrastný podklad pripravený roztopením zafarbeného včelieho vosku v Petriho miske. Na podklad bol nanesený vychladený TEA pufor (pH 8) tak, aby pokryl vzorku. Pod lupou bolo zvnútra zadočkov odobraté tukové teliesko bez prichytených ciev a nervových vlákien. Celý proces prebiehal na ľade a odobraté vzorky boli uskladnené pri  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  pre ďalšie použitie.

Hltanové žľazy a mozog boli odoberané z hlavovej časti. Najskôr bola ostrou žiletkou odrezaná vrchná vrstva kutikuly, následne bola hlava prichytená pomocou entomologických špendlíkov na kontrastný voskový podklad. Pitva prebiehala opäť vo vychladenom TEA pufri. Z vnútra hlavy boli najskôr odobraté hltanové žľazy a následne mozog. Proces prebiehal na ľade a vzorky boli uskladnené pri  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$  pre ďalšie použitie.



Obr. 14: Ukážka pitvaných častí zimných včiel. Z hlavovej časti boli najskôr odobrané hltanové žľazy, ktoré sa nachádzajú na povrchu (zelené šípky). Po odstránení hltanových žliaz bolo odobrané mozgové tkanivo v spodnej časti včelej hlavy uprostred (modrý ovál). Tukové teliesko sa nachádza zo spodnej strany kutikuly po celom povrchu zadočkovej časti (žlté šípky).

### 3.2.2 Homogenizácia vzoriek

Do mikroskúmaviek k jednotlivým telovým častiam (hlava, hrud', zadoček, tráviaca sústava) boli pridané 4 veľké sklenené homogenizačné guľičky, k vypitvaným orgánom (tukové teliesko, hltanové žľazy a mozog) bolo pridaných 5 stredne veľkých sklenených homogenizačných guľičiek. Každá mikroskúmavka obsahovala telovú časť z jednej včely. Z telových častí bez kutikuly boli pripravené 2 sady vzoriek, pričom do jednej sady bolo pridaných 100  $\mu$ l TEA pufru (pH 8) a druhá sada bola homogenizovaná nasucho. Homogenizácia prebiehala v oscilačnom mlynčeku (10 min, 30 Hz). Následne bol do všetkých mikroskúmaviek pridaný TEA pufr tak, aby bol výsledný objem 200  $\mu$ l. Po dôkladnom premiešaní na vortexe boli vzorky centrifugované 20 min pri 16 000  $\times$ g a 4 °C. Supernatant bol premiestnený do čistej mikroskúmavky a uskladnený pri -60 °C pre ďalšie použitie.

### 3.2.3 Stanovenie koncentrácie proteínov Bradfordovou metódou

Koncentrácia proteínov vo vzorkách bola stanovená na základe kalibračnej závislosti štandardných roztokov BSA o rôznej koncentrácii podľa Bradforda (Bradford, 1976). Pre stanovenie koncentrácie proteínov v HL bol vytvorený štandard zmiešaním všetkých HL zimných včiel odobratých do zr. PTU, a to kvôli zamedzeniu rozdielných výsledkov spôsobených odlišným zastúpením proteínov v jednotlivých včelách. Koncentrácia proteínov v HL matiek je orientačná, pretože bola stanovovaná zo vzorky HL niekoľkých

matiiek odoberaných v rovnakom období. Nebol však vytvorený štandard zo všetkých používaných HL matiek. Z roztoku BSA bol pripravený kalibračný rad štandardov o koncentráciách 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750 a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

Do 96-jamkovej mikrotitračnej doštičky bolo v triplikátoch napipetovaných 45  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O, 5  $\mu\text{l}$  štandardu alebo vhodne nariadená vzorka a 200  $\mu\text{l}$  pracovného roztoku Bradfordovho činidla. Ako blank bola použitá ddH<sub>2</sub>O. Doštička bola následne prikrytá viečkom a ponechaná inkubovať 10 min kvôli vývinu sfarbenia. Absorbancia bola zmeraná na spektrofometri PowerWave XS pri vlnovej dĺžke 595 nm. Dáta boli zobrazené v programe Gen5 3.06 (Biotek).

### **3.2.4 Nízkotlaková kvapalinová chromatografia za použitia slabého anexu**

Kolóna (HiTrap ANX Sepharose FF, 1 ml, Cytiva) bola pred prvým použitím premytá podľa pokynov výrobcu: najskôr 5 $\times$  (5 násobné množstvo objemu kolóny) ekv. pufrom, potom 5 $\times$  eluč. pufrom a nakoniec znova 10 $\times$  ekv. pufrom pri prietoku 1 ml $\cdot$ min<sup>-1</sup>. Všetky roztoky boli prefiltrované cez 0,22  $\mu\text{m}$  filter a odplynené.

Vzorka bola pripravená nariadením HL 10 $\times$  ekv. pufrom. Po premiešaní na vortexe bola vzorka centrifugovaná pri 14000  $\times g$  po dobu 2 min. Požadovaný objem nariadenej HL bol na kolónu nanosený pomocou automatickej pipety.

Nakoľko cieľom bola optimalizácia metódy, boli skúšané rôzne podmienky priebehu chromatografie (Tab. 2). Prietok ekv. pufru pre naviazanie proteínov bol vždy 0,5 ml $\cdot$ min<sup>-1</sup>.

Po skončení chromatografie bola kolóna po niekoľkých použitíach regenerovaná premytím 10 $\times$  2 mol $\cdot$ l<sup>-1</sup> NaCl, 5 $\times$  1 mol $\cdot$ l<sup>-1</sup> NaOH, znova 10 $\times$  2 mol $\cdot$ l<sup>-1</sup> NaCl a nakoniec ddH<sub>2</sub>O. Skladovaná bola vždy v 20% EtOH pri 4 °C.

Tab. 2: Testované podmienky pre optimalizáciu chromatografie na anexe

<b>Ekvilibračný pufo</b>
20 mmol·l <sup>-1</sup> Tris/HCl, pH 7,4
30 mmol·l <sup>-1</sup> TEA/HCl, pH 8
<b>Elučný pufo</b>
20 mmol·l <sup>-1</sup> Tris/HCl + 1 mol·l <sup>-1</sup> NaCl, pH 7,4
20 mmol·l <sup>-1</sup> L-His + 1 mol·l <sup>-1</sup> NaCl, pH 5,6
30 mmol·l <sup>-1</sup> TEA + 1 mol·l <sup>-1</sup> NaCl, pH 8
<b>Objem vzorky</b>
400 µl
100 µl
50 µl
<b>Riedenie vzorky</b>
100×
10×
<b>Typ vzorky</b>
HL zimnej včely odoberaná do PBS (10× riedená)
HL zimnej včely odoberaná do zr. PTU
HL matky odoberaná do zr. PTU
<b>Prietok pri elúcii</b>
0,8 ml·min <sup>-1</sup>
0,5 ml·min <sup>-1</sup>
0,3 ml·min <sup>-1</sup>
<b>Typ elúcie</b>
Lineárny gradient
Kroková elúcia

### 3.2.5 Nízkotlaková kvapalinová chromatografia na Konkanavalíne A

Kolóna (HiTrap Con A 4B, 1 ml, Cytiva) bola pred prvým použitím premytá podľa pokynov výrobcu: 20× ekv. pufrom kvôli vymytiu nenaviazaného KonA a ekvilibracii. Všetky roztoky boli prefiltrované cez 0,22 µm filter a odplynené.

Vzorka bola pripravená nariedením frakcií po anexe (2×), prípadne celej HL (10×) ekv. pufrom. Nakoľko prebiehala optimalizácia metódy, boli testované rôzne typy vzoriek a podmienky chromatografie (Tab. 3). Po premiešaní na vortexe bola vzorka centrifugovaná pri 14000 ×g po dobu 2 min. Na kolónu bolo nanesených 100 µl vzorky pomocou automatickej pipety.

Od naniesenia vzorky bol zachovaný postup premytia kolóny ekv. pufrom (10 ml pri prietoku 0,2 ml·min<sup>-1</sup>) a následne výmena za eluč. pufo. Elúcia prebiehala lineárnym gradientom, alebo jednoduchou výmenou pufru za 100% eluč. pufo.

Po skončení elúcie bola kolóna regenerovaná premytím 10× regeneračným pufrom a uskladnená v 20% EtOH.

Tab. 3: Testované podmienky pre optimalizáciu chromatografie na konkanavalíne A

<b>Ekvilibračný pufo</b>
20 mmol·l <sup>-1</sup> Tris/HCl, 0,5 mol·l <sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·l <sup>-1</sup> MnCl <sub>2</sub> , 1 mmol·l <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> , pH 7,4 50 mmol·l <sup>-1</sup> kys. octová/NaOH, 0,5 mol·l <sup>-1</sup> NaCl, 1 mmol·l <sup>-1</sup> MnCl <sub>2</sub> , 1 mmol·l <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub> , 1 mmol·l <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub> , pH 6
<b>Elučný pufo</b>
20 mmol·l <sup>-1</sup> Tris, 0,5 mol·l <sup>-1</sup> NaCl, 0,5 mol·l <sup>-1</sup> metyl- $\alpha$ -D-manopyranozid, pH 7,4 50 mmol·l <sup>-1</sup> kys. octová/NaOH, 0,5 mol·l <sup>-1</sup> metyl- $\alpha$ -D-manopyranozid, pH 4
<b>Typ vzorky</b>
Celá HL Frakcie po anexe
<b>Typ elúcie</b>
Lineárny gradient Okamžitá výmena pufov a pauzy počas elúcie

### 3.2.6 Gélová permeačná chromatografia

Zvolená matrica (Sephacryl S-200 HR) bola naplnená do kolóny o veľkosti 10 cm. Kolóna bola následne 10× premytá pufrom pre GPC. Potom bolo na kolónu aplikovaných 100  $\mu$ l HL o koncentrácii proteínov 5 mg·ml<sup>-1</sup>. Chromatografia prebiehala pri prietoku 0,5 ml·min<sup>-1</sup>.

### 3.2.7 Zakoncentrovanie vzoriek pomocou Amicon Ultra-4 (100 kDa)

Centrifugačné kolónky Amicon Ultra-4 (cut off 100 kDa) boli pred prvým použitím premyté podľa pokynov výrobcu 2 ml 0,1 mol·l<sup>-1</sup> NaOH a následne 2 ml ddH<sub>2</sub>O. Ako vzorky boli použité frakcie po chromatografii.

Centrifugácia prebiehala pri 4 °C a 4000  $\times$ g 5 min v prípade premývania bez vzoriek, a pri 4 °C a 4000  $\times$ g 15 min po nanosení vzoriek. Po prvom zakoncentrovaní frakcií boli ku koncentrátu v kolónke pridané 2 ml ekv. pufru a vzorky boli opäť centrifugované (15 min, 4000  $\times$ g). Toto premytie bolo zopakované ešte raz a následne boli koncentráty z vrchnej časti kolónky opatrne odpipetované do čistých mikroskúmaviiek. Z 2 ml pôvodnej vzorky bolo získaných približne 20  $\mu$ l koncentrátu. Kolónky boli pred nanosením novej vzorky centrifugované s 2 ml 70% etanolu a 2 ml ddH<sub>2</sub>O po 5 min. Pre ďalšie použitie boli skladované v 20% etanole pri 4 °C.

### 3.2.8 SDS-PAGE za redukčných podmienok

Vzorka bola zmiešaná s 2× vzorkovacím pufrom podľa Laemmliho v pomere 1:1. Po premiešaní na vortexe prebiehala denaturácia proteínov pri 70 °C 15 min v termostate. Potom bola vzorka ochladená na ľade a centrifugovaná 5 min pri 15 000  $\times$ g a 4 °C.

Pre delenie proteínov bol použitý buď komerčný gradientový polyakrylamidový gél (4-20%), alebo bol pripravený vlastný polyakrylamidový gél (podľa Tab. 4).

Tab. 4: Zloženie deliaceho a zaostrovacieho gélu pre denaturačnú elektroforézu. Objemy sú uvedené v ml.

Typ gélu	AA/BIS 30%/0,8%	Tris/HCl (1,5 mol·l <sup>-1</sup> , pH 8,8)	Tris/HCl (0,5 mol·l <sup>-1</sup> , pH 6,8)	ddH <sub>2</sub> O	SDS	TEMED	APS
Deliaci 10%	3,4	2,5	-	3,8	0,1	0,01	0,07
Zaostrovací 4%	1,3	-	2,5	5,9	0,2	0,02	0,12

Ako prvý bol nanosený deliaci gél. Po premiešaní komponentov pre deliaci gél a pridaní čerstvo pripraveného roztoku APS bola zahájená polymerizačná reakcia, preto bol roztok okamžite aplikovaný pomocou Pasteurovej pipety medzi sklíčka elektroforetickej aparatury (cca 1 cm od zubov hrebienka). Na povrch gélu bola nanosená tenká vrstva vodou nasýteného *n*-butanolu. Po stuhnutí deliaceho gélu (cca 30 min) bol *n*-butanol odstránený, priestor medzi sklami bol premytý ddH<sub>2</sub>O a vysušený filtračným papierom. Rovnakým spôsobom bol pripravený zaostrovací gél, ktorý bol nanosený na stuhnutý deliaci gél. Do gélu bol ihneď opatrne vložený 10-jamkový hrebienok a gél bol opäť ponechaný tuhnúť cca 30 min. Takto boli pripravené celkom dva gély. Po stuhnutí boli sklá s gélom vložené do elektroforetickej komôrky. Hrebienok bol opatrne vytiahnutý a do komôrky bol naliaty elektródový pufor. Do jamiek boli pipetou aplikované vzorky (množstvo podľa typu vzorky) a 3 µl markeru Serva Triple Color protein standard III (Serva, Nemecko). Aparatúra bola umiestnená do chladničky a napojená na zdroj elektrického napätia. Elektroforéza prebiehala najprv pri konštantnom napätí 100 V po dobu približne 20 min, po zaostrení bolo napätie zvýšené na 200 V, kým zóna bromfenolovej modrej nedoputovala na spodok deliaceho gélu. Po ukončení elektroforézy bola aparatúra odpojená od zdroja napätia, pufor bol odstránený a gély boli pomocou plastovej špachtle oddelené od skiel. Zaostrovací gél bol odstránený do odpadu. Deliaci gél bol na 20 min umiestnený do fixačného roztoku a následne farbený koloidným roztokom CBB G-250 v plastovej krabicike na trepačke cez noc. Odfarbenie prebiehalo niekoľkonásobným premytím odfarbovacím roztokom a destilovanou vodou. Gél bol odfotený pomocou prístroja Gel Doc EZ Imager a spracovaný v programe Image Lab.

### 3.2.9 SDS-PAGE za neredukčných podmienok

Vzorky boli pripravené zmiešaním vybraných frakcií po GPC s pufrom pre neredukujúcu elektroforézu (25% glycerol, 5% SDS) tak, aby výsledná koncentrácia proteínov v jamke

bola 1,5  $\mu\text{g}$ . Následne prebiehala inkubácia jednotlivých vzoriek v termostate pri teplotách 22 °C, 37 °C, 50 °C, 70 °C po 10 min a pri 100 °C 5 min pre vytvorenie niekoľkých rôznych typov neredukčných podmienok. Potom boli vzorky centrifugované pri 15 000  $\times g$  a 4 °C 5 min a nanosené na vopred pripravené polyakrylamidové gély. Zloženie a príprava gélov bolo identické, ako v prípade SDS-PAGE za redukčných podmienok. Do krajných jamiek bolo nanosených 5  $\mu\text{l}$  bromfenolovej modrej so 60% glycerolom. Množstvo markeru bolo 3  $\mu\text{l}$  na jamku. Elektroforéza prebiehala pri konštantnom napätí 100 V približne 20 min a po zaostrení proteínových zón bolo napätie zvýšené na 200 V. Po skončení elektroforézy boli gély fixované približne 20 min a následne farbené koloidným roztokom CBB G-250 v plastovej krabicike na trepačke cez noc. Odfarbenie prebiehalo niekoľkonásobným premytím odfarbovacím roztokom a destilovanou vodou. Gély boli odfotené pomocou prístroja Gel Doc EZ Imager a spracované v programe Image Lab.

### **3.2.10 Western blot**

#### **3.2.10.1 Prenos proteínov na membránu**

Nitrocelulózoová membrána bola vystrihnutá tak, aby odpovedala veľkosti gélu. Rovnako boli vystrihnuté 2 ks hrubých filtračných papierov o veľkosti gélu. Pred umiestnením do blotovacej komôrky Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell boli všetky komponenty (gél po elektroforéze, filtračné papiere aj membrána) inkubované v blotovacom pufrí približne 30 min. Následne bol na anódovej elektróde blotovacej komôrky zostavený tzv. sendvič v poradí filtračný papier, membrána, gél, filtračný papier. Pomocou valčeka boli odstránené vzduchové bubliny medzi gélom a membránou. Komôrka bola uzavretá pomocou katódovej elektródy a veka a pripojená k zdroju elektrického prúdu. Blotovanie prebiehalo 1 h pri konštantnom prúde 1,8 mA na 1  $\text{cm}^2$  gélu.

Pre overenie úspešného transferu bola membrána umiestnená do plastovej krabičky s farbiacim roztokom Poceau S na približne 5 min. Po zvýraznení proteínových zón bola membrána prepláchnutá ddH<sub>2</sub>O a použitá pre imunochemickú detekciu proteínov.

#### **3.2.10.2 Imunochemická detekcia vitellogenínu**

Nitrocelulózoová membrána po blotovaní bola inkubovaná v 20 ml roztoku 5% sušeného mlieka v TBS cez noc na trepačke pri 4 °C. Následne bola 2 $\times$  po 10 min premytá 50 ml roztoku TBS-T. Inkubácia s 10 ml roztoku primárnej protilátky prebiehala 2 h pri laboratórnej teplote (riedenia sa líšili v rámci optimalizácie). Následne boli membrány opäť premyté 2 $\times$  50 ml roztoku TBS-T po 10 min. Inkubácia s 10 ml roztoku sekundárnej

protilátky prebiehala 2 h pri laboratórnej teplote (riedenie 1:10 000). Po skončení inkubácie nasledovalo posledné premytie 2× roztokom TBS-T. Detekcia alkalickéj fosfatázy prebiehala pomocou roztoku NBT-BCIP (5 ml pufru pre ALP, 16 µl roztoku NBT a 16 µl roztoku BCIP), v ktorom bola membrána ponechaná približne 1 min do vývinu sfarbenia a následne bola niekoľkokrát premytá ddH<sub>2</sub>O.

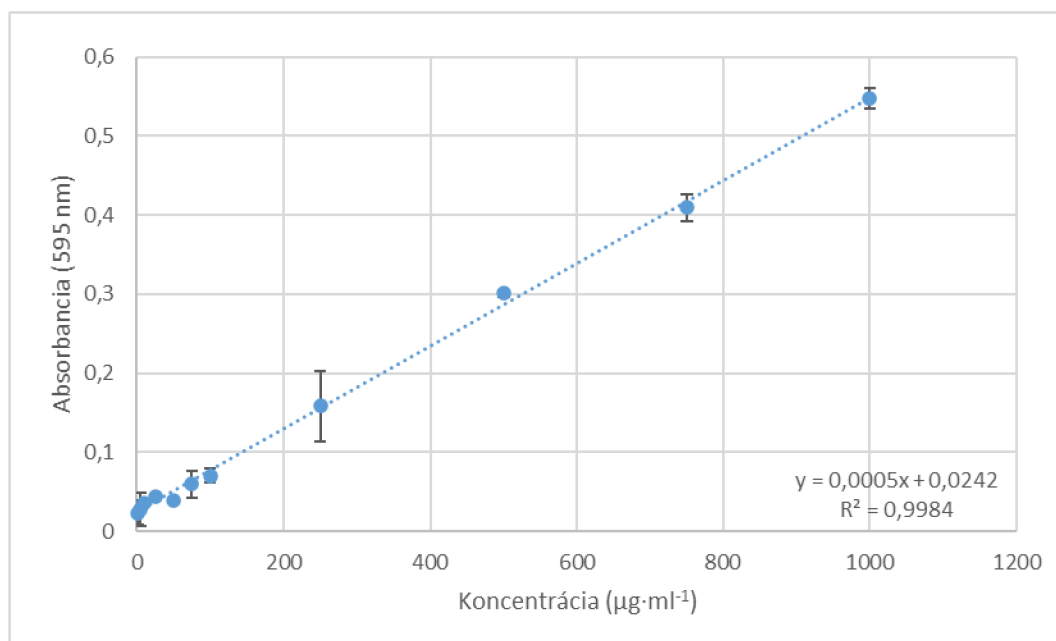


## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Stanovenie koncentrácie proteínov Bradfordovou metódou

Koncentrácia celkových proteínov bola stanovovaná v 100× nariedenej vzorke HL zimných včiel a v telových častiach (Tab. 5) na základe rovnice lineárnej regresie vyplývajúcej z grafu kalibračnej závislosti štandardov BSA (Obr. 15). Z telových častí, ktoré boli homogenizované v pufri aj nasucho boli ďalej použité tie, v ktorých bola nameraná vyššia koncentrácia proteínov: mozog a hltanové žľazy homogenizované v pufri a tukové teliesko homogenizované nasucho.

Po optimalizácii chromatografie bolo na kolónu aplikovaných približne 0,28 mg celkových proteínov (100 µl 10× riedenej HL zimných včiel), alebo 0,61 mg celkových proteínov (100 µl 10× riedenej HL matiek).



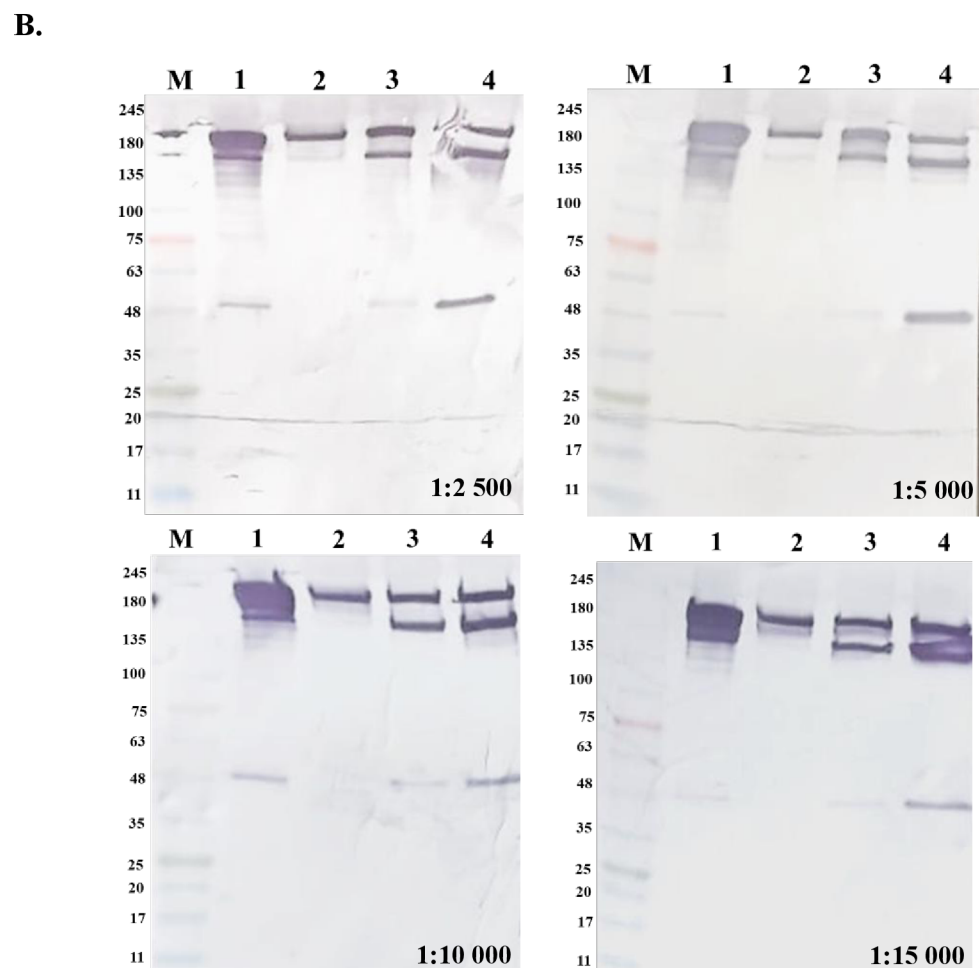
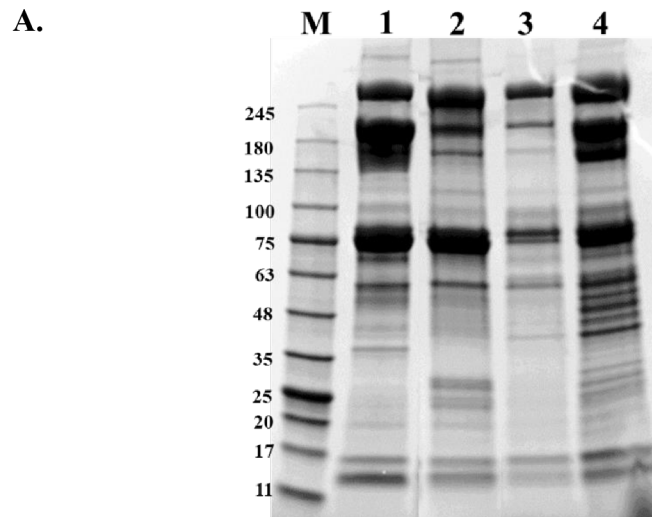
Obr. 15: Kalibračná priamka štandardov BSA vytvorená z priemerných hodnôt triplikátov jednotlivých štandardov.

Tab. 5: Koncentrácia proteínov vo vzorkách stanovená na základe rovnice kalibračnej závislosti štandardov BSA. Skratka puf. znamená telové časti homogenizované v pufri.

Vzorka	Obsah proteínov (mg·ml <sup>-1</sup> )
HL zimných včiel	27,767
HL matiek	60,760
Hlava	0,526
Hrud'	2,682
Zadok	0,601
Tráviaca sústava	1,694
Mozog	0,154
Mozog (puf.)	0,257
Hltanové žľazy	0,271
Hltanové žľazy (puf.)	0,483
Tukové teliesko	0,312
Tukové teliesko (puf.)	0,109

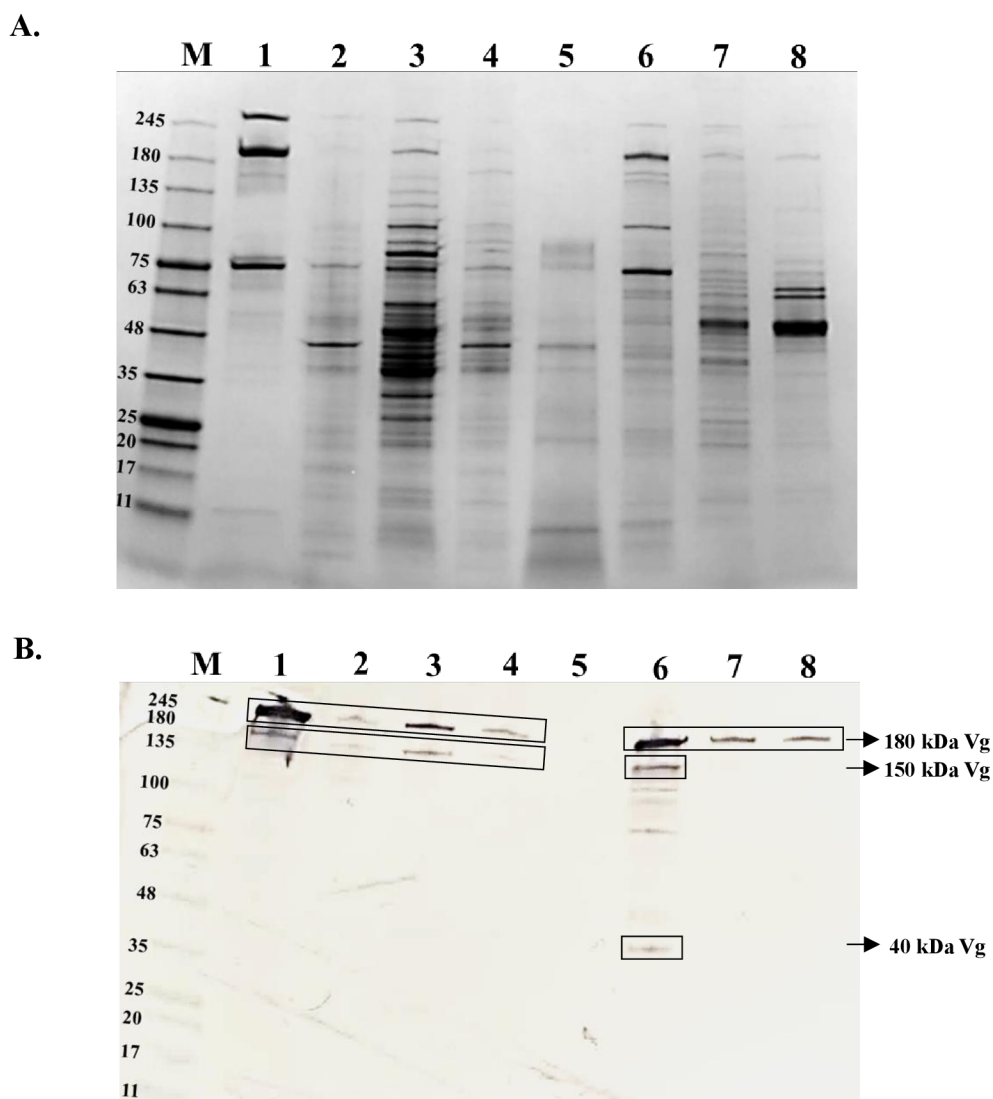
## 4.2 Imunochemická detekcia vitellogenínu

V prvom kroku bola v nadväznosti na bakalársku prácu (Hrtánková; 2022) dokončená optimalizácia detekcie Vg z HL metódou Western blot. Testované podmienky zahŕňali optimalizáciu riedenia primárnej protilátky (1:2 500; 1:5 000; 1:10 000; 1:15 000). Využitie boli rôzne staré letné včely (0 dní, 2 dni, 5 dní, 9 dní), nakoľko experiment prebiehal v období, kedy zimná generácia včiel s vyšším zastúpením Vg ešte nebola dostupná (Obr. 16). Ako najoptimálnejšie bolo zvolené riedenie 1:10 000, pretože pri tomto riedení bol dosiahnutý ideálny kompromis medzi dostatočnou viditeľnosťou všetkých fragmentov a spotrebou protilátky.



Obr. 16: A – Komerčný polyakrylamidový gél (4-20%) znázorňujúci proteínové pásy hemolymfy rôzne starých letných včiel. B – Nitrocelulóзовé membrány po imunochemickej detekcii Vg; testovanie rôznych riedení primárnej protilátky (riedenia uvedené na príslušných membránach). Vzorok: HL matky (1) a letných včiel vo veku 0 dní (2), 5 dní (3) a 9 dní (4). HL bola odoberaná do zr. PTU. Do jamky bolo nanášaných 10  $\mu$ l vzorky 10 $\times$  riedenej Laemmliho pufrom. M značí marker molekulovej hmotnosti v kDa. Tri viditeľné proteínové pásy odoviedajú fragmentom Vg (od vrchu 180, 150 a 40 kDa).

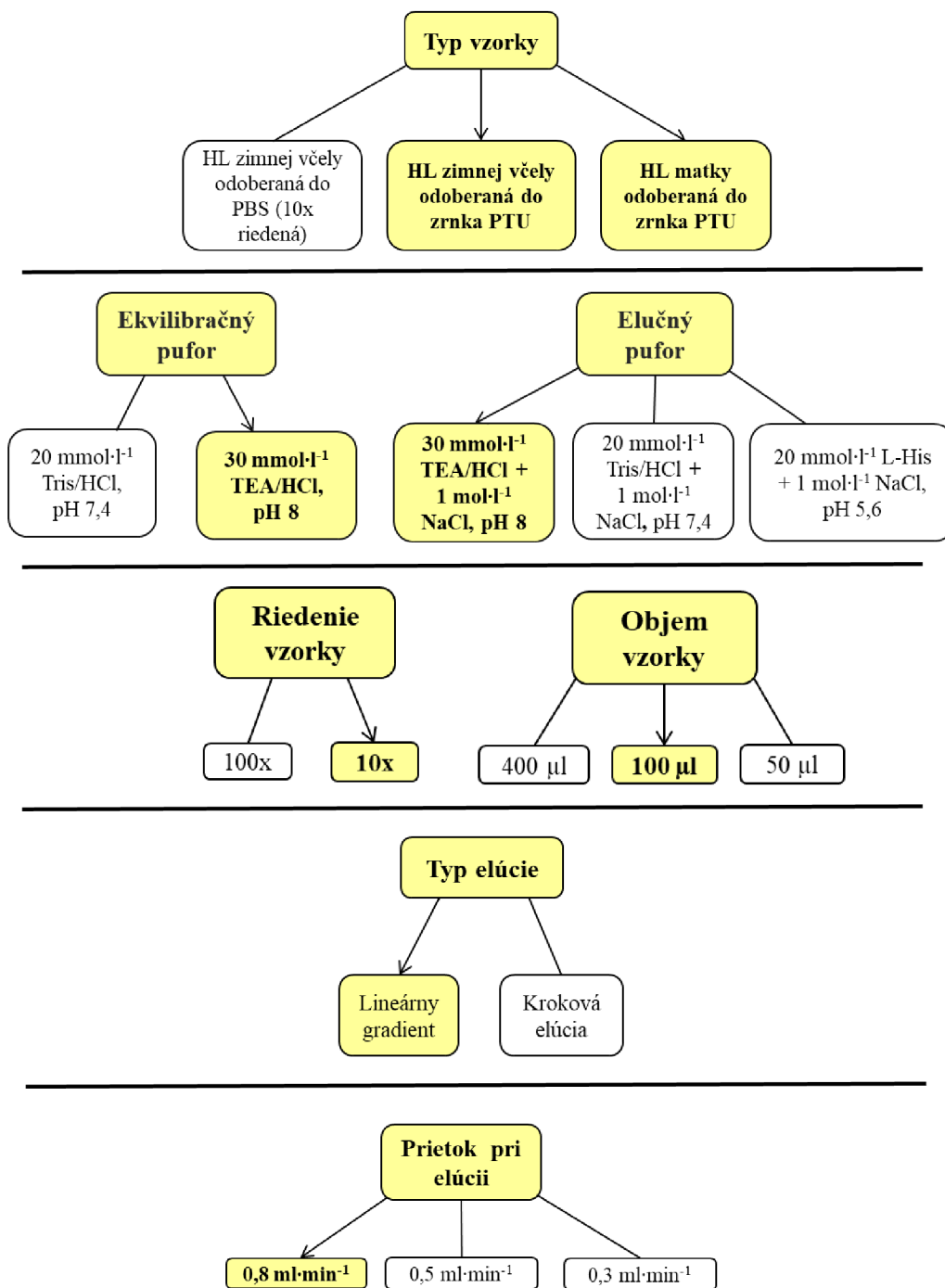
Pre zvolenie najvhodnejšieho materiálu na purifikáciu Vg bola jeho prítomnosť najskôr overená v rôznych častiach tela a tkanivách zimných včiel (Obr. 17). Na imunochemickú detekciu bola využitá HL, tukové teliesko, zadok po pitve, tráviaca sústava, hrudník, mozog, hltanové žľazy a hlava po pitve.



Obr. 17: A – Komerčný polyakrylamidový gél (4-20%) znázorňujúci proteínové pásy hemolymfy a telových častí zimných včiel. B – nitrocelulózoová membrána po imunochemickej detekcii Vg. Vzorok: hemolymfa (1), zadok po pitve (2), hrudník (3), hlava po pitve (4), tráviaca sústava (5), tukové teliesko (6), mozog (7) a hltanové žľazy (8). M značí marker molekulovej hmotnosti v kDa. Do jamky boli nanášané 2  $\mu$ g proteínov. Šípkami je vyznačený Vg a jeho fragmenty.

### 4.3 Nízkotlaková kvapalinová chromatografia za použitia slabého anexu

Prehľadný postup optimalizácie je zhrnutý v schéme (Obr. 18). Jednotlivé kroky sú detailne rozobrané v nasledujúcich podkapitolách.



Obr. 18: Diagramy optimalizácie chromatografie na anexe. Žltou farbou sú vyznačené podmienky, ktoré boli vyhodnotené ako najlepšie.

### 4.3.1 Typ vzorky a zavedenie Amicon Ultra-4 (100 kDa)

Testované boli tri typy vzoriek: HL zimných včiel odoberaná do roztoku PBS s inhibítormi proteáz (10× riedená), HL zimných včiel odoberaná do zr. PTU a HL matky odoberaná do zr. PTU.

Prvá bola testovaná HL odoberaná do roztoku PBS. Ako ekv. pufor bol použitý  $30 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TEA/HCl a ako eluč. pufor  $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  L-His/HCl +  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl (pH 5,6) (Obr. 19). Frakcie nanosené na SDS-PAGE nie sú zakoncentrované pomocou Amicon Ultra-4, pretože nutnosť zavedenia tohto kroku bola odvodená až na základe výsledkov z nasledujúcich pokusov. Na kolónu bolo nanášaných 400  $\mu\text{l}$  vzorky kvôli zvýšeniu množstva proteínov. Keďže prietok pri uvedenom pokuse tiež ešte nebol optimalizovaný, po 100. minútu mal hodnotu  $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , a následne bol zvýšený na  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .

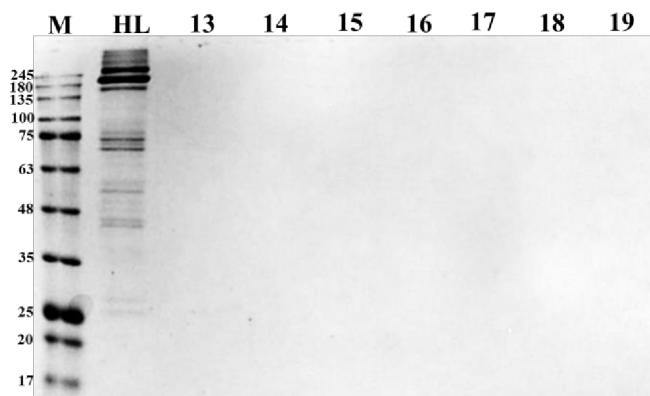
Ďalšia použitá vzorka bola HL matky odoberaná do zr. PTU. Elúcia prebiehala gradientom NaCl bez zmeny pH. Prietok bol rovnako, ako v predchádzajúcom prípade,  $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  po 100. min, a následne  $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Na základe výsledku tohto pokusu bol do postupu optimalizácie purifikácie zavedený krok zakoncentrovania frakcií prostredníctvom Amicon Ultra-4 100 kDa. V prípade gélu po zakoncentrovaní boli nanášané frakcie spájané dokopy vždy 1+1, pretože hlavným cieľom bolo overiť, či tento krok pomôže vizualizovať proteínové pásy vo frakciách (Obr. 20).

Posledným testovaným typom vzorky bola HL zimnej včely odoberaná do zr. PTU, kde bol použitý optimalizovaný prietok  $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  po nanosení vzorky a  $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  od začatia elúcie (Obr. 21). V tomto pokuse bol dosiahnutý optimálny výsledok pre purifikáciu Vg od ostatných proteínov, najmä od proteínového pásu v oblasti okolo 70 kDa.

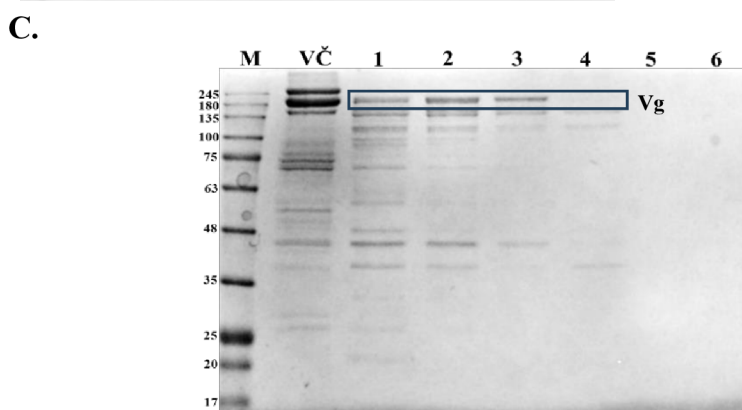
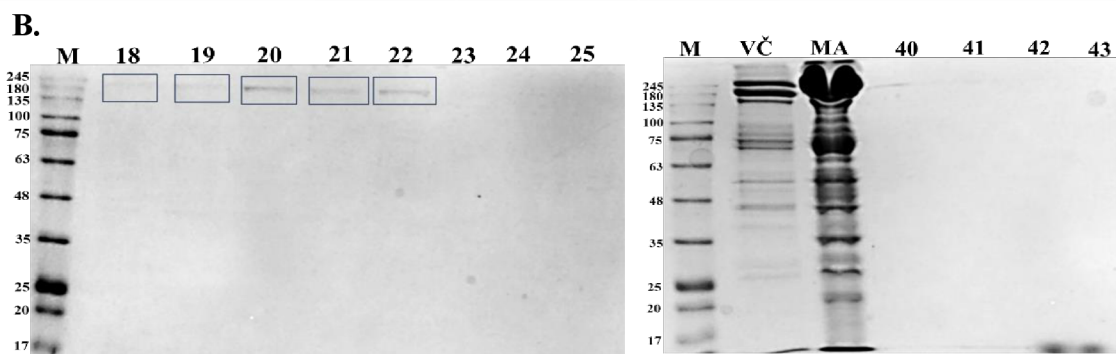
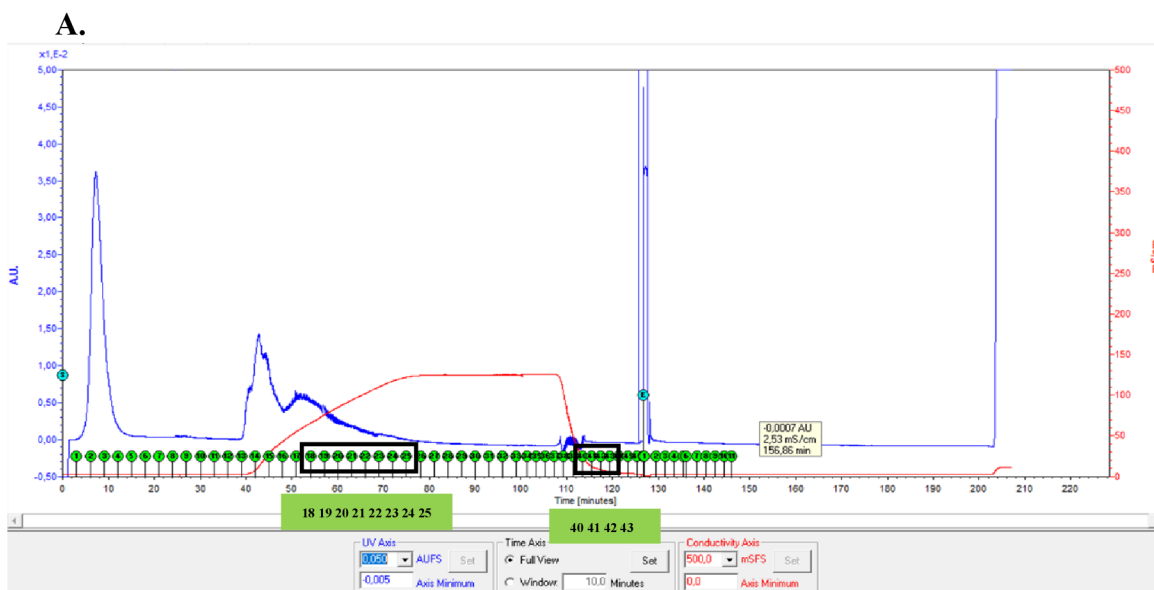
**A.**



**B.**

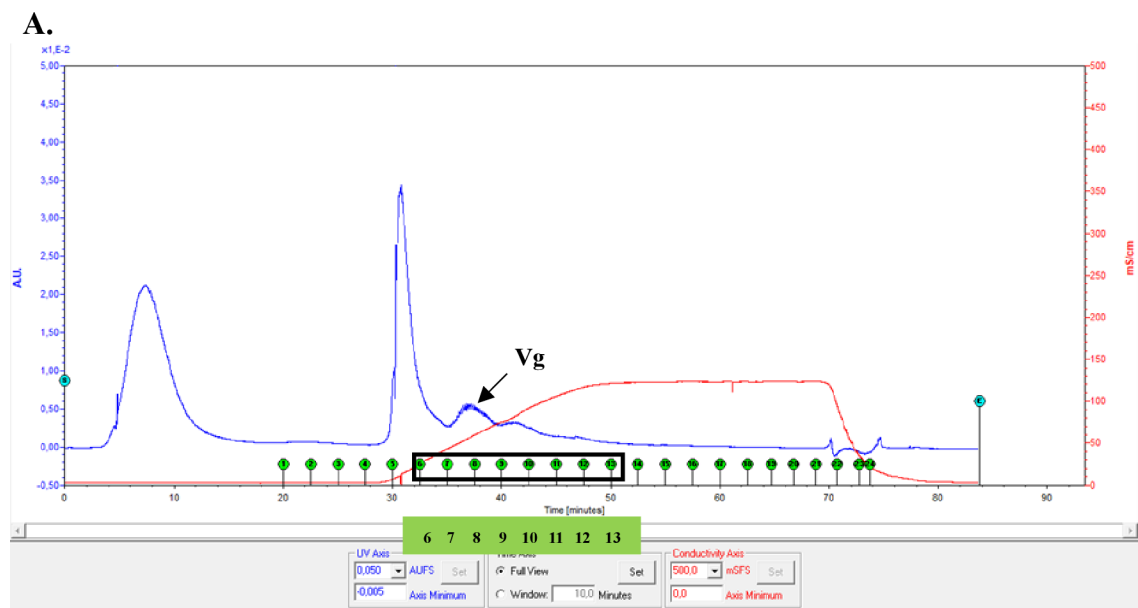


Obr. 19: A – Chromatogram po nanesení 400  $\mu\text{l}$  100 $\times$  riedenej HL zimných včiel. Ekv. pufor: 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TEA/HCl (pH 8), eluč. pufor: 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  L-His/HCl + 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl (pH 5,6). Frakcie 13-19 (od približne 39. do 57. min) boli pozbierané po 2 ml (vyznačené v čiernom aj zelenom rámtku). B – SDS-PAGE (10% gél) frakcií vyznačených na chromatograme. M značí marker molekulovej hmotnosti v kDa, HL je 100 $\times$  riedená hemolymfa zimných včiel v PBS a ekv. pufri (2  $\mu\text{g}$  proteínov na jamku) slúžiaca ako kontrola. Číslo korešpondujú s číslami frakcií vyznačených na chromatograme. Do jamky bolo nanášaných 8  $\mu\text{l}$  z každej frakcie. Proteínový pás v oblasti 180 kDa pre Vg nebol detegovaný.

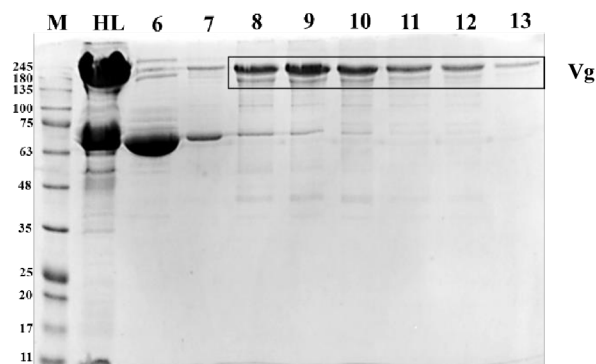


Obr. 20: A – Chromatogram po nanosení 100  $\mu\text{l}$  10 $\times$  riedenej HL matky. Ekv. pufor: 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TEA/HCl (pH 8), eluč. pufor: 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TEA/HCl + 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl (pH 8). Frakcie 18-25 (od 54. do 75. min) a 40-43 (od 114. do 120. min) boli pozbierané po 2 ml (vyznačené v čiernom aj zelenom rámečku). B – SDS-PAGE (10% gél) frakcií vyznačených na chromatograme. M značí marker molekulovej hmotnosti v kDa, ako kontrolné vzorky boli použité hemolymfa zimnej včely v PBS a ekv. pufri (VČ, 2  $\mu\text{g}$  proteínov na jamku) a hemolymfa matky (MA, 48  $\mu\text{g}$  proteínov na jamku). Čísla korešponujú s číslami frakcií vyznačených na chromatograme. Do jamky bolo nanášaňých 12  $\mu\text{l}$  z každej frakcie. C – SDS-PAGE (10% gél) frakcií po zakoncentrovaní pomocou Amicon Ultra-4 100 kDa. Čísla značia frakcie vyznačené na chromatograme spojené dokopy vždy 1+1: 1 (18+19), 2 (20+21), 3 (22+23), 4 (24+25), 5 (40+41), 6 (42+43). Do jamky bolo nanášaňých 8  $\mu\text{l}$  koncentrátu. V rámečku je označená 180 kDa oblasť, kde bol detegovaný Vg.





**B.**



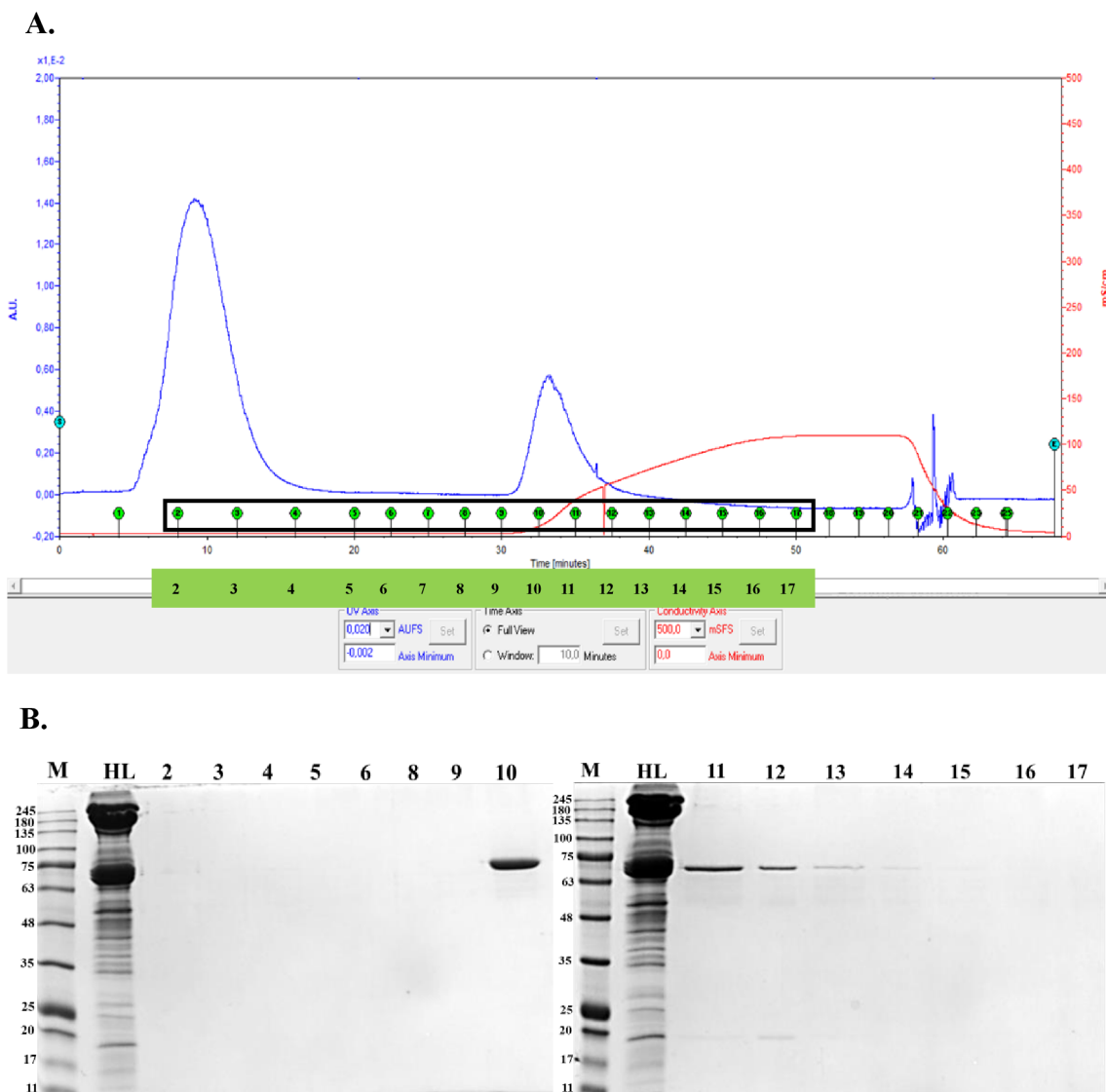
Obr. 21: A. – Chromatogram po nanesení 100  $\mu$ l 10 $\times$  riedenej HL zimných včiel. Ekv. pufo: 30 mmol $\cdot$ l $^{-1}$  TEA/HCl (pH 8), eluč. pufo: 30 mmol $\cdot$ l $^{-1}$  TEA/HCl + 1 mol $\cdot$ l $^{-1}$  NaCl (pH 8). Frakcie 6-13 (od približne 32. do 50. min) boli pozbierané po 2 ml (vyznačené v zelenom aj čiernom rámmiku). B – SDS-PAGE (10% gél) frakcií vyznačených na chromatograme. M značí marker molekulovej hmotnosti v kDa, HL je 10 $\times$  riedená hemolymfa zimných včiel v ekv. pufri (22  $\mu$ g proteínov na jamku) slúžiaca ako kontrola. Čísła korešpondujú s číslami frakcií vyznačených na chromatograme. Do jamky bolo nanášaných 8  $\mu$ l koncentrátu po Amicon Ultra-4 100 kDa. V rámmčeku je označená 180 kDa oblasť, kde bol detegovaný Vg.

### 4.3.2 Ekvilibračný a elučný pufo

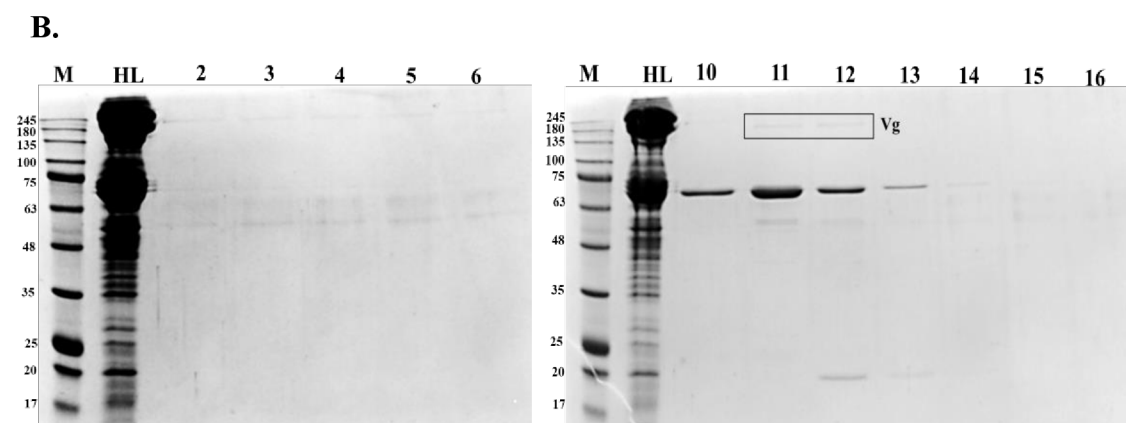
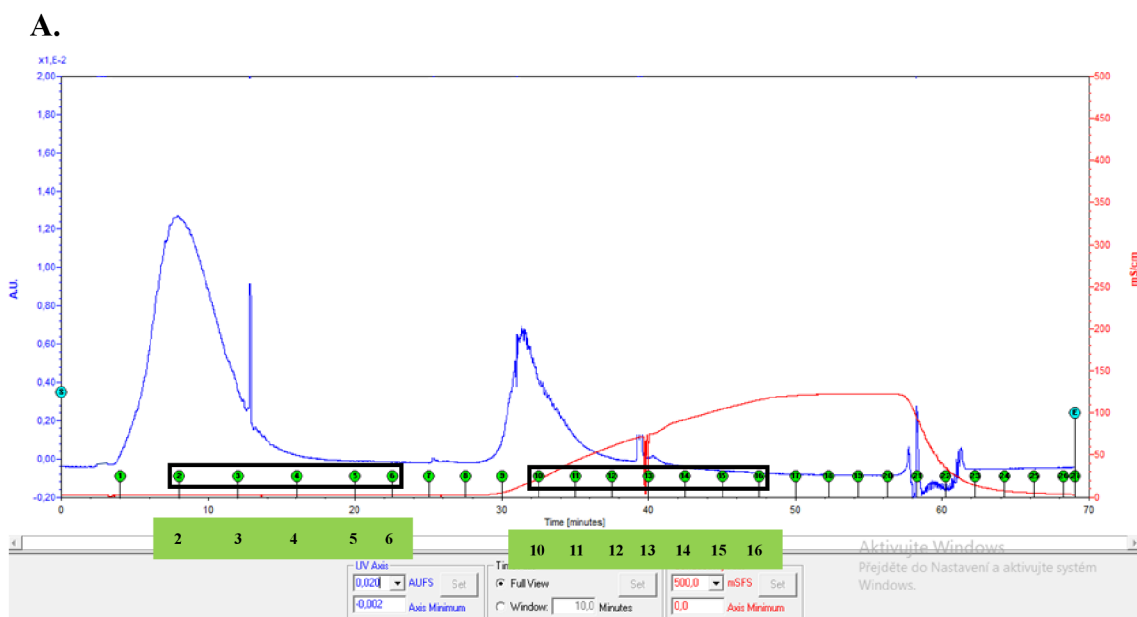
Najskôr bola testovaná pufová zostava vychádzajúca z článku od Leipart et al. (2022b). Za ekv. pufo bol zvolený 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl, nakoľko vyššia koncentrácia soli nebola výrobcom kolónky pre slabý anex odporúčaná (Cytiva life sciences HiTrap ANX Sepharose FF Instructions for Use, 2.4. 2024). Ako eluč. pufo bol použitý 20 mmol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl + 1 mol·l<sup>-1</sup> NaCl. Na kolónu bolo nanesených 100 µl 10× riedenej HL zimnej včely v ekv. pufo. Prietok po nanesení vzorky na kolónu bol 0,5 ml·min<sup>-1</sup>. Elúcia prebiehala lineárnym gradientom zvyšovania koncentrácie NaCl pri prietoku 0,8 ml·min<sup>-1</sup>. Prítomnosť proteínov v pozbieraných frakciách bola po zakoncentrovaní pomocou Amicon Ultra-4 100 kDa overená na SDS-PAGE za redukčných podmienok. Vo výsledku (Obr. 22) nedošlo k detekcii proteínového pásu v oblasti 180 kDa, preto bola táto zostava z ďalších pokusov vylúčená.

V ďalšom kroku bolo pH ekv. aj eluč. pufru zvýšené na 8. Zloženie pufov bolo zmenené na 30 mmol·l<sup>-1</sup> TEA/HCl pre ekv. pufo a 30 mmol·l<sup>-1</sup> TEA/HCl + 1 mol·l<sup>-1</sup> NaCl pre eluč. pufo. Na gély po SDS-PAGE bol pozorovaný slabý proteínový pás o veľkosti 180 kDa (Obr. 23). Uvedená pufová zostava bola vyhodnotená ako najvhodnejšia.

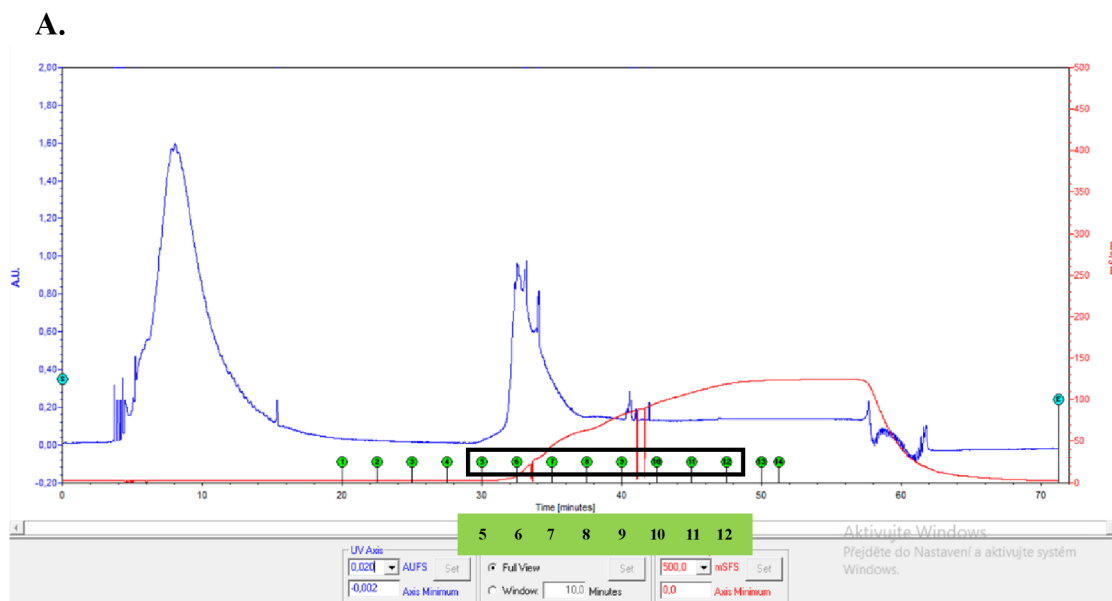
Posledným krokom tejto časti optimalizácie bola skúška elúcie s využitím soľného aj pH gradientu, nakoľko sa predpokladalo, že zmena pH by mohla pomôcť lepšej desorbci silne naviazaných proteínov a lepšiemu rozlíšeniu. Za eluč. pufo bol zvolený 20 mmol·l<sup>-1</sup> L-His/HCl + 1 mol·l<sup>-1</sup> NaCl (pH 5,6). Výsledok tohto optimalizačného kroku (Obr. 24) sa však veľmi nelíšil od elúcie soľným gradientom.



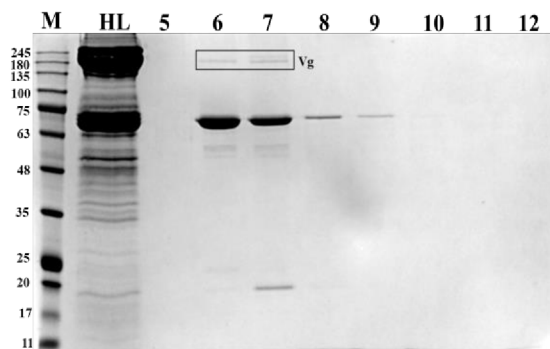
Obr. 22: A – Chromatogram po nanesení 100  $\mu\text{l}$  10 $\times$  riedenej HL zimných včiel. Ekv. pufor: 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris/HCl (pH 7,4), eluč. pufor: 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris/HCl + 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl (pH 7,4). Frakcie 2-17 (od 8. do 50. min) boli pozbierané po 2 ml (vyznačené v zelenom aj čiernom rámečku) B – SDS-PAGE (10% gély) frakcií 2-17 vyznačených na chromatograme. M značí marker molekulovej hmotnosti v kDa, HL je 10 $\times$  riedená hemolymfa zimných včiel v ekv. pufri (22  $\mu\text{g}$  proteínov na jamku) slúžiaca ako kontrola. Čísla korešpondujú s číslami frakcií vyznačených na chromatograme. Do jamky bolo nanášaných 8  $\mu\text{l}$  koncentrátu po Amicon Ultra-4 100 kDa. Proteínový pás v oblasti 180 kDa pre Vg nebol detegovaný.



Obr. 23: A. – Chromatogram po nanesení 100  $\mu$ l 10 $\times$  riedenej HL zimných včiel. Ekv. pufo: 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TEA/HCl (pH 8), eluč. pufo: 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TEA/HCl + 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl (pH 8). Frakcie 2-6 (od približne 7. do 23. min) a 10-16 (od 32. do 48. min) boli pozbierané po 2 ml (vyznačené v čínom aj zelenom rámmiku). B. – SDS-PAGE (10% gél) frakcií vyznačených na chromatograme. M značí marker molekulovej hmotnosti v kDa, HL je 10 $\times$  riedená hemolymfa zimných včiel v ekv. pufrí (22  $\mu$ g proteínov na jamku) slúžiaca ako kontrola. Čísla korešpondujú s číslami frakcií vyznačených na chromatograme. Do jamky bolo nanášaných 8  $\mu$ l koncentrátu po Amicon Ultra-4 100 kDa. V rámmčku je označená 180 kDa oblasť, kde bol detegovaný Vg.



**B.**



Obr. 24: A – Chromatogram po nanesení 100  $\mu$ l 10 $\times$  riedenej HL zimných včiel. Ekv. pufor: 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TEA/HCl (pH 8), eluč. pufor: 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  L-His/HCl + 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl (pH 5,6). Frakcie 5-12 (od približne 30. do 47. min) boli pozbierané po 2 ml (vyznačené v zelenom aj čiernom rámečku). B – SDS-PAGE (10% gél) frakcií vyznačených na chromatograme. M značí marker molekulovej hmotnosti v kDa, HL je 10 $\times$  riedená hemolymfa zimných včiel v eluč. pufri (22  $\mu$ g proteínov na jamku) slúžiaca ako kontrola. Číslo korešpondujú s číslami frakcií vyznačených na chromatograme. Do jamky bolo nanášaných 8  $\mu$ l koncentrátu po Amicon Ultra-4 100 kDa. V rámečku je označená 180 kDa oblasť, kde bo detegovaný Vg.

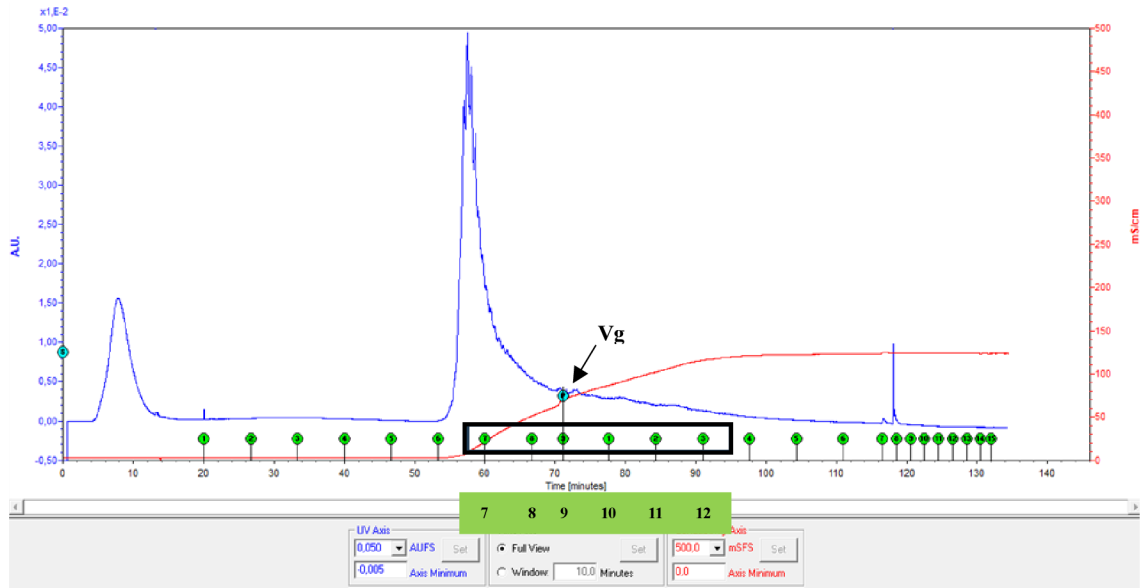
### 4.3.3 Typ elúcie

Prvým typom elúcie bol lineárny gradient 0 %-100 % eluč. pufru pri prietoku  $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  (Obr. 21, kap. 4.3.1). Z dôvodu snahy o zúženie píku Vg a čo najlepšiu separáciu Vg od menších proteínov s podobným pI (najmä proteínový pás v oblasti okolo 70 kDa) bolo testované spomalenie prietoku na  $0,3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  s využitím lineárneho gradientu 0 %-100 % eluč. pufru (Obr. 25), alebo kroková elúcia (koncentrácia eluč. pufru 60 %, 70 %, 80 %, 90 % a 100 %, dĺžka každého kroku 8 ml) (Obr. 26).

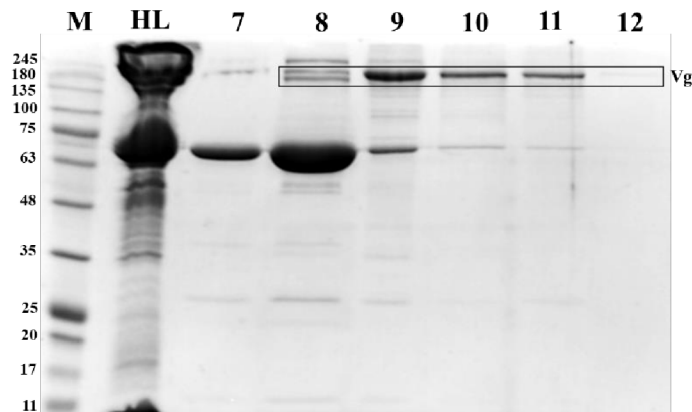
Prietok po nanesení vzorky ostal nezmenený ( $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Pufrová zostava bola TEA/HCl (pH 8), elúcia soľným gradientom. Na kolónu bolo nanesených  $100 \mu\text{l}$   $10\times$  riedenej HL zimnej včely v ekv. pufrí.

Výsledok neposkytol očakávané zlepšenie purifikácie. Znížený prietok síce pomohol zúžiť pík, avšak zhoršil separáciu Vg od proteínov v oblasti okolo 70 kDa. V prípade krokovej elúcie nebola separácia dosiahnutá takmer vôbec. Z tohto dôvodu bol pre optimálne podmienky purifikácie zvolený prietok  $0,8 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  pri lineárnom gradiente zvyšovania koncentrácie NaCl.

A.

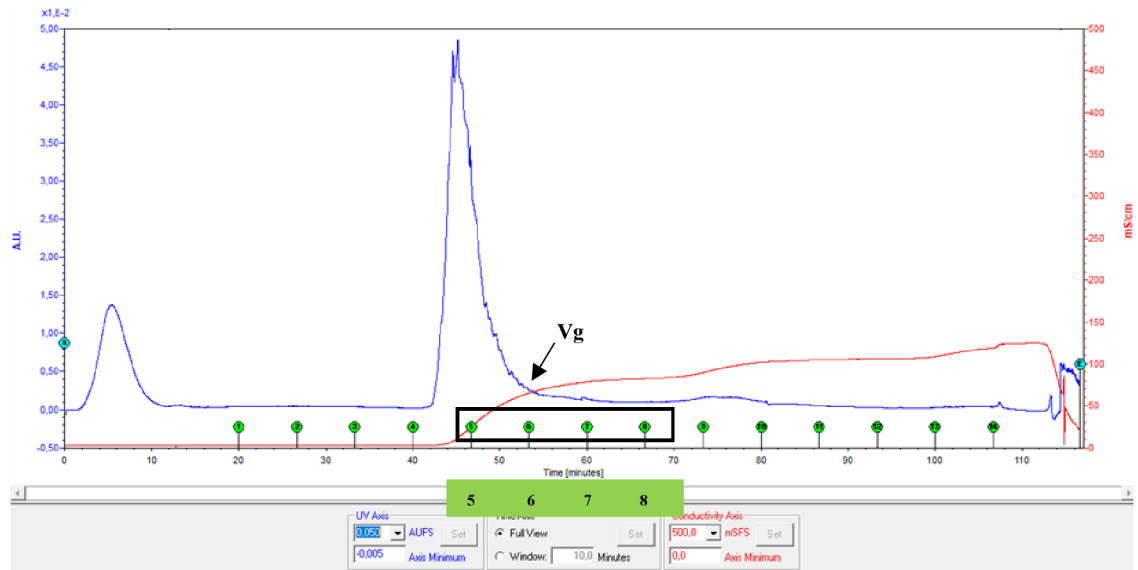


B.

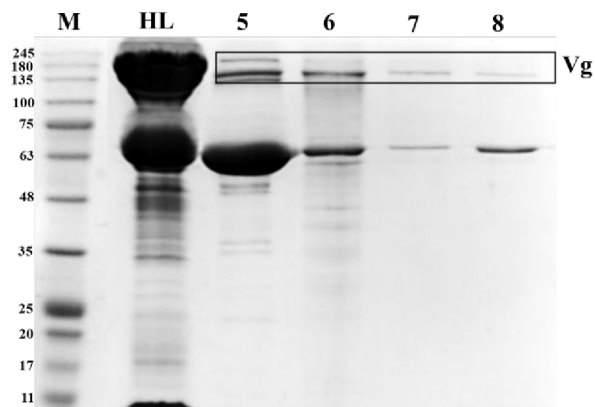


Obr. 25: A. – Chromatogram po nanesení 100  $\mu$ l 10 $\times$  riedenej HL zimných včiel. Ekv. pufor: 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TEA/HCl (pH 8), eluč. pufor: 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TEA/HCl + 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl (pH 8). Elúcia lineárnym gradientom, prietok 0,3  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Frakcie 7-12 (od 60. do 91. min) boli pozbierané po 2 ml (vyznačené v zelenom aj čiernom rámičku). B. – SDS-PAGE (10% gél) frakcií vyznačených na chromatograme. M značí marker molekulovej hmotnosti v kDa, HL je 10 $\times$  riedená hemolymfa zimných včiel v ekv. pufrí (22  $\mu$ g proteínov na jamku) slúžiaca ako kontrola. Čísla korešpondujú s číslami frakcií vyznačených na chromatograme. Do jamky bolo nanášaných 8  $\mu$ l koncentrátu po Amicon Ultra-4 100 kDa. V rámečku je označená 180 kDa oblasť, kde bol detegovaný Vg.

A.



B.



Obr. 26: A – chromatogram po nanesení 100  $\mu$ l 10 $\times$  riedenej HL zimných včiel. Ekv. pufo: 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TEA/HCl (pH 8), eluč. pufo: 30  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  TEA/HCl + 1  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl (pH 8). Kroková elúcia (60 %, 70 %, 80 %, 90 % a 100 % eluč. pufru po 8 ml), prietok 0,3  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Frakcie 5-8 (od 47. do 67. min) boli pozbierané po 2 ml (vyznačené v zelenom aj čiernom rámmiku). B – SDS-PAGE (10% gé) frakcií vyznačených na chromatograme. M značí marker molekulovej hmotnosti v kDa, HL je 10 $\times$  riedená hemolymfa zimných včiel v ekv. pufrí (22  $\mu$ g proteínov na jamku) slúžiaca ako kontrola. Čísla korešpondujú s číslami frakcií vyznačených na chromatograme. Do jamky bolo nanášaných 8  $\mu$ l koncentráty po Amicon Ultra-4 100 kDa. V rámmčku je označená 180 kDa oblasť, kde bol detegovaný Vg.



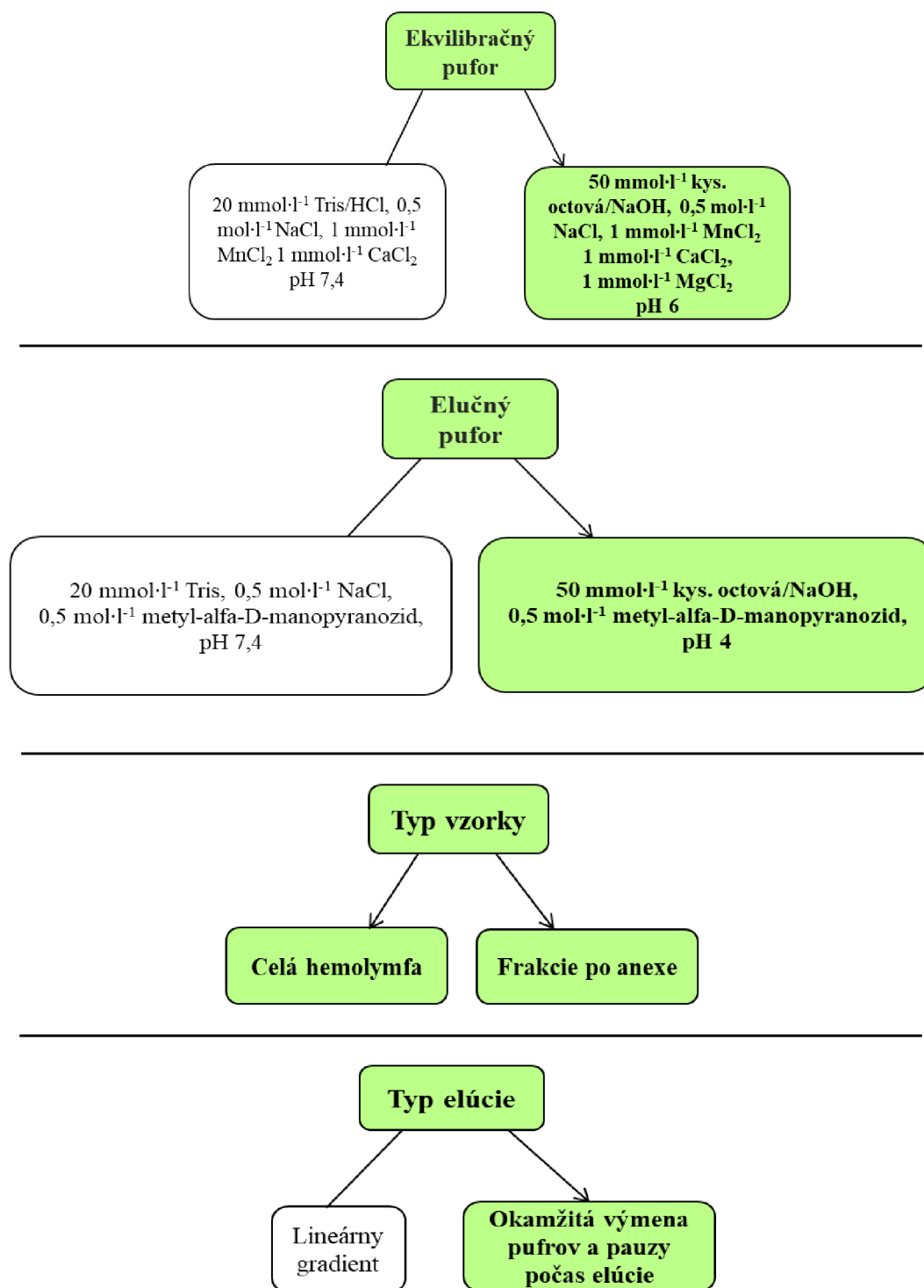
#### **4.3.4 Objem vzorky**

Za optimálny objem vzorky na kolónu bolo zvolených 100  $\mu\text{l}$  10 $\times$  riedenej HL. Toto množstvo bolo používané vo väčšine pokusov, pretože predstavuje ideálny pomer medzi spotrebou vzorky a uspokojujím výsledkom.

V počiatočnom štádiu optimalizácie bolo testované vyššie množstvo vzorky, to však kvôli väčšiemu riedeniu (400  $\mu\text{l}$  100 $\times$  riedenej HL; Obr. 21) nebolo vhodné. Po optimalizácii riedenia už nebolo potrebné ďalej testovať vyššie množstvo nanášanej vzorky. Skúšaný bol tiež menší objem vzorky (50  $\mu\text{l}$  10 $\times$  riedenej HL), avšak proteínové pásy neboli na gély po SDS-PAGE viditeľné.

#### 4.4 Nízko tlaková kvapalinová chromatografia na konkanavalíne A

Prehľadný postup optimalizácie je zhrnutý v nasledovnej schéme (Obr. 28). Jednotlivé kroky sú detailne rozobrané nižšie.



Obr. 27: Diagramy optimalizácie chromatografie na KonA. Zelenou farbou sú zvýraznené podmienky, ktoré boli vyhodnotené ako najlepšie.

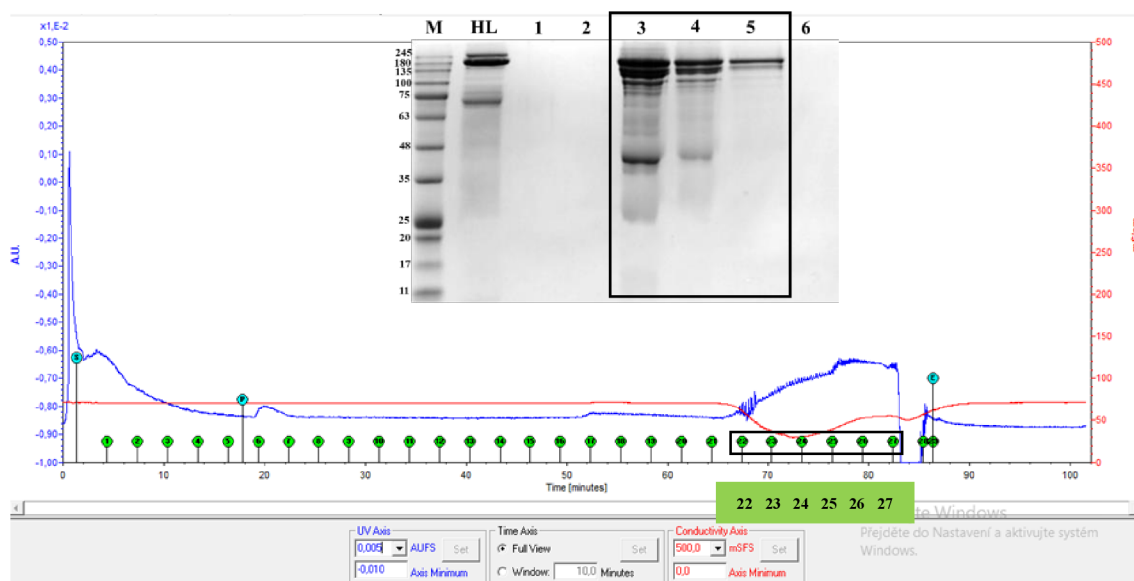
Ako prvé boli testované podmienky uvedené v návode od výrobcu kolónky (Cytiva life sciences HiTrap Con A 4B Instructions for Use, 2.4. 2024), a to Tris pufrová zostava (pH 7,4). Prietok po nanesení vzorky bol vo všetkých pokusoch  $0,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  a elúcia prebiehala pri prietoku  $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Na kolónu boli v prvom pokuse nanesené frakcie s obsahom Vg po IEX, kde bola purifikovaná HL matky optimalizovaným postupom. Objem nanášanej vzorky bol  $100 \mu\text{l}$ , riedenie  $2 \times$  ekv. pufrom. Frakcie pozbierané po chromatografii na KonA boli spojené dokopy vždy 1+1, pretože cieľom bolo overiť, či je uvedeným postupom možné získať detekovateľné množstvo proteínov (Obr. 29).

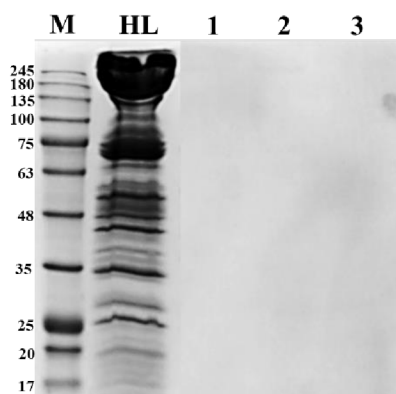
Keďže v predchádzajúcom pokuse nebola detekcia proteínov na gély úspešná (pravdepodobne kvôli nízkej koncentrácii proteínov), postup bol zopakovaný so vzorkou o vyššej koncentrácii. Na anex bola nanesená HL matky riedená  $2 \times$  ekv. pufrom. Získané frakcie s obsahom Vg boli zmiešané dokopy,  $2 \times$  zriedené ekv. pufrom pre KonA a  $100 \mu\text{l}$  takto pripravenej vzorky bolo nanesených na kolónu. Elúcia bola zmenená z gradientovej na okamžitú výmenu pufru za 100 % eluč.. Počas elúcie boli aplikované 10 min pauzy (v 65., 75. a 90. minúte). Ako kontrola bola na géloch použitá  $100 \times$  riedená HL zimnej včely z dôvodu momentálneho nedostatku vzorky matky, avšak pravdepodobne sa jednalo o chybnú vzorku HL, nakoľko na gély nie sú viditeľné proteínové pásy. Na základe výsledku (Obr. 30) je zrejmé, že pauzy počas elúcie výrazne pomohli desorbcií proteínov z KonA kolóny. Pomocou uvedenej zostavy však nedošlo k dostatočnej separácii proteínov a na gély po SDS-PAGE boli viditeľné proteínové pásy v celom rozsahu kDa.

V ďalšom kroku bola testovaná sústava octanových pufov podľa článku od Soper & Aird (2007). Na kolónu bolo nanesených  $100 \mu\text{l}$   $10 \times$  zriedenej HL zimnej včely. Počas elúcie boli opäť aplikované 10 min pauzy v 58., 68., 78., 93., a 98. minúte. V píku eluovanom od 90. do približne 95. minúty detegovaný takmer samostatný proteínový pás v oblasti 180 kDa, čo by pravdepodobne mohol byť Vg. Silné proteínové pásy v oblasti Vg sa však nachádzajú vo frakciách 4-6, kde je prítomné tiež veľké množstvo iných proteínov, a teda nedošlo k optimálnej separácii (Obr. 31).

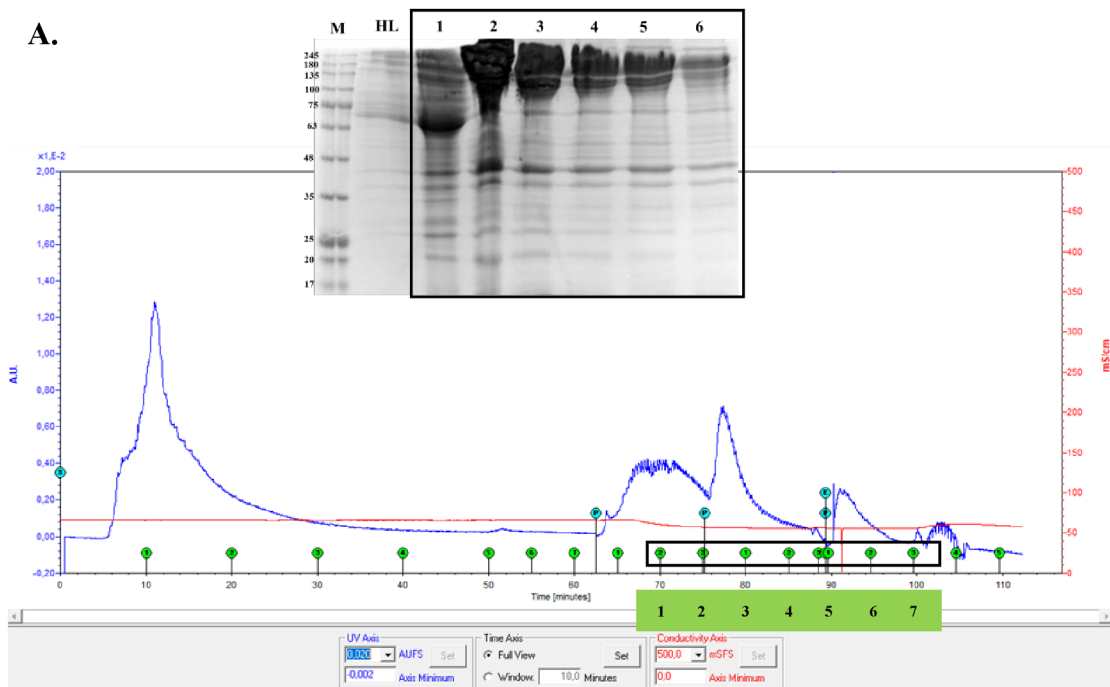
A.



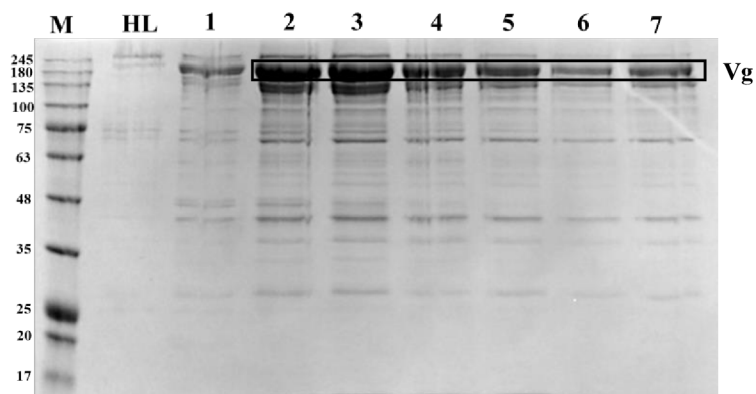
B.



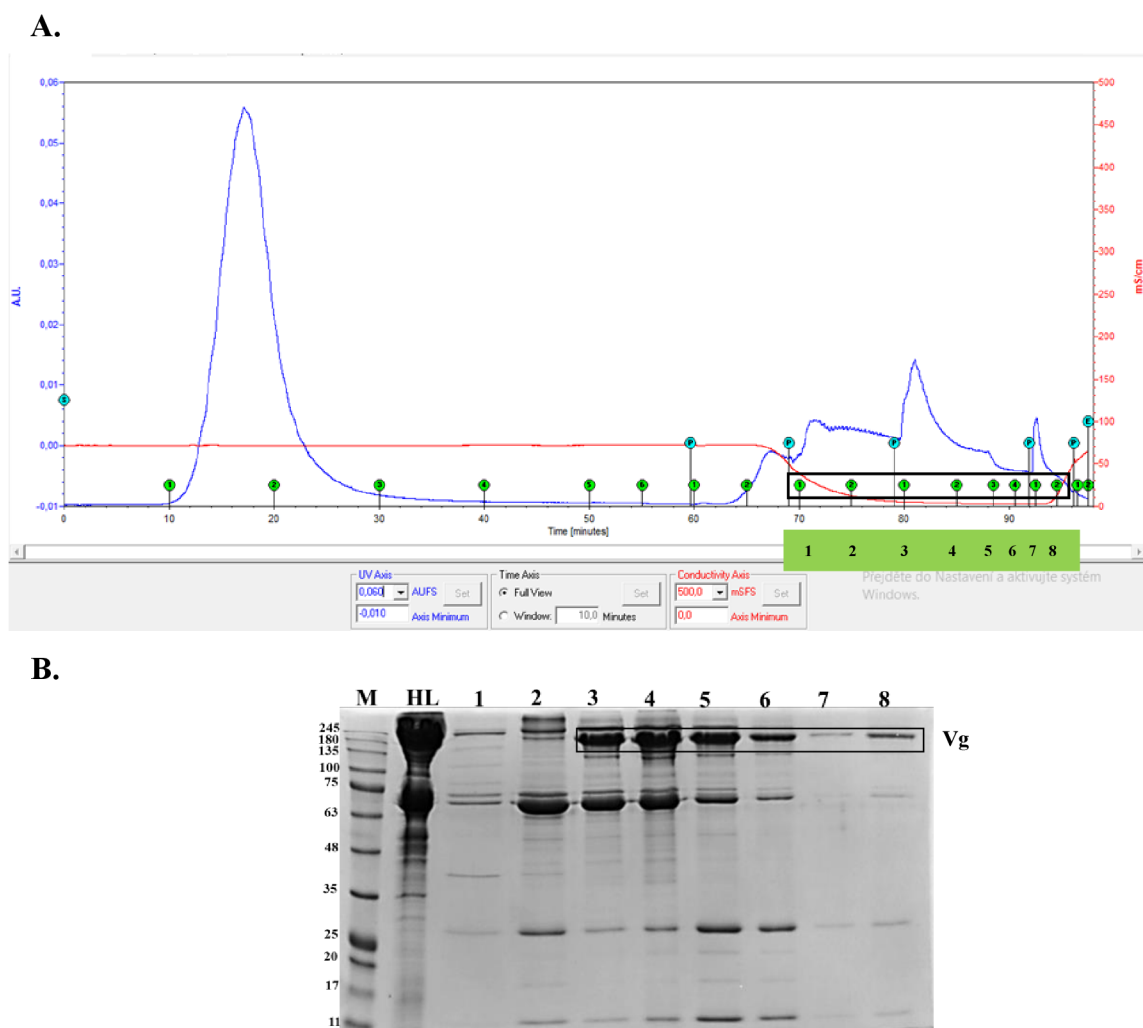
Obr. 28: A – Chromatogram po nanesení 100  $\mu\text{l}$  2 $\times$  riedenej vzorky ekv. pufrom (frakcie 3, 4 a 5 po IEX vyznačné na gély v rámičku). Ekv. pufo: 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris/HCl, 0,5  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl, 1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{MnCl}_2$  1  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$  (pH 7,4); eluč. pufo: 20  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  Tris, 0,5  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl, 0,5  $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  metyl- $\alpha$ -D-manopyranozid (pH 7,4). HL je 10 $\times$  riedená hemolymfa matky v TEA/HCl slúžiaca ako kontrola. Frakcie 22-27 (od približne 67. do 82. min) boli pozbierané po 2 ml (vyznačené v čiernom aj zelenom rámičku). B. – SDS-PAGE (10% gél) frakcií vyznačených na chromatograme. HL je 10 $\times$  riedená hemolymfa matky v eluč. pufo (48  $\mu\text{g}$  proteínov na jamku) slúžiaca ako kontrola. Čísla značia frakcie vyznačené na chromatograme spojené dokopy vždy 1+1: 1 (22+23), 2 (24+25), 3 (26+27). Do jamky bolo nanášaných 8  $\mu\text{l}$  koncentrátu po Amicon Ultra-4 100 kDa. M na oboch obrázkoch značí marker molekulovej hmotnosti v kDa.



**B.**



Obr. 29: A – chromatogram po nanesení 100  $\mu$ l 2 $\times$  riedenej vzorky ekv. pufrom (frakcie 1-6 po IEX vyznačné na gély v rámciku). Ekv. pufor: 20 mmol $\cdot$ l $^{-1}$  Tris/HCl, 0,5 mol $\cdot$ l $^{-1}$  NaCl, 1 mmol $\cdot$ l $^{-1}$  MnCl $_2$  1 mmol $\cdot$ l $^{-1}$  CaCl $_2$  (pH 7,4); eluč. pufor: 20 mmol $\cdot$ l $^{-1}$  Tris, 0,5 mol $\cdot$ l $^{-1}$  NaCl, 0,5 mol $\cdot$ l $^{-1}$  metyl- $\alpha$ -D-manopyranozid (pH 7,4). HL je 100 $\times$  riedená hemolymfa zimnej včely v PBS a TEA/HCl (2  $\mu$ g proteínov na jamku) slúžiaca ako kontrola. Frakcie 1-7 (od približne 70. do 100. min) boli pozbierané po 2 ml (vyznačené v zelenom aj čiernom rámciku). B. – SDS-PAGE (10% gél) frakcií vyznačených na chromatograme. HL je 100 $\times$  riedená hemolymfa zimnej včely v PBS a eluč. pufri (2  $\mu$ g proteínov na jamku) slúžiaca ako kontrola. Číslo značia frakcie vyznačené na chromatograme. Do jamky bolo nanášaných 8  $\mu$ l koncentráty po Amicon Ultra-4 100 kDa. M na oboch obrázkoch značí marker molekulovej hmotnosti v kDa. V rámcíku je označená 180 kDa oblasť, kde bol detegovaný Vg.

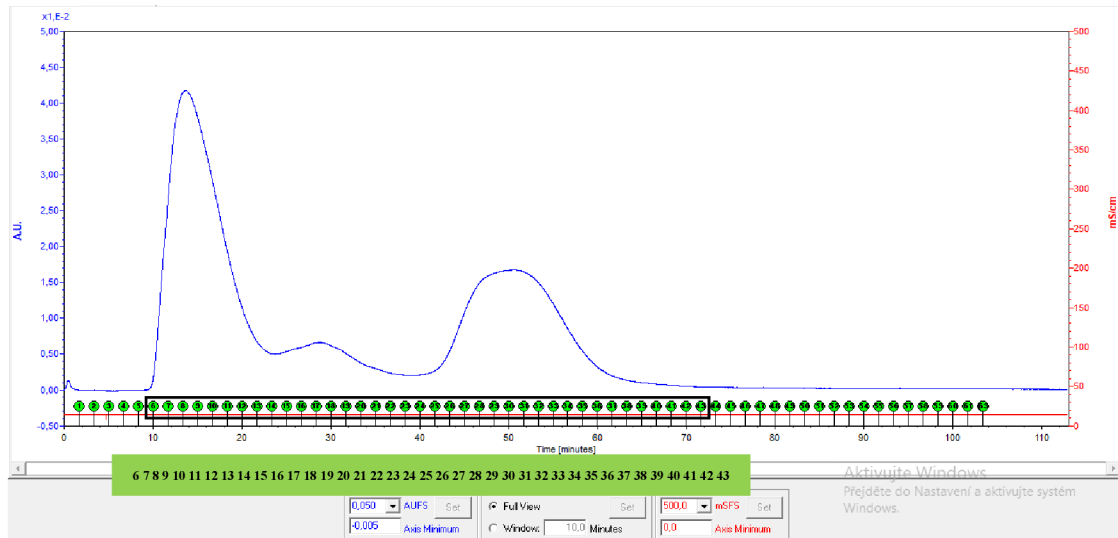


Obr. 30: A – chromatogram po nanesení 100  $\mu$ l 10 $\times$  riedenej HL zimnej včely ekv. pufrom Ekv. pufor: 50 mmol $\cdot$ l $^{-1}$  kyselina octová/NaOH, 0,5 mol $\cdot$ l $^{-1}$  NaCl, 1 mmol $\cdot$ l $^{-1}$  MnCl $_2$ , 1 mmol $\cdot$ l $^{-1}$  CaCl $_2$ , 1 mmol $\cdot$ l $^{-1}$  MgCl $_2$ , (pH 6); eluč. pufor: 50 mmol $\cdot$ l $^{-1}$  kys. octová/NaOH, 0,5 mol $\cdot$ l $^{-1}$  metyl- $\alpha$ -D-manopyranozid (pH 4). Frakcie 1-8 (od približne 70. do 92. min) boli pozbierané po 2 ml (vyznačené v čiernom aj zelenom rámciku). B – SDS-PAGE (10% gél) frakcií vyznačených na chromatograme. HL je 10 $\times$  riedená hemolymfa zimnej včely v ekv. pufri (22  $\mu$ g proteínov na jamku) slúžiaca ako kontrola. Čísla značia frakcie vyznačené na chromatograme. Do jamky bolo nanášaných 8  $\mu$ l koncentrátu po Amicon Ultra-4 100 kDa. M značí marker molekulovej hmotnosti v kDa. V rámciku je označená 180 kDa oblasť, kde bol detegovaný Vg.

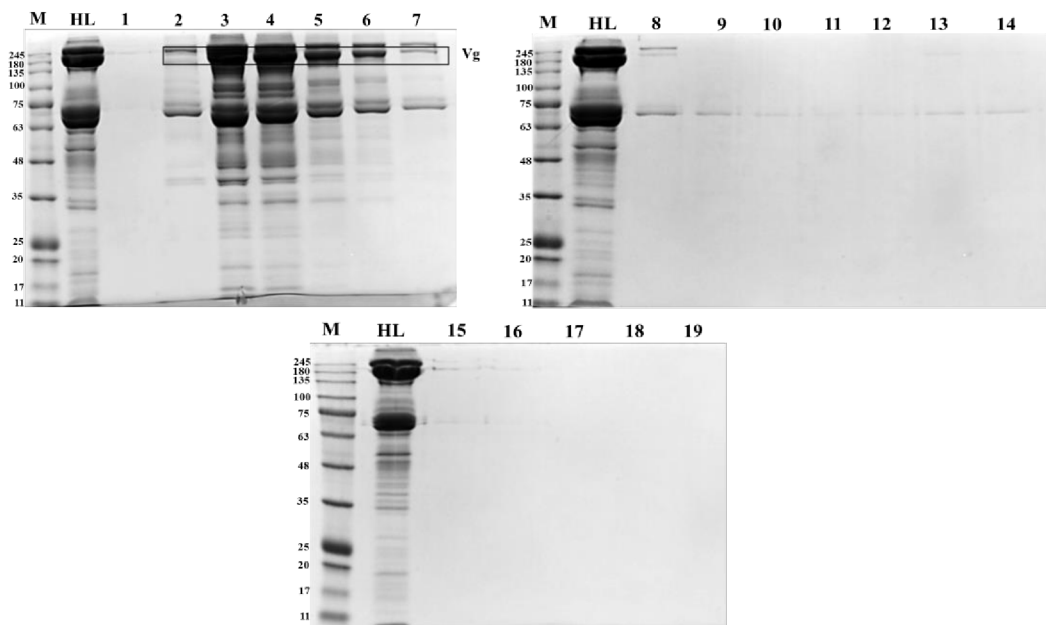
## 4.5 Gélová permeačná chromatografia

GPC bola využitá na separáciu proteínov podľa veľkosti s cieľom odstrániť z HL proteíny s podobným pI, ale nižšou molekulovou hmotnosťou, ako Vg. Na kolónu bolo nanesených 100  $\mu$ l HL zimných včiel o koncentrácii 5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Frakcie boli pre detekciu proteínov na SDS-PAGE spájané vždy 1+1 (Obr. 32).

**A.**



**B.**



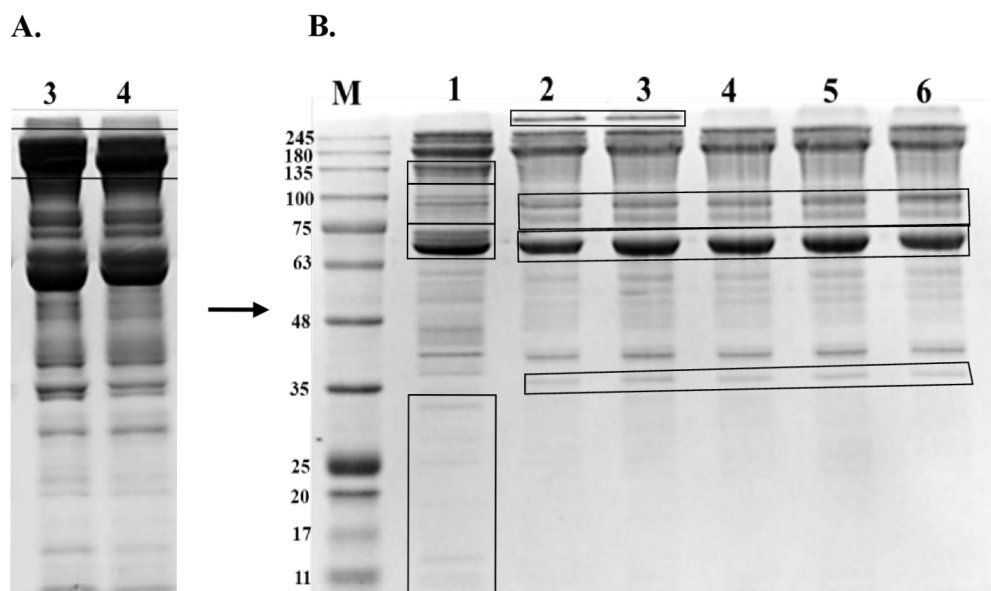
Obr. 31: A – chromatogram po nanosení 100  $\mu$ l HL zimnej včely o koncentrácii 5  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Frakcie 6-43 (od približne 10. do 70. min) boli pozberané po 0,5 ml (vyznačené v čiernom aj zelenom ráme). B – SDS-PAGE (10% gél) frakcií vyznačených na chromatograme. HL je 10 $\times$  riedená hemolymfa zimnej včely v ekv. pufrí (22  $\mu$ g proteínov na jamku) slúžiaca ako kontrola. Čísla značia frakcie vyznačené na chromatograme spojené dokopy vždy 1+1: 1 (6+7), 2 (8+9), 3 (10+11), 4 (12+13), 5 (14+15), 6 (16+17), 7 (18+19), 8 (20+21), 9 (22+23), 10 (24+25), 11 (26+27), 12 (28+29), 13 (30+31), 14 (32+33), 15 (34+35), 16 (36+37), 17 (38+39), 18 (40+41), 19 (42+43). Do jamky bolo nanášaných 8  $\mu$ l koncentráту po Amicon Ultra-4 100 kDa. M značí marker molekulovej hmotnosti v kDa.

Podľa výsledku po SDS-PAGE sa v prvom píku nachádzali proteíny všetkých molekulových hmotností, a teda nedošlo k ich rozdeleniu. Na géloch pre detekciu proteínov vo frakciách 34-43 (vzorky 15-19 na obrázku 32 B.), kde by sa mali nachádzať proteíny s nízkou molekulovou hmotnosťou, nebol zaznamenaný výskyt žiadnych proteínových pásov. To je pravdepodobne spôsobené tým, že po zakoncentrovaní frakcií cez Amicon Ultra-4 100 kDa malé proteíny prešli cez molekulové sito do supernatantu, pričom na gél bol nanášaný zachytený koncentrát.

Pre overenie, či sú všetky proteíny na Obr. 32 B. (gél so vzorkami 1-7, frakcie 6-19) naozaj prítomné v uvedených frakciách, alebo sa jedná o fragmenty vzniknuté redukčnými a denaturačnými podmienkami pri SDS-PAGE, bola prevedená elektroforéza za neredukčných podmienok. Frakcie 10-13 po GPC boli zmiešané dokopy a podrobené denaturácii pri rôznych teplotách bez použitia redukčných činidiel (Obr. 33).

Z výsledku je zrejme že SDS-PAGE podľa Laemmliho spôsobuje na gély vznik vyššieho počtu proteínových pásov. Na rozdiel od neredukovaných vzoriek bol výskyt proteínových pásov detegovaný aj v oblasti pod 35 kDa, čo naznačuje, že sa pravdepodobne jedná o fragmenty väčších proteínov vzniknuté vplyvom redukčných činidiel. V neredukovaných vzorkách denaturovaných pri 22 °C a 37 °C bol zaznamenaný výskyt proteínu nad 245 kDa. Mohol by to byť agregát proteínov, ktoré boli oddelené vplyvom zvýšenej teploty. Iné významné rozdiely medzi jednotlivými aplikovanými teplotami neboli zaznamenané.





Obr. 32: SDS-PAGE za nereducčných podmienok (10% gél) frakcií po GPC. A – vybrané frakcie po GPC použité ako vzorky. B – Gél po SDS-PAGE za nereducčných podmienok (1,5  $\mu\text{g}$  proteínov na jamku). Kontrola (1) bola riedená Laemmliho pufrom, denaturovaná pri 70  $^{\circ}\text{C}$  15 min. Denaturácia za nereducčných podmienok: 22  $^{\circ}\text{C}$  (2); 37  $^{\circ}\text{C}$  (3); 50  $^{\circ}\text{C}$  (4); 70  $^{\circ}\text{C}$  (5); 100  $^{\circ}\text{C}$  (6). M značí marker molekulovej hmotnosti v kDa. V rámčekoch sú znázornené rozdiely medzi kontrolou a nereducovanými vzorkami.

## 5 DISKUSIA

Definícia včelieho Vg ako čisto žltkového proteínu dávno neplatí, pretože jeho výskyt a s tým spojená funkcia je veľmi rozmanitá (Amdam et al. 2004; Corona et al. 2007; Nelson et al., 2007; Havukainen et al. 2013; Wheeler et al., 2013; Salmela et al. 2015; Salmela et al. 2022). Imunochemická detekcia preukázala prítomnosť Vg, prípadne jeho fragmentov vo všetkých analyzovaných častiach zimných včiel, okrem tráviacej sústavy. Doterajšie štúdie boli zamerané zväčša na overenie výskytu Vg v rôznych telových častiach letnej generácie včiel a matiek (okrem HL, kde bol detegovaný aj u zimných včiel) (Erban et al., 2013). Pre následnú purifikáciu Vg bola zvolená HL, ktorá obsahuje v porovnaní s ostatnými analyzovanými telovými časťami pomerne vysokú koncentráciu Vg a zároveň je spomedzi všetkých telových častí ako vzorka najjednoduchšia na spracovanie.

Hemolymfa, ako hlavná transportná tekutina v organizme včiel, predstavuje bohatý zdroj Vg. V HL zimných včiel sa vo všeobecnosti nachádzajú vyššie koncentrácie Vg, ako v HL letných včiel (Fluri et al., 1982). Zo všetkých známych foriem Vg v nej bol detegovaný 180 kDa proteín (Wheeler & Kawooya, 1990). Zaznamenaný bol aj výskyt 150 kDa fragmentu, avšak až po purifikácii, takže je možné, že k štiepeniu došlo vplyvom purifikačného procesu (Wheeler & Kawooya, 1990; Havukainen et al., 2011). V diplomovej práci bol detegovaný výskyt všetkých známych fragmentov vo vzorkách HL matky, 5-dňovej a 9-dňovej letnej včely. U mladušky bola zaznamenaná prítomnosť iba 180 kDa proteínu a v HL zimných včiel bol navyše prítomný 150 kDa fragment. Nie je možné s určitosťou tvrdiť, ktoré fragmenty vznikajú vplyvom SDS-PAGE, a ktoré sú tvorené priamo v organizme včiel. Pre potvrdenie by bola potrebná ďalšia analýza napríklad pomocou porovnania výsledkov natívnej elektroforézy s SDS-PAGE podľa Laemmliho na vzorke purifikovaného Vg, a následnej identifikácie produktov pomocou hmotnostnej spektrometrie.

Prítomnosť Vg v hlavovej časti matiek a krmíčiek bola najskôr detegovaná v článku od Corona et al. (2007). Nepodarilo sa však preukázať Vg priamo v mozgu, jeho výskyt bol obmedzený iba na tukové bunky obklopujúce mozgové tkanivo. Münch et al. (2015) potvrdili prítomnosť aj v rôznych častiach mozgu krmíčiek a hltanových žľazách. Následne bolo dokázané, že v mozgu včiel dochádza k samotnej tvorbe Vg. Expresia Vg v mozgu matiek je niekoľkonásobne vyššia, ako v mozgu letnej generácie včiel a tento jav výrazne ovplyvňuje príslušnosť včiel ku kaste (Zhang et al., 2022). Výskyt Vg

v mozgu zimných včiel v literatúre doposiaľ skúmaný nebol, no potvrdila ho imunochemická detekcia v tejto diplomovej práci. Konkrétne bol detegovaný 180 kDa Vg. Nakoľko však pri pitve nie je možné dôkladne odseparovať tukové bunky obklopujúce mozog, nemožno s určitosťou tvrdiť, či sa detegovaný Vg nachádzal v tukových bunkách, alebo priamo v mozgu. V hlave po odobratí mozgu a hltanových žliaz bol detegovaný 180 kDa aj 150 kDa proteín. Münch et al. (2015) dosiahli podobný výsledok, kedy v mozgu detegovali veľmi slabý 150 kDa proteínový pás, no v celej hlave bola intezita 150 kDa Vg viditeľne výraznejšia. Hltanové žľazy krmíčiek obsahovali podobne, ako mozog, iba 180 kDa Vg (Seehuus et al., 2007; Münch et al., 2015). Rovnaký výsledok bol získaný v tejto práci pre zimné včely.

Tukové teliesko je hlavným miestom syntézy Vg. U včiel bola expresia Vg zaznamenaná výhradne v tukových bunkách trofocytov (Wahli, 1988; Corona et al., 2007). V tukovom teliesku letných včiel bola potvrdená prítomnosť 180 kDa, 150 kDa a 40 kDa Vg (Havukainen et al., 2011; Havukainen et al., 2013). V tukovom teliesku zimných včiel sa rovnako podarilo preukázať všetky tri formy Vg a navyše boli po imunochemickej detekcii pozorované proteínové pásy v oblasti približne 75-100 kDa. Mohlo by sa jednať o ďalšie fragmenty Vg, pri ktorých opäť nemožno s určitosťou tvrdiť, či sú prítomné v organizme včiel, alebo vznikajú v procese spracovania vzorky. Prítomnosť slabého signálu po detekcii Vg v zadočku po pitve mohla byť spôsobená nedostatočným odstránením tukového telieska. Rovnako sa vyskytoval Vg v hrudníku pravdepodobne kvôli HL, ktorá z hrudníka nebola odstránená.

Postup purifikácie včelieho Vg bol zverejnený v niekoľkých článkoch. Wheeler & Kawooya (1990) ako prví publikovali purifikáciu Vg z HL včelích matiek pozostávajúcu z ultracentrifugácie pre rozdelenie proteínov podľa veľkosti, a z chromatografie na anexe s fosfátovou sústavou pufrův a elúciou NaCl gradientom. Pre získanie finálneho produktu využili chromatografiu na KonA. Havukainen et al. (2011) purifikovali Vg z HL zimných robotníc odoberanej do PBS s inhibítormi proteáz (riedenie 10×). Autori sa inšpirovali článkom od Wheeler & Kawooya (1990), ale vynechali ultracentrifugáciu a z ionexovej chromatografie pozbierali iba frakcie bez apolipoporfínu a hexamerínov. Tieto proteíny sú spolu s Vg najviac zastúpené v HL včiel (Isani et al., 2023). Purifikácia Vg v diplomovej práci vychádzala najmä z článku od Leipart et al. (2022b), kde autori využili iba ionexovú chromatografiu na kolónke naplnenej silným anexom (HiTrap Q FF; 1 ml). Na kolónu nanášali HL včiel zriedenú 1:10 ekv. pufrům (0,5 mol·l<sup>-1</sup> Tris/HCl; pH 7,6). Ako eluč. pufr použili 0,5 mol·l<sup>-1</sup>

Tris/HCl + 0,45 mol·l<sup>-1</sup> NaCl (pH 7,6). Frakcie z píku eluovaného pri konduktivite 15-22 mS·cm<sup>-1</sup> zakoncentrovali pomocou Amicon Ultracell 100 kDa a úspešnosť purifikácie overovali vo všetkých uvedených článkoch pomocou SDS-PAGE.

Z dôvodu dostupnosti, možnosti lepšieho rozlíšenia a separácie jednotlivých proteínov s podobným pI bola v diplomovej práci použitá kolónka naplnená slabým anexom (HiTrap ANX Sepharose FF, 1 ml, Cytiva). Nakoľko pufrová zostava inšpirovaná článkom od Leipart et al. (2022b) neposkytla požadovaný výsledok, podmienky pre slabý anex boli optimalizované na použitie TEA (pH 8) zostavy. TEA pufor bol zvolený na základe odporúčania výrobcu (Cytiva life sciences HiTrap ANX Sepharose FF Instructions for Use, 2.4. 2024). Elúciou lineárnym gradientom NaCl pri prietoku 0,8 ml·min<sup>-1</sup> sa podarilo Vg čiastočne purifikovať z HL zimných včiel a matiek. Testovaná bola aj elúcia gradientom pH v kombinácii s gradientom NaCl, nakoľko literatúra uvádza, že Vg je fosforylovaný (Havukainen et al. 2011), preto je pravdepodobné, že sa na kladne nabitý sorbent v kolónke viaže s pomerne vysokou afinitou. Elúcia zmenou pH je pre slabý anex náročnejšia na prevedenie, pretože sorbent je na zmeny pH citlivejší a ustanovenie rovnováhy náboja v závislosti na pH dlhšie trvá. Môže však pri správnom nastavení pomôcť lepšiemu rozlíšeniu (Schmidt et al., 2014). V tejto práci bola ako optimálna vyhodnotená elúcia bez zmeny pH, pretože v rámci testovaných podmienok nebol zaznamenaný výrazný rozdiel v separácii pH a soľným gradientom. Pre vyladenie dokonalej separácie by bolo vhodné v budúcnosti otestovať viacero variant pH elúcie.

V priebehu purifikácie na anexe došlo k nečakanému javu, kedy bol po prečistení kolóny pomocou 1 mol·l<sup>-1</sup> NaOH a 2 mol·l<sup>-1</sup> NaCl zaznamenaný výskyt niekoľkonásobne nižšieho obsahu proteínov. V prípade, že bola kolóna použitá viac krát po sebe bez prečistenia (kap. 4.3.1), výsledkom po optimalizácii podmienok bol výskyt proteínových pásov v celom rozsahu kDa (Obr. 20, Obr. 21). Rovnako bol detegovaný pomerne intenzívny pás v oblasti 180 kDa, ktorý predstavuje Vg. Naopak, po prečistení kolóny sa intenzita a prítomnosť jednotlivých proteínov rapidne znížila (kap. 4.3.2) a detegovaný bol najmä proteín v oblasti medzi 60 – 80 kDa. Vg (180 kDa) bol viditeľný len veľmi slabou (Obr. 23, Obr. 24). Vysvetlenie tohto javu poskytuje teória, podľa ktorej po niekoľkonásobnom použití na kolóne aj napriek dôkladnému premytiu eluč. pufrom ostanú naviazané proteíny s vysokou afinitou k sorbentu. Tie potom čiastočne znižujú väzobnú kapacitu matrice, čo môže byť žiaduce práve v prípade, ak proteín záujmu vykazuje voči sorbentu v kolóne silnú väzbovosť. Teóriu podporuje štúdia (Xu &

Regnier, 1998), ktorej záverom je, že intenzitu chromatografickej separácie do veľkej miery ovplyvňujú proteíny silne viazané v kolóne.

Spolu s Vg sa takmer vždy vyskytovali na gély po SDS-PAGE proteínové pásy v oblasti okolo 70 kDa. S najväčšou pravdepodobnosťou sa jedná o Hex70a s podobným pI ( $M_w$  približne 81 kDa, pI 6,46; Expasy, 8.4. 2024). Proteínový pás je síce nižšie, ako 81 kDa, to však môže byť spôsobené anomálnou migráciou proteínového štandardu, prípadne neúplnou denaturáciou vzoriek, či nedostatočnou väzbou detergentu na proteín (Dolnik & Gurske, 2011).

Podľa očakávaní by mali byť proteíny s molekulovou hmotnosťou pod 100 kDa odseparované pomocou Amicon Ultra-4 100-kDa. Avšak na géloch po SDS-PAGE bolo často zaznamenané vysoké zastúpenie proteínov pod 100 kDa. Jedným z možných vysvetlení sú redukčné podmienky SDS-PAGE podľa Laemmliho, kedy pravdepodobne dochádza k štiepeniu väčších proteínov na fragmenty, prípadne oddeleniu proteínových agregátov. Riešením otázky, ktoré proteínové pásy po klasickej SDS-PAGE vznikajú štiepením primárnej štruktúry proteínov, a ktoré prislúchajú odseparovaným agregátom, by mohla byť elektroforéza za neredukčných podmienok. Výhodou tejto metódy je, že pri zvolení správnych podmienok dochádza iba k oddeleniu nekovalentne viazaných polypeptidových reťazcov (vd'aka prítomnosti SDS a denaturácii teplom), ale disulfidové väzby v primárnej štruktúre ostávajú zachované. Na rozdiel od natívnej elektroforézy je vzdialenosť proteínu v matrici stále úmerná hmotnosti proteínu, avšak čiastočne závisí aj na tvare a stupni denaturácie proteínu (Pickles et al., 2014; Kirley & Norman, 2018). Ďalším možným riešením by mohla byť izoeletrická fokusácia, pomocou ktorej je možné overiť, koľko proteínov sa vo vzorke nachádza na základe odlišnosti izoelektrického bodu.

Pre finálne prečistenie produktu bola podľa článkov od Wheeler & Kawooya (1990) a Havukainen et al. (2011) využitá KonA chromatografia. Pufrová zostava bola optimalizovaná na octanovú a počas elúcie boli aplikované 10 min pauzy (podľa Soper & Aird, 2007), vd'aka čomu sa podarilo z kolóny eluovať silne naviazané glykoproteíny, ku ktorým na základe výsledkov patrí aj Vg. Purifikácia Vg na KonA nebola dokončená z časových dôvodov. V ďalšom postupe by bolo vhodné zamerať sa na optimalizáciu doby elúcie, pretože v uvedených pokusoch bola elúcia pravdepodobne krátka na desorbciu všetkých naviazaných proteínov. Rovnako je potrebné optimalizovať vhodné množstvo proteínov aplikovaných na kolónu.

Ďalším alternatívnym spôsobom hrubého prečistenia Vg od iných abundantných proteínov v HL by mohla byť GPC. V literatúre je použitie GPC udávané najmä pri purifikácii Vg z krvi rýb (Fukada et al., 2003; Liu et al., 2009). Havukainen et al. (2011) použili GPC ako prvý krok purifikácie Vg z tukového telieska, ktoré obsahuje väčšie zastúpenie proteínov, ako HL. V tejto diplomovej práci bola testovaná GPC na vzorke HL zimných včiel, avšak separácia proteínov podľa veľkosti nebola dostatočná a z časových dôvodov nebola optimalizácia dokončená. V ďalšom kroku by bolo vhodné otestovať inú maticu, prípadne zmeniť koncentráciu soli v použitom pufri. Pre overenie, ktoré proteínové pásy na gély po SDS-PAGE sa vyskytujú v pozbieraných frakciách, a ktoré vznikajú vplyvom redukčných podmienok, bola využitá práve vyššie spomínaná elektroforéza za neredukčných podmienok. Výsledok preukázal, že vplyvom redukčných podmienok dochádza k fragmentácii väčších proteínov.

Rôznorodé vlastnosti Vg sú dané, okrem iného, tiež jeho schopnosťou interagovať s veľkým množstvom molekúl. Na základe štruktúry bola preukázaná väzba lipidov (Havukainen et al., 2011; Havukainen et al. 2013; Leipart et al., 2022b), niektorých esenciálnych iónov (Amdam et al. 2004, Leipart et al. 2022a), či DNA (Salmela et al. 2022). Interakcie proteín-proteín zatiaľ preskúmané neboli, avšak s ohľadom na komplexnosť funkcií a štruktúry Vg je možné predpokladať, že by mohol tvoriť agregáty s inými proteínmi v HL. Vďaka štruktúrnej podobnosti Vg s apolipoproteínmi je pravdepodobnosť interakcie s týmito proteínmi vysoká (Babin et al., 1999; Mann et al. 1999; Van der Horst & Rodenburg, 2010). To by teoreticky vysvetľovalo prítomnosť viacerých proteínových pásov po purifikácii na géloch po SDS-PAGE. Pre overenie interakcie včelieho apolipoporfínu a Vg je však potrebná komplexnejšia analýza. Pomôcť by mohlo využitie tandemovej afinitnej purifikácie spojenej s hmotnostnou spektrometriou, koimunoprecipitácie, spektroskopie nukleárnej magnetickej rezonancie, či komplexné teoretické porovnanie štruktúr (Rao et al., 2014).

Purifikačný protokol Vg pomocou nízkotlakovej kvapalinovej chromatografie bol do veľkej miery optimalizovaný. Pre finalizáciu by bolo vhodné dokončiť zavedenie GPC chromatografie a KonA chromatografie do postupu. Zároveň sa na základe výsledkov diplomovej práce naskytujú nové otázky ohľadom interakcie Vg s inými proteínmi, prípadne jeho štiepenia na viacero fragmentov, čo môže slúžiť ako podklad pre ďalší výskum.

## 6 ZÁVER

Témou diplomovej práce je proteín vitellogenín, jeho štruktúra a funkcie, ktoré zohráva v organizme včely medonosnej. Teoretická časť predstavuje súhrn poznatkov o Vg hmyzu s detailným popisom funkcií u včiel. Záver teoretickej časti je venovaný prehľadu metód používaných pre purifikáciu Vg. Cieľom praktickej časti bola detekcia Vg v rôznych telových častiach zimných včiel a jeho následná purifikácia z HL pomocou nízkotlakovej kvapalinovej chromatografie.

Vg a jeho fragmenty boli detegované imunochemicky pomocou optimalizovaného protokolu. Výsledok potvrdil prítomnosť Vg v HL, mozgu, hltanových žľazách, hlave, hrudníku a tukovom teliesku zimných včiel. V doterajších štúdiách boli na detekciu Vg v rôznych telových častiach používané letné včely, prípadne matky, preto jeho výskyt v odlišných telových častiach zimných včiel predstavuje nové poznatky. Pre purifikáciu bola následne využitá HL, ktorá vďaka nízkej náročnosti na spracovanie a vysokej koncentrácii Vg slúži ako najvhodnejší materiál spomedzi ostatných telových častí. Optimalizovaná bola purifikácia na kolónke naplnenej slabým anexom (HiTrap ANX Sepharose FF, 1 ml, Cytiva). Najideálnejší výsledok bol dosiahnutý s využitím 10× riedenej HL zimnej včely odoberanej do malého množstva PTU, ekv. pufrum 30 mmol·l<sup>-1</sup> TEA/HCl a eluč. pufrum 30 mmol·l<sup>-1</sup> TEA/HCl + 1 mol·l<sup>-1</sup> NaCl. Elúcia Vg prebiehala pri prietoku 0,8 ml·min<sup>-1</sup> lineárnym gradientom. Pre finálne prečistenie získaného produktu bola optimalizovaná afinitná chromatografia na konkanavalíne A. Z testovaných podmienok bol najlepší výsledok dosiahnutý s využitím octanovej sústavy pufrum a aplikovaním 10 min páuz pri elúcii. Optimalizácia však z časových dôvodov nebola dokončená. Posledným testovaným typom chromatografie bola gélová permečná chromatografia, kde bol ako molekulové sito použitý Sephacryl 200 HR. Cieľom bolo oddeliť od Vg v HL proteíny s nižšou molekulovou hmotnosťou a podobným pI, pretože purifikačná zostava anex – KonA používaná v literatúre neposkytla uspokojivý výsledok. Zavedenie metódy však podobne, ako v prípade KonA, nebolo z časových dôvodov dokončené.

Perspektíva ďalšieho postupu pre finalizáciu purifikácie Vg z HL včiel sa javí v optimalizácii gélovej permeačnej chromatografie slúžiacej pre hrubé prečistenie Vg. Získanie finálneho produktu by malo byť dosiahnuté s využitím optimalizovaného postupu pre ionexovú chromatografiu, prípadne dokončením procesu pomocou KonA.

## 7 LITERATÚRA

- Adams, T. S., & Filipi, P. A. (1988). Interaction between juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone, the corpus cardiacum-allatum complex, and the ovaries in regulating vitellogenin levels in the housefly, *Musca domestica*. *Journal of Insect Physiology*, 34(1), 11-19. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(88\)90035-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(88)90035-2)
- Abrisqueta, M., Süren-Castillo, S., & Maestro, J. L. (2014). Insulin receptor-mediated nutritional signalling regulates juvenile hormone biosynthesis and vitellogenin production in the German cockroach. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 49, 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2014.03.005>
- Amdam, G. V., & Omholt, S. W. (2003). The hive bee to forager transition in honeybee colonies: the double repressor hypothesis. *Journal of Theoretical Biology*, 223(4), 451-464. [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(03\)00121-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(03)00121-8)
- Amdam, G. V., Norberg, K., Hagen, A., & Omholt, S. W. (2003). Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1799-1802. <https://doi.org/10.1073/pnas.0333979100>
- Amdam, G. V., Simões, Z. L. P., Hagen, A., Norberg, K., Schröder, K., Mikkelsen, Ø., Kirkwood, T. B. L., & Omholt, S. W. (2004). Hormonal control of the yolk precursor vitellogenin regulates immune function and longevity in honeybees. *Experimental Gerontology*, 39(5), 767-773. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2004.02.010>
- Amdam, G. V., Norberg, K., Page, R. E., Erber, J., & Scheiner, R. (2006). Downregulation of vitellogenin gene activity increases the gustatory responsiveness of honey bee workers (*Apis mellifera*). *Behavioural Brain Research*, 169(2), 201-205. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.01.006>
- Ament, S. A., Corona, M., Pollock, H. S., & Robinson, G. E. (2008). Insulin signaling is involved in the regulation of worker division of labor in honey bee colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), 4226-4231. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800630105>
- Ament, S. A., Chan, Q. W., Wheeler, M. M., Nixon, S. E., Johnson, S. P., Rodriguez-Zas, S. L., Foster, L. J., & Robinson, G. E. (2011). Mechanisms of stable lipid loss in a social insect. *Journal of Experimental Biology*, 214(22), 3808-3821. <https://doi.org/10.1242/jeb.060244>
- Azevedo, D. O., de Paula, S. O., Zanuncio, J. C., Martinez, L. C., & Serrão, J. E. (2015). Juvenile hormone downregulates vitellogenin production in *Ectatomma tuberculatum* (Hymenoptera: Formicidae) sterile workers. *Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1242/jeb.127712>
- Babin, P. J., Bogerd, J., Kooiman, F. P., Van Marrewijk, W. J. A., & Van der Horst, D. J. (1999). Apolipoprotein II/I, Apolipoprotein B, Vitellogenin, and Microsomal Triglyceride Transfer Protein Genes Are Derived from a Common Ancestor. *Journal of Molecular Evolution*, 49(1), 150-160. <https://doi.org/10.1007/PL00006528>
- Badisco, L., Claeys, I., Van Hiel, M., Clynen, E., Huybrechts, J., Vandersmissen, T., Van Soest, S., Vanden Bosch, L., Simonet, G., & Vanden Broeck, J. (2008). Purification and characterization of an insulin-related peptide in the desert locust, *Schistocerca gregaria*: immunolocalization, cDNA cloning, transcript profiling and interaction with neuroparsin. *Journal of Molecular Endocrinology*, 40(3), 137-150. <https://doi.org/10.1677/JME-07-0161>
- Badisco, L., Van Wielendaele, P., & Vanden Broeck, J. (2013). Eat to reproduce: a key role for the insulin signaling pathway in adult insects. *Frontiers in Physiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00202>
- Barr, P. J. (1991). Mammalian subtilisins: The long-sought dibasic processing endoproteases. *Cell*, 66(1), 1-3. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90129-M](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90129-M)
- Bell, W. J. (1970). Demonstration and characterization of two vitellogenic blood proteins in *Periplaneta americana*: An immunochemical analysis. *Journal of Insect Physiology*, 16(2), 291-299. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(70\)90171-X](https://doi.org/10.1016/0022-1910(70)90171-X)
- Boyd, W. C. (1963). The Lectins: Their Present Status. *Vox Sanguinis*, 8(1), 1-32. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.1963.tb04146.x>



- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brawand, D., Wahli, W., Kaessmann, H., & Phillippe, H. (2008). Loss of Egg Yolk Genes in Mammals and the Origin of Lactation and Placentation. *PLoS Biology*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060063>
- Broughton, S. J., Piper, M. D. W., Ikeya, T., Bass, T. M., Jacobson, J., Drieger, Y., Martinez, P., Hafen, E., Withers, D. J., Leivers, S. J., & Partridge, L. (2005). Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(8), 3105-3110. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405775102>
- Brown, M. R., Clark, K. D., Gulia, M., Zhao, Z., Garczynski, S. F., Crim, J. W., Suderman, R. J., & Strand, M. R. (2008). An insulin-like peptide regulates egg maturation and metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5716-5721. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800478105>
- Buisine, N., Trichet, V., & Wolff, J. (2002). Complex evolution of vitellogenin genes in salmonid fishes. *Molecular Genetics and Genomics*, 268(4), 535-542. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0771-5>
- Cardoso-Júnior, C. A. M., Oldroyd, B. P., & Ronai, I. (2021). Vitellogenin expression in the ovaries of adult honeybee workers provides insights into the evolution of reproductive and social traits. *Insect Molecular Biology*, 30(3), 277-286. <https://doi.org/10.1111/imb.12694>
- Ciudad, L., Piulachs, M. -D., & Bellés, X. (2006). Systemic RNAi of the cockroach vitellogenin receptor results in a phenotype similar to that of the *Drosophila* yolkless mutant. *The FEBS Journal*, 273(2), 325-335. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.05066.x>
- Corona, M., Velarde, R. A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A., & Robinson, G. E. (2007). Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 7128-7133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701909104>
- Cytiva life sciences HiTrap ANX Sepharose FF Instructions for Use. <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-11443-pdf> (2.4.2024).
- Cytiva life sciences HiTrap ConA 4B Instructions for Use. <https://cdn.cytivalifesciences.com/api/public/content/digi-14384-pdf> (2.4.2024).
- Danty, E., Arnold, G., Burmester, T., Huet, J. -C., Huet, D., Pernollet, J. -C., & Masson, C. (1998). Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(5-6), 387-397. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(98\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(98)00011-3)
- Derewenda, Z., Yariv, J., Helliwell, J. R., Kalb, A. J., Dodson, E. J., Papiz, M. Z., Wan, T., & Campbell, J. (1989). The structure of the saccharide-binding site of concanavalin A. *The EMBO Journal*, 8(8), 2189-2193. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08341.x>
- Dhadialla, T. S., Hays, A. R., & Raikhel, A. S. (1992). Characterization of the solubilized mosquito vitellogenin receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 22(8), 803-816. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(92\)90107-P](https://doi.org/10.1016/0965-1748(92)90107-P)
- Dinan, L. (2003). *Bioactive Natural Products (Part J)*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1572-5995\(03\)80004-2](https://doi.org/10.1016/S1572-5995(03)80004-2)
- Dohanik, V. T., Gonçalves, W. G., Oliveira, L. L., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2018). Vitellogenin transcytosis in follicular cells of the honeybee *Apis mellifera* and the wasp *Polistes simillimus*. *Protoplasma*, 255(6), 1703-1712. <https://doi.org/10.1007/s00709-018-1260-y>
- Dolnik, V., & Gurske, W. A. (2011). Chemical modification of proteins to improve the accuracy of their relative molecular mass determination by electrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, 32(20), 2893-2897. <https://doi.org/10.1002/elps.201100141>
- Dong, S. -zhang, Ye, G. -yin, Guo, J. -yang, & Hu, C. (2009). Roles of ecdysteroid and juvenile hormone in vitellogenesis in an endoparasitic wasp, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae). *General and Comparative Endocrinology*, 160(1), 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.11.007>

- Edelman, G. M., Cunningham, B. A., Reeke, G. N., Becker, J. W., Waxdal, M. J., & Wang, J. L. (1972). The Covalent and Three-Dimensional Structure of Concanavalin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 69(9), 2580-2584. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.9.2580>
- Engelmann, F. (1979). *Insect Vitellogenin: Identification, Biosynthesis, and Role in Vitellogenesis*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2806\(08\)60051-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2806(08)60051-X)
- Engelmann, F. (1984). *Biosynthesis, Metabolism and Mode of Action of Invertebrate Hormones*. Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-69922-1\\_43](https://doi.org/10.1007/978-3-642-69922-1_43)
- Erban, T., Jedelsky, P. L., & Titera, D. (2013). Two-dimensional proteomic analysis of honeybee, *Apis mellifera*, winter worker hemolymph. *Apidologie*, 44(4), 404-418. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0190-5>
- Expasy*. [https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/) (8.4. 2024).
- Ferenz, H. J. (1993). Yolk protein accumulation in *Locusta migratoria* (R. & F.) (Orthoptera: Acrididae) oocytes. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 22(2-4), 295-314. [https://doi.org/10.1016/0020-7322\(93\)90016-T](https://doi.org/10.1016/0020-7322(93)90016-T)
- Fluri, P., Lüscher, M., Wille, H., & Gerig, L. (1982). Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *Journal of Insect Physiology*, 28(1), 61-68. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(82\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(82)90023-3)
- Franssens, V., Smaghe, G., Simonet, G., Claeys, I., Breugelmans, B., De Loof, A., & Vanden Broeck, J. (2006). 20-Hydroxyecdysone and juvenile hormone regulate the laminarin-induced nodulation reaction in larvae of the flesh fly, *Neobellieria bullata*. *Developmental & Comparative Immunology*, 30(9), 735-740. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.10.010>
- Fukada, H., Fujiwara, Y., Takahashi, T., Hiramatsu, N., Sullivan, C. V., & Hara, A. (2003). Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: purification and development of a simultaneous chemiluminescent immunoassay. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 134(3), 615-623. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00348-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00348-3)
- Gottlieb, T. A., & Wallace, R. A. (1982). Intracellular glycosylation of vitellogenin in the liver of estrogen-stimulated *Xenopus laevis*. *Journal of Biological Chemistry*, 257(1), 95-103. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)68330-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)68330-4)
- Guidugli, K. R., Piulachs, M. -D., BelléS, X., Lourenço, A. P., & Simões, Z. L. P. (2005). Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 59(4), 211-218. <https://doi.org/10.1002/arch.20061>
- Guidugli-Lazzarini, K. R., do Nascimento, A. M., Tanaka, É. D., Piulachs, M. D., Hartfelder, K., Bitondi, M. G., & Simões, Z. L. P. (2008). Expression analysis of putative vitellogenin and lipophorin receptors in honey bee (*Apis mellifera* L.) queens and workers. *Journal of Insect Physiology*, 54(7), 1138-1147. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.04.021>
- Guo, W., Wu, Z., Song, J., Jiang, F., Wang, Z., Deng, S., Walker, V. K., Zhou, S., & Palli, S. R. (2014). Juvenile Hormone-Receptor Complex Acts on Mcm4 and Mcm7 to Promote Polyploidy and Vitellogenesis in the Migratory Locust. *PloS Genetics*, 10(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004702>
- Hagedorn, H. H., & Kunkel, J. G. (1979). Vitellogenin and Vitellin in Insects. *Annual Review of Entomology*, 24(1), 475-505. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.24.010179.002355>
- Hagedorn, H. H., & Judson, C. L. (1972). Purification and site of synthesis of *Aedes aegypti* yolk proteins. *Journal of Experimental Zoology*, 182(3), 367-377. <https://doi.org/10.1002/jez.1401820308>
- Han, C., Chen, E., Shen, G., Peng, Z., Xu, Y., Zhang, H., Liu, H., Zhang, Y., Wu, J., Lin, Y., & Xia, Q. (2017). Vitellogenin receptor selectively endocytoses female-specific and highly-expressed hemolymph proteins in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochemistry and Cell Biology*, 95(4), 510-516. <https://doi.org/10.1139/bcb-2016-0255>
- Hansen, I. A., Attardo, G. M., Park, J. -H., Peng, Q., & Raikhel, A. S. (2004). Target of rapamycin-mediated amino acid signaling in mosquito anautogeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(29), 10626-10631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403460101>
- Hartfelder, K., & Engels, W. (1998). (Císlo 40) *Current Topics in Developmental Biology*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60364-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60364-6)

- Hartfelder, K. (2000). Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 33(2), 157-177. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000200003>
- Harwood, G., & Amdam, G. (2021). Vitellogenin in the honey bee midgut. *Apidologie*, 52(4), 837-847. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00869-3>
- Havukainen, H., Münch, D., Baumann, A., Zhong, S., Halskau, Ø., Krogsgaard, M., & Amdam, G. V. (2013). Vitellogenin Recognizes Cell Damage through Membrane Binding and Shields Living Cells from Reactive Oxygen Species. *Journal of Biological Chemistry*, 288(39), 28369-28381. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.465021>
- Havukainen, H., Halskau, Ø., Skjaerven, L., Smedal, B., & Amdam, G. V. (2011). Deconstructing honeybee vitellogenin: novel 40 kDa fragment assigned to its N terminus. *Journal of Experimental Biology*, 214(4), 582-592. <https://doi.org/10.1242/jeb.048314>
- Havukainen, H., Underhaug, J., Wolschin, F., Amdam, G., & Halskau, Ø. (2012). A vitellogenin polyserine cleavage site: highly disordered conformation protected from proteolysis by phosphorylation. *Journal of Experimental Biology*, 215(11), 1837-1846. <https://doi.org/10.1242/jeb.065623>
- Hrtánková E. (2022): *Antioxidačné funkcie včelieho vitellogenínu*. [Bakalárska práca]. Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.
- Hystad, E. M., Salmela, H., Amdam, G. V., Münch, D., & Lee, B. -L. (2017). Hemocyte-mediated phagocytosis differs between honey bee (*Apis mellifera*) worker castes. *PLOS ONE*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184108>
- Charles, J. -P., Iwema, T., Epa, V. C., Takaki, K., Rynes, J., & Jindra, M. (2011). Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(52), 21128-21133. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116123109>
- Chen, J. S., Sappington, T. W., & Raikhel, A. S. (1997). Extensive Sequence Conservation Among Insect, Nematode, and Vertebrate Vitellogenins Reveals Ancient Common Ancestry. *Journal of Molecular Evolution*, 44(4), 440-451. <https://doi.org/10.1007/PL00006164>
- Chen, M. E., Lewis, D. K., Keeley, L. L., & Pietrantonio, P. V. (2004). cDNA cloning and transcriptional regulation of the vitellogenin receptor from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Molecular Biology*, 13(2), 195-204. <https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00477.x>
- Chinzei, Y., Chino, H., & Wyatt, G. R. (1981). Purification and properties of vitellogenin and vitellin from *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry*, 11(1), 1-7. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(81\)90034-2](https://doi.org/10.1016/0020-1790(81)90034-2)
- Ihle, K. E., Baker, N. A., & Amdam, G. V. (2014). Insulin-like peptide response to nutritional input in honey bee workers. *Journal of Insect Physiology*, 69, 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2014.05.026>
- Ihle, Mutti, Kaftanoglu, & Amdam. (2019). Insulin Receptor Substrate Gene Knockdown Accelerates Behavioural Maturation and Shortens Lifespan in Honeybee Workers. *Insects*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/insects10110390>
- Isani, G., Bellei, E., Rudelli, C., Cabbri, R., Ferlizza, E., & Andreani, G. (2023). SDS-PAGE-Based Quantitative Assay of Hemolymph Proteins in Honeybees: Progress and Prospects for Field Application. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10216. <https://doi.org/10.3390/ijms241210216>
- Jacinto, E., & Hall, M. N. (2003). TOR signalling in bugs, brain and brawn. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(2), 117-126. <https://doi.org/10.1038/nrm1018>
- Janson, J. E. (2011). *Protein purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*. (Tretie vydanie). Wiley.
- Jindra, M., Palli, S. R., & Riddiford, L. M. (2013). The Juvenile Hormone Signaling Pathway in Insect Development. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 181-204. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153700>
- Jing, Y. -P., Wen, X., Li, L., Zhang, S., Zhang, C., & Zhou, S. (2021). The vitellogenin receptor functionality of the migratory locust depends on its phosphorylation by juvenile hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(37). <https://doi.org/10.1073/pnas.2106908118>

- Kirley, T. L., & Norman, A. B. (2018). Unfolding of IgG domains detected by non-reducing SDS-PAGE. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(2), 944-949. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.06.100>
- Kodíček, M., Valentová, O., Hynek, R. (2018). *Biochemie: Chemický pohled na biologický svět* (Druhé vydanie). Vysoká škola chemicko-technologická v Prahe.
- Lauverjat, S., Szollosi, A., & Marcaillou, C. (1984). Permeability of the ovarian follicle during oogenesis in *Locusta migratoria* L. (Insecta, Orthoptera). *Journal of Ultrastructure Research*, 87(3), 197-211. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(84\)80060-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(84)80060-X)
- Lee, S. H., & Kim, Y. H. (2017). Comparative proteome analysis of honey bee workers between overwintering and brood-rearing seasons. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20(3), 984-995. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.07.011>
- Leipart, V., Ludvigsen, J., Kent, M., Sandve, S., To, T. -H., Árnýasi, M., Kreibich, C. D., Dahle, B., & Amdam, G. V. (2022a). Identification of 121 variants of honey bee Vitellogenin protein sequences with structural differences at functional sites. *Protein Science*, 31(7). <https://doi.org/10.1002/pro.4369>
- Leipart, V., Montserrat-Canals, M., Cunha, E. S., Luecke, H., Herrero-Galán, E., Halskau, Ø., & Amdam, G. V. (2022b). Structure prediction of honey bee vitellogenin: a multi-domain protein important for insect immunity. *FEBS Open Bio*, 12(1), 51-70. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13316>
- Leoncini, I., Le Conte, Y., Costagliola, G., Plettner, E., Toth, A. L., Wang, M., Huang, Z., Bécard, J. -M., Crauser, D., Slessor, K. N., & Robinson, G. E. (2004). Regulation of behavioral maturation by a primer pheromone produced by adult worker honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(50), 17559-17564. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407652101>
- Li, M., Mead, E. A., & Zhu, J. (2011). Heterodimer of two bHLH-PAS proteins mediates juvenile hormone-induced gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(2), 638-643. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013914108>
- Liu, Q. -H., Zhang, S. -C., Li, Z. -J., & Gao, C. -R. (2009). Characterization of a pattern recognition molecule vitellogenin from carp (*Cyprinus carpio*). *Immunobiology*, 214(4), 257-267. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2008.10.003>
- Mann, C. J., Anderson, T. A., Read, J., Chester, S. A., Harrison, G. B., Köchl, S., Ritchie, P. J., Bradbury, P., Hussain, F. S., Amey, J. et al (1999). The structure of vitellogenin provides a molecular model for the assembly and secretion of atherogenic lipoproteins. *Journal of Molecular Biology*, 285(1), 391-408. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.2298>
- Martins, J. R., Nunes, F. M. F., Cristino, A. S., Simões, Z. L. P., & Bitondi, M. M. G. (2010). The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. *BMC Molecular Biology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-23>
- Min, K. -J., & Tatar, M. (2006). Restriction of amino acids extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of Ageing and Development*, 127(7), 643-646. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2006.02.005>
- Mouchel, N., Trichet, V., Betz, A., Le Pennec, J. -P., & Wolff, J. (1996). Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene*, 174(1), 59-64. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(96\)00336-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(96)00336-8)
- Münch, D., Ihle, K. E., Salmela, H., & Amdam, G. V. (2015). Vitellogenin in the honey bee brain: Atypical localization of a reproductive protein that promotes longevity. *Experimental Gerontology*, 71, 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.08.001>
- Nelson, C. M., Ihle, K. E., Fondrk, M. K., Page, R. E., Amdam, G. V., & Chittka, L. (2007). The Gene vitellogenin Has Multiple Coordinating Effects on Social Organization. *PLoS Biology*, 5(3), 0673-0677. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062>
- Nilsen, K. -A., Ihle, K. E., Frederick, K., Fondrk, M. K., Smedal, B., Hartfelder, K., & Amdam, G. V. (2011). Insulin-like peptide genes in honey bee fat body respond differently to manipulation of social behavioral physiology. *Journal of Experimental Biology*, 214(9), 1488-1497. <https://doi.org/10.1242/jeb.050393>

- Nose, Y., Min Lee, J., Ueno, T., Hatakeyama, M., & Oishi, K. (1997). Cloning of cDNA for Vitellogenin of the Parasitoid Wasp, *Pimpla nipponica* (Hymenoptera: Apocrita). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(12), 1047-1056. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00091-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00091-X)
- Pamminger, T., Treanor, D., & Hughes, W. O. H. (2016). Pleiotropic effects of juvenile hormone in ant queens and the escape from the reproduction–immunocompetence trade-off. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1822). <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2409>
- Pan, M. L., Bell, W. J., & Telfer, W. H. (1969). Vitellogenic Blood Protein Synthesis by Insect Fat Body. *Science*, 165(3891), 393-394. <https://doi.org/10.1126/science.165.3891.393>
- Park, J. -H., Attardo, G. M., Hansen, I. A., & Raikhel, A. S. (2006). GATA Factor Translation Is the Final Downstream Step in the Amino Acid/Target-of-Rapamycin-mediated Vitellogenin Gene Expression in the Anautogenous Mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(16), 11167-11176. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601517200>
- Parthasarathy, R., & Palli, S. R. (2011). Molecular analysis of nutritional and hormonal regulation of female reproduction in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(5), 294-305. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.01.006>
- PBD: <https://www.rcsb.org/structure/5CNA> (13.12.2023)
- Pickles, J., Rafiq, S., Cochrane, S. A., & Lalljie, A. (2014). In vitro pepsin resistance of proteins: Effect of non-reduced SDS-PAGE analysis on fragment observation. *Toxicology Reports*, 1, 858-870. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.10.008>
- Racioppi, J. V., Gemmill, R. M., Kogan, P. H., Calvo, J. M., & Hagedorn, H. H. (1986). Expression and regulation of vitellogenin messenger RNA in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry*, 16(1), 255-262. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(86\)90104-6](https://doi.org/10.1016/0020-1790(86)90104-6)
- Raikhel, A. S., & Dhadialla, T. S. (1992). Accumulation of Yolk Proteins in Insect Oocytes. *Annual Review of Entomology*, 37(1), 217-251. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.001245>
- Raikhel, A. S., Kokoza, V. A., Zhu, J., Martin, D., Wang, S. -F., Li, C., Sun, G., Ahmed, A., Dittmer, N., & Attardo, G. (2002). Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(10), 1275-1286. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00090-5](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00090-5)
- Raikhel, A. S., & Lea, A. O. (1991). Control of follicular epithelium development and vitelline envelope formation in the mosquito; role of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone. *Tissue and Cell*, 23(4), 577-591. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(91\)90015-L](https://doi.org/10.1016/0040-8166(91)90015-L)
- Rantala, M. J., Vainikka, A., & Kortet, R. (2003). The role of juvenile hormone in immune function and pheromone production trade-offs: a test of the immunocompetence handicap principle. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1530), 2257-2261. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2472>
- Rao, V. S., Srinivas, K., Sujini, G. N., & Kumar, G. N. S. (2014). Protein-Protein Interaction Detection: Methods and Analysis. *International Journal of Proteomics*, 2014, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2014/147648>
- Raught, B., Gingras, A. -C., & Sonenberg, N. (2001). The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(13), 7037-7044. <https://doi.org/10.1073/pnas.121145898>
- Reznick, D. (1985). Costs of Reproduction: An Evaluation of the Empirical Evidence. *Oikos*, 44(2). <https://doi.org/10.2307/3544698>
- Ronnau, M., Azevedo, D. O., Fialho, M. do C. Q., Gonçalves, W. G., Zanuncio, J. C., & Serrão, J. E. (2016). Changes in follicular cells architecture during vitellogenin transport in the ovary of social Hymenoptera. *Protoplasma*, 253(3), 815-820. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0843-0>
- Rosanova, P., Romano, M., Marciano, R., Anteo, C., & Limatola, E. (2002). Vitellogenin precursors in the liver of the oviparous lizard, *Podarcis sicula*. *Molecular Reproduction and Development*, 63(3), 349-354. <https://doi.org/10.1002/mrd.90019>
- Rouillé, Y., Duguay, S. J., Lund, K., Furuta, M., Gong, Q., Lipkind, G., Oliva, A. A., Chan, S. J., & Steiner, D. F. (1995). Proteolytic Processing Mechanisms in the Biosynthesis of

- Neuroendocrine Peptides: The Subtilisin-like Proprotein Convertases. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 16(4), 322-361. <https://doi.org/10.1006/frnc.1995.1012>
- Röller, H., Dahm, K. H., Sweely, C. C., & Trost, B. M. (1967). The Structure of the Juvenile Hormone. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 6(2), 179-180. <https://doi.org/10.1002/anie.196701792>
- Salmela, H., Amdam, G. V., Freitak, D., & Schneider, D. S. (2015). Transfer of Immunity from Mother to Offspring Is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin. *PLOS Pathogens*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005015>
- Sappington, T. W., Hays, A. R., & Raikhel, A. S. (1995). Mosquito vitellogenin receptor: Purification, developmental and biochemical characterization. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 25(7), 807-817. [https://doi.org/10.1016/0965-1748\(95\)00016-0](https://doi.org/10.1016/0965-1748(95)00016-0)
- Sappington, T. W., Kokoza, V. A., Cho, W. L., & Raikhel, A. S. (1996). Molecular characterization of the mosquito vitellogenin receptor reveals unexpected high homology to the Drosophila yolk protein receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(17), 8934-8939. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.17.8934>
- Sappington, T. W., & Raikhel, A. S. (1998). Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28(5-6), 277-300. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00110-0](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00110-0)
- Seehuus, S. -C., Norberg, K., Krekling, T., Fondrk, K., & Amdam, G. V. (2007). Immunogold Localization of Vitellogenin in the Ovaries, Hypopharyngeal Glands and Head Fat Bodies of Honeybee Workers, *Apis Mellifera*. *Journal of Insect Science*, 7(52), 1-14. <https://doi.org/10.1673/031.007.5201>
- Sheng, Z., Xu, J., Bai, H., Zhu, F., & Palli, S. R. (2011). Juvenile Hormone Regulates Vitellogenin Gene Expression through Insulin-like Peptide Signaling Pathway in the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 41924-41936. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.269845>
- Schmidt, M., Hafner, M., & Frech, C. (2014). Modeling of salt and pH gradient elution in ion-exchange chromatography. *Journal of Separation Science*, 37(1-2), 5-13. <https://doi.org/10.1002/jssc.201301007>
- Soper, A. S., & Aird, S. D. (2007). Elution of tightly bound solutes from concanavalin A Sepharose. *Journal of Chromatography A*, 1154(1-2), 308-318. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.03.126>
- Sun, Y., Shi Q. H., Zhang, L., Zhao, G. F., Liu, F. F. (2011). *Comprehensive Biotechnology* (Druh  vydanie). Elsevier.
- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M. -P., Yin, C. M., & Garofalo, R. S. (2001). A Mutant *Drosophila* Insulin Receptor Homolog That Extends Life-Span and Impairs Neuroendocrine Function. *Science*, 292(5514), 107-110. <https://doi.org/10.1126/science.1057987>
- Telfer, W. H. (1960). The selective accumulation of blood proteins by the oocytes of saturniid moths. *The Biological Bulletin*, 118(2), 338-351. <https://doi.org/10.2307/1539007>
- Trenczek, T., & Engels, W. (1986). Occurrence of vitellogenin in drone honeybees (*Apis mellifica*). *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 10(3), 307-311. <https://doi.org/10.1080/01688170.1986.10510254>
- Tufail, M., Nagaba, Y., Elgendy, A. M., & Takeda, M. (2014). Regulation of vitellogenin genes in insects. *Entomological Science*, 17(3), 269-282. <https://doi.org/10.1111/ens.12086>
- Tufail, M., Raikhel, A. S., & Takeda, M. (2005). *Reproductive biology of invertebrates*. (Prv  vydanie). CRC Press.
- Tufail, M., & Takeda, M. (2002). Vitellogenin of the cockroach, *Leucophaea maderae*: nucleotide sequence, structure and analysis of processing in the fat body and oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(11), 1469-1476. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(02\)00067-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(02)00067-X)
- Tufail, M., & Takeda, M. (2007). Molecular cloning and developmental expression pattern of the vitellogenin receptor from the cockroach, *Leucophaea maderae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 37(3), 235-245. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.11.007>
- Tufail, M., & Takeda, M. (2008). Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology*, 54(12), 1447-1458. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.08.007>

- Tufail, M., & Takeda, M. (2009). Insect vitellogenin/lipophorin receptors: Molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *Journal of Insect Physiology*, 55(2), 88-104. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.11.007>
- Tufail, M., & Takeda, M. (2012). *Hemolymph proteins and functional peptides: Recent advances in insects and other arthropods*. (Prvé vydanie). Bentham Science Publishers.
- UniProtKB. <https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q868N5/entry> (18.4. 2024)
- Ullman, C. G., Haris, P. I., Smith, K. F., Sim, R. B., Emery, V. C., & Perkins, S. J. (1995). B-Sheet secondary structure of an LDL receptor domain from complement factor I by consensus structure predictions and spectroscopy. *FEBS Letters*, 371(2), 199-203. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(95\)00916-W](https://doi.org/10.1016/0014-5793(95)00916-W)
- Van der Horst, D. J., & Rodenburg, K. W. (2010). Lipoprotein assembly and function in an evolutionary perspective. *BioMolecular Concepts*, 1(2), 165-183. <https://doi.org/10.1515/bmc.2010.012>
- Wahli, W. (1988). Evolution and expression of vitellogenin genes. *Trends in Genetics*, 4(8), 227-232. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(88\)90155-2](https://doi.org/10.1016/0168-9525(88)90155-2)
- Wallace, R. A. (1985). *Oogenesis*. Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6814-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6814-8_3)
- Wang, Z., Yang, L., Song, J., Kang, L., & Zhou, S. (2017). An isoform of Taiman that contains a PRD-repeat motif is indispensable for transducing the vitellogenic juvenile hormone signal in *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 82, 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2017.01.009>
- Ward, R., Coffey, M., & Kavanagh, K. (2022). Proteomic analysis of summer and winter *Apis mellifera* workers shows reduced protein abundance in winter samples. *Journal of Insect Physiology*, 139. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2022.104397>
- Wheeler, D. E., & Kawooya, J. K. (1990). Purification and characterization of honey bee vitellogenin. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 14(4), 253-267. <https://doi.org/10.1002/arch.940140405>
- Wheeler, D. E., Buck, N., & Evans, J. D. (2006). Expression of insulin pathway genes during the period of caste determination in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 597-602. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00681.x>
- Wheeler, M. M., Ament, S. A., Rodriguez-Zas, S. L., & Robinson, G. E. (2013). Brain gene expression changes elicited by peripheral vitellogenin knockdown in the honey bee. *Insect Molecular Biology*, 22(5), 562-573. <https://doi.org/10.1111/imb.12043>
- Williams, C. M. (1959). The juvenile hormone. I. Endocrine activity of the corpora allata of the adult cecropia silkworm. *The Biological Bulletin*, 116(2), 323-338. <https://doi.org/10.2307/1539218>
- Wu, Q., & Brown, M. R. (2006). Signaling and function of insulin-like peptides in insects. *Annual Review of Entomology*, 51(1), 1-24. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151011>
- Wu, Z., Guo, W., Xie, Y., & Zhou, S. (2016). Juvenile Hormone Activates the Transcription of Cell-division-cycle 6 (Cdc6) for Polyploidy-dependent Insect Vitellogenesis and Oogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 291(10), 5418-5427. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.698936>
- Wu, Z., Guo, W., Yang, L., He, Q., & Zhou, S. (2018). Juvenile hormone promotes locust fat body cell polyploidization and vitellogenesis by activating the transcription of Cdk6 and E2f1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 102, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.09.002>
- Wu, Z., He, Q., Zeng, B., Zhou, H., & Zhou, S. (2020). Juvenile hormone acts through FoxO to promote Cdc2 and Orc5 transcription for polyploidy-dependent vitellogenesis. *Development*. <https://doi.org/10.1242/dev.188813>
- Wu, Z., Yang, L., He, Q., & Zhou, S. (2021). Regulatory Mechanisms of Vitellogenesis in Insects. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.593613>
- Wyatt, G. R., Cook, K. E., Firko, H., & Dhadialla, T. S. (1987). Juvenile hormone action on locust fat body. *Insect Biochemistry*, 17(7), 1071-1073. [https://doi.org/10.1016/0020-1790\(87\)90122-3](https://doi.org/10.1016/0020-1790(87)90122-3)

- Xu, W., & Regnier, F. E. (1998). Protein–protein interactions on weak-cation-exchange sorbent surfaces during chromatographic separations. *Journal of Chromatography A*, 828(1-2), 357-364. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00641-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00641-4)
- Yue, Y., Yang, R. L., Wang, W. P., Zhou, Q. H., Chen, E. H., Yuan, G. R., Wang, J. J., Dou, W. (2018). Involvement of Met and Kr-h1 in JH-Mediated Reproduction of Female *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00482>
- Zhang, J. -J., Xi, G. -S., & Zhao, J. (2021). Vitellogenin regulates estrogen-related receptor expression by crosstalk with the JH and IIS-TOR signaling pathway in *Polyrhachis vicina* Roger (Hymenoptera, Formicidae). *General and Comparative Endocrinology*, 310. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2021.113836>
- Zhang, W., Wang, L., Zhao, Y., Wang, Y., Chen, C., Hu, Y., Zhu, Y., Sun, H., Cheng, Y., Sun, Q., Zhang, J., & Chen, D. (2022). Single-cell transcriptomic analysis of honeybee brains identifies vitellogenin as caste differentiation-related factor. *IScience*, 25(7). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104643>



## 8 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

AA – akrylamid  
AMK – aminokyseliny  
Akt – proteínkináza B  
APS – persíran amónny  
BCIP – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát  
BIS – bisakrylamid  
BSA – hovädzi sérový albumín  
CBB – Coomassie Brilliant Blue  
Cdc – z angl. cell division cycle  
Cdk – z angl. cyclin dependent kinase  
DTT – ditiontreitol  
E2f-1 – z angl. E2 factor 1  
EcR – receptor pre ekdyteroidné hormóny  
EGF – z angl. epidermal growth factor  
EH – ekdyteroidné hormóny  
Ekv. – ekvilibračný pufor  
Eluč. – elučný pufor  
FoxO – z angl. forkhead box O  
Hex – hexamerín  
HL – hemolymfa  
IEX – ionexová chromatografia  
IIS – z angl. insulin/insulin-like growth peptide signaling  
ILP – z angl. insulin-like peptides  
InR – z angl. insulin receptor  
JH – juvenilný hormón  
KonA – konkanavalín A  
LDLR – z angl. Low density lipoprotein receptor  
Met – z angl. methoprene-tolerant  
MCM – z angl. minichromosome maintenance  
NBT – nitrotetrazoliová modrá  
Orc – z angl. origin recognition complex  
PBS – fosfátový pufor  
pI – izoelektrický bod  
PTU – fenyltiomočovina  
SDS – dodecylsírán sodný  
Tai – Taiman  
TBS-T – Tween-20 v TBS  
TEA – trietanolamín  
TEMED – N,N'-tetrametylendiamín  
TOR – z angl. Target of rapamycin  
Tris – tris(hydroxymetyl)aminometán  
USP – z angl. ultraspiracle protein  
Vg – vitellogenín  
Vg – gén vitellogenínu  
VgR – vitellogenínové receptory  
Vn – vitellín  
vWFD – von Willebrandov faktor typu D