

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biotechnologií



Produkce a funkce včelího vitellogeninu při reakci na lipopolysacharidy a oxidační stres

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Petr Vodáček
Studijní program:	N0512A130007 Biotechnologie a genové inženýrství
Specializace:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok:	2023

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

V Olomouci dne

.....
Bc. Petr Vodáček

Rád bych poděkoval svému vedoucímu práce panu prof. Mgr. Marku Petřivalskému, Dr. za ochotu, trpělivost a pomoc při vypracovávání této diplomové práce. Můj dík patří také panu prof. Mgr. Markovi Šebelovi, Dr. za provedení MALDI metody. Dále děkuji panu Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D. a Mgr. Bronislavu Grunovi za poskytnutí včel. Moje poděkování patří také Mgr. Elišce Pindákové a Mgr. Silvii Dostákové, Ph.D. za cenné rady. V neposlední řadě děkuji celému kolektivu Katedry biochemie za vstřícný přístup při mém vypracovávání experimentální části této práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Petr Vodáček
Název práce	Produkce a funkce včelího vitellogeninu při reakci na lipopolysacharidy a oxidační stres
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Tato diplomová práce se v teoretické části zabývá funkcemi proteinu vitellogeninu včely medonosné v reprodukci, imunitě a při oxidačním stresu. Popisuje jeho tkáňovou lokalizaci a produkci během vývoje, ovlivnění jeho produkce či změny exprese jeho genu v závislosti na potravě či prostředí. Představeny jsou také *vg-like* proteiny a jejich funkce. V experimentální části byla Bradfordovou metodou určena celková koncentrace proteinů v hemolymfě letních a zimních dělnic a matek. Gelovou elektroforézou byly proteiny separovány ve vzorcích hemolymfy a vitellogenin byl poté detekován pomocí metody Western blot. Porovnáním intenzity pásů vitellogeninu byl zjištěn u letních dělnic, krmených paraquatem po dobu 2 hod., pokles jeho intenzity, a naopak její nárůst při krmení trvajícím 4 hod. Po krmení lipopolysacharidy z *Escherichia coli* byl pozorován u letních dělnic pokles vitellogeninu po krmení dlouhém 24 hod. Metodou kvantitativní polymerasové řetězové reakce byla měřena relativní exprese *vitellogeninu* na chromosomech LG2 a LG4 a homologního genu *vg-like-B* ve vzorcích včel krmených lipopolysacharidy. Významný nárůst byl pozorován zejména u skupin letních včel, starých 2-3 dny. Nakonec byla optimalizována a provedena imunohistochemická detekce vitellogeninu v žaludcích včel, kdy byl zaznamenán nárůst signálu v případě krmení lipopolysacharidy po dobu 24 hod, a naopak jeho pokles po krmení trvajícím 48 hod.

Klíčová slova	Vitellogenin, oxidační stres, imunita, včela medonosná, lipopolysacharidy, <i>Escherichia coli</i> , paraquat
---------------	---

Počet stran	98
Počet příloh	6
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Petr Vodáček
Title	Production and functions of honey bee vitellogenin in response to lipopolysaccharides and oxidative stress
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
The year of presentation	2023

Abstract

The theoretical part of this thesis focuses on the functions of the honey bee vitellogenin protein in reproduction, immunity, and during oxidative stress. It describes its tissue localization and production during development, changes in its production and gene expression depending on nutrition or environment. The *vg*-like proteins and their functions are also presented. In the experimental part, the Bradford method was used to determine total protein concentration in the hemolymph of summer and winter workers and honey bee queens. Proteins in hemolymph samples were separated by gel electrophoresis and vitellogenin was detected by Western blot method. Comparison of vitellogenin levels revealed a decrease in summer workers fed with paraquat for 2 h and an increase when fed for 4 h. After feeding with lipopolysaccharides from *Escherichia coli*, a decrease in vitellogenin signal was observed in summer workers fed for 24 h. The relative expression of *vitellogenin* gene on chromosomes LG2 and LG4 and its homologue *vg-like-B* in samples of bees fed with lipopolysaccharides was measured by quantitative polymerase chain reaction method. A significant increase was observed especially in groups of summer bees aged 2-3 days. Finally, immunohistochemical detection of vitellogenin in the bee's stomach was optimized and performed. An increase in signal was observed in the case of feeding with lipopolysaccharides for 24 h, and a decrease was detected after feeding for 48 h.

Keywords Vitellogenin, oxidative stress, immunity, honey bee, lipopolysaccharides, *Escherichia coli*, paraquat

Number of pages	98
Number of appendices	6
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Tkáňová lokalizace exprese a produkce v různých fázích vývoje	3
2.2	Funkce vitellogeninu v reprodukci	6
2.2.1	Role a produkce vitellogeninu a jeho receptoru ve vaječnicích	6
2.2.2	Vliv mandibulárního feromonu matky a mateří kašičky na expresi <i>vitellogeninu</i>	8
2.3	Funkce vitellogeninu v imunitě	10
2.3.1	Role v trans-generační imunitní přípravě	10
2.3.2	Role v hemocytech	13
2.3.3	Vliv infekce na expresi <i>vitellogeninu</i>	14
2.3.4	Vazba vitellogeninu na geny zapojené v imunitě	15
2.3.5	Vazba na hydrofobní povrchy	16
2.4	Antioxidační funkce vitellogeninu	17
2.5	Využití metody RNAi k ovlivnění produkce vitellogeninu	19
2.6	Vitellogenin, vg-like proteiny a jejich funkce	21
2.7	Expresi <i>vitellogeninu</i> v závislosti na potravě a prostředí	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1	Materiál	24
3.1.1	Chemikálie	24
3.1.2	Použité roztoky	25
3.1.3	Přístroje a vybavení	28
3.1.4	Biologický materiál	29
3.2	Metody	29
3.2.1	Krmení včel a příprava vzorků	29
3.2.2	Stanovení proteinů Bradfordovou metodou	31
3.2.3	Metoda SDS-PAGE a Western blot	32
3.2.4	Metoda qPCR	35
3.2.5	Imunohistochemická detekce vitellogeninu	39
4	VÝSLEDKY	42
4.1	Vyhodnocení měření celkové koncentrace proteinů	42
4.1.1	Kalibrační křivka a rovnice	42
4.1.2	Změny koncentrace proteinů po krmení lipopolysacharidy	43
4.1.3	Změny koncentrace proteinů po krmení paraquatem	45
4.1.4	Změny koncentrace proteinů po krmení lipopolysacharidy a paraquatem u zimních dělnic a matek	47
4.2	Vyhodnocení imunochemické detekce vitellogeninu	48
4.2.1	Imunochemická detekce vitellogeninu po krmení lipopolysacharidy	49
4.2.2	Imunochemická detekce vitellogeninu po krmení paraquatem	53
4.2.3	Imunochemická detekce vitellogeninu po krmení lipopolysacharidy a paraquatem u zimních dělnic a matek	56
4.2.4	MALDI analýza proteinů	58
4.3	Stanovení relativní genové exprese <i>vg</i> a <i>vg-like-B</i> metodou qPCR	60

4.4	Imunohistochemická detekce vitellogeninu v žaludku včel.....	72
5	DISKUZE	78
6	ZÁVĚR	82
7	LITERATURA	83
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	94
9	PŘÍLOHY	96

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Vypracovat literární rešerši aktuálních znalostí o funkci proteinu vitellogeninu včely medonosné (*Apis mellifera*) v reprodukci, imunitních reakcích a při oxidačním stresu.

Experimentální část:

- Optimalizovat metody kvantifikace genové exprese, hladiny vitellogeninu a imunohistochemické lokalizace vitellogeninu ve střevech včel.
- Sledovat změny včelího vitellogeninu při reakci na lipopolysacharidy a paraquat.

1 ÚVOD

Vitellogenin (Vg) je prekurzorový protein vaječného žloutku. Jedná se o zásobní fosfolipopglykoprotein, jehož syntéza probíhá v tukových tělískách, odkud je vyměšován do hemolymfy hmyzu. Z ní je vychytáván receptory oocytů v procesu endocytosy (Raikhel & Dhadialla, 1992; Amdam & Omholt, 2002; Tufail & Takeda, 2008; Havukainen *et al.*, 2012).

U lidí jsou lipoproteiny popisovány ve spojitosti s vlivem na zdraví či dlouhověkost (Atzmon *et al.*, 2002; McKay *et al.*, 2011; Hausman *et al.*, 2012). U zvířat plní lipoproteiny tzv. dvojí roli, účastní se metabolismu lipidů, zároveň jsou však zapojeny v imunitních reakcích organismu vůči různým patogenům (Seong & Matzinger, 2004; Cho & Seong, 2009).

U včel medonosných (*Apis mellifera* L.) má vitellogenin velikost 180 kDa (Wheeler & Kawooya, 1990). U včelích matek, zodpovědných za reprodukci, tvoří přes 50 % celkových proteinů v hemolymfě (Hartfelder & Engels, 1998). Nachází se také u včelích dělnic, které jsou v přítomnosti matek sterilní. Ve velkém množství se vyskytuje zejména u odolné zimní generace dělnic, a dále pak u mladých dělnic tzv. krmiček. Naopak u starších dělnic, tzv. létavek, a trubců je jeho obsah nízký (Trenczek *et al.*, 1989; Piulachs *et al.*, 2003; Guidugli *et al.*, 2005a; Amdam *et al.*, 2009).

Vitellogenin je hlavní regulátor délky života jednotlivých dělnic. Má také imunitní funkce, které zahrnují schopnost vázat se na bakterie, ale také poškozené či mrtvé buňky a také schopnost přenášet ionty zinku. Může však působit i jako antioxidant, který neutralizuje volné radikály (Amdam *et al.*, 2005a; Seehuus *et al.*, 2006; Havukainen *et al.*, 2013; Salmela *et al.*, 2015; Salmela & Sundström, 2017). Je také spolu s juvenilním hormonem součástí zpětnovazebné smyčky dvou represorů a má vliv na přechod mezi stádií krmiček a létavek (Amdam & Omholt, 2003a; Guidugli *et al.*, 2005b; Nelson *et al.*, 2007; Guidugli-Lazzarini *et al.*, 2008).

Včelstva jsou ohrožována různými faktory, které mohou vést k nemocem či syndromu zhroucení. Jedná se zejména o mikrobiální parazity a viry. Nicméně negativně mohou na zdraví včel působit i insekticidy či herbicidy, jakým je paraquat (Moffett *et al.*, 1972; Morton *et al.*, 1972; Sánchez-Bayo *et al.*, 2016). Poznatky z této práce získané pozorováním změn produkce vitellogeninu po podání bakteriálních lipopolysacharidů a herbicidu paraquatu by mohly pomoci při zkoumání funkcí vitellogeninu

v antioxidačních a imunitních reakcích včel. To by mohlo být využito při ochraně včelstev nebo v léčbě jejich infekcí.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Tkáňová lokalizace exprese a produkce v různých fázích vývoje

Expres *vitellogeninu* v zadečcích včelích matek ve čtyřech věkových skupinách je nejvyšší v případě jeden den starých, zatímco u jednotýdenních, jednoměsíčních a jeden rok starých klesá na třetinovou hodnotu. U jednodenních dělnic se exprese pohybuje na velmi nízké úrovni, poté 25x roste u jednotýdenních, načež 50x klesá u jednoměsíčních. Expres *vg* v zadečcích jeden den starých trubců je nízká a v případě jednotýdenních ji není možné vůbec zaznamenat. Expresi *vg* lze detekovat i v hrudích a hlavičkách zejména u matek. V obou jejich tělních částech se exprese zvyšuje s rostoucím věkem. U dělnic má exprese v těchto tělních částech nízké hodnoty, které se navíc s věkem snižují. V případě jednodenních i jednotýdenních trubců je zde hodnota exprese nepatrná (Corona *et al.*, 2007).

Dělnice se během léta podílejí na péči o potomstvo. Krmičky mají jako jediné dělnice potřebné trávicí enzymy, díky nimž využívají aminokyseliny z pylu, přineseného létavkami, pro syntézu vitellogeninu a tvorbu mateří kašičky pro krmení larev a dalších včel (Crailsheim, 1986). Krmičky mají v rámci letních včel největší vnitřní zásoby proteinů a jejich hypertrofovaná tuková tělíska a hypofaryngeální žlázy zajišťují jejich vysokou odolnost vůči nepříznivým vlivům. Jakmile se dostanou do stádia létavek, syntéza vitellogeninu u nich klesá, navíc dochází k atrofování hypofaryngeálních žláz i tukových tělísek a značně se snižuje množství zásobních proteinů a lipidů. Stávají se náchylnými a začínají přijímat mateří kašičku. Naopak nejodolnější jsou včely zimní generace s největšími zásobami vitellogeninu, které se začínají vyvíjet za nepřítomnosti plodu (Amdam & Omholt, 2002; Münch & Amdam, 2010).

V hypofaryngeálních žlázách je vitellogenin u dělnic přítomen konkrétně v jejich centrálním kanálku. Přičemž u krmiček se zde nachází ve značném množství, kdežto u létavek je jeho hladina velmi nízká (Seehuus *et al.*, 2007).

Vitellogenin byl také detekován v cytoplasmě folikulárních buněk a v menší míře i v ooplasmě oocytů ve vaječnicích. Receptor pro vitellogenin (VgR) byl lokalizován na povrchu a v cytoplasmě folikulárních buněk, přičemž se potvrdila jeho asociace s vitellogeninem na základě kolokalizace pomocí imunofluorescenční analýzy (Ronnau *et al.*, 2016; Dohanik *et al.*, 2018).

Vitellogenin je přítomen i v hemolymfě a tukových tělískách. Přičemž v oblasti zadečku se nachází výhradně v trofocytech tukových tělísek, což jsou v této tělní části jediná místa syntézy vitellogeninu (Corona *et al.*, 2007). Jsou typické jejich nepravidelně tvarovanými jádry, ve kterých se může vitellogenin vyskytovat. Zejména je pak přítomen v jejich cytoplasmě. Druhým typem buněk tukových tělísek jsou oenocyty, ty mají jádra kulovitěho tvaru a nedochází v nich k syntéze ani ukládání vitellogeninu. Tento protein se vyskytuje i v hlavových tukových tělískách (Pan *et al.*, 1969; Seehuus *et al.*, 2007; Roma *et al.*, 2010; Havukainen *et al.*, 2011; Salmela *et al.*, 2022).

V hemolymfě se vitellogenin nachází zejména v kompletní podobě o velikosti 180 kDa, přičemž může docházet k jeho fragmentaci, kdy vzniká podjednotka o velikosti 150 kDa, u které chybí N-terminální část. V tukových tělískách se kromě celého proteinu a 150kDa formy vyskytuje i podjednotka o velikosti 40 kDa, která odpovídá jeho N-terminální části (Havukainen *et al.*, 2011).

Münch *et al.* (2015) jako první zjistili, že se vitellogenin nachází v mozku hmyzu, konkrétně se jej podařilo detekovat u včelích krmiček v gliových buňkách, které se podílí na homeostáze a energetickém metabolismu mozku (Obr. 1). Nicméně se nepředpokládá, že by byl v mozku vitellogenin syntetizován. Pravděpodobně tedy dochází k jeho akumulaci neznámým způsobem, který bude ojedinělý jen pro tento typ buněk.

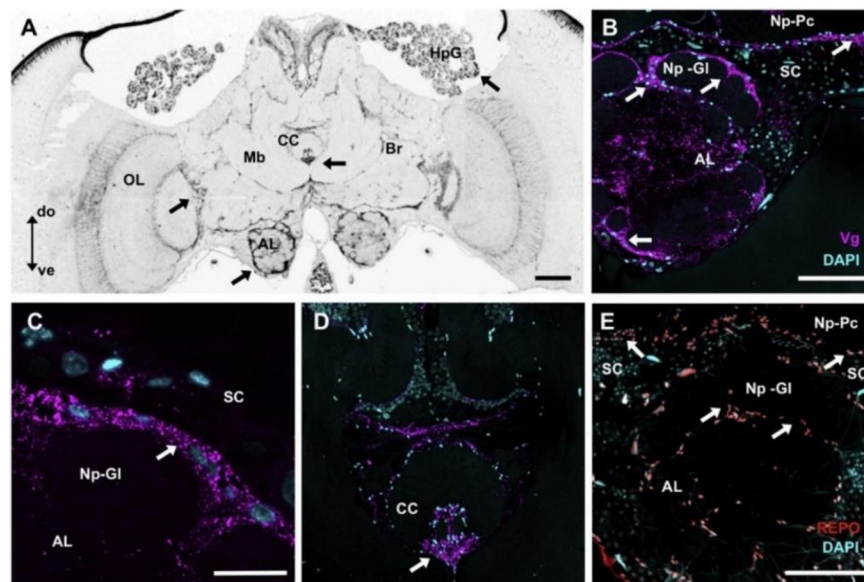
Vitellogenin se podařilo také lokalizovat ve středním střevu neboli žaludku krmiček a létavek. Trávicí trubice hmyzu se dělí na tři části: přední střevo (ektodermální původ), žaludek (endodermální původ) a zadní střevo (ektodermální původ) (Obr. 2) (Snodgrass & Eickwort, 1994). V předním střevu se nachází jícen a medový váček, sloužící k ukládání potravy. Zadní střevo tvoří tenké střevo, obsahující střevní bakterie, a výkalový váček, kde dochází k absorpci vody a iontů (Chapman, 2012; Martinson *et al.*, 2012). Žaludek slouží k trávení a absorpci živin, přičemž má také důležitou roli v imunitě (Harwood & Amdam, 2021a).

Žaludek je tvořen hlavně podlouhlými epiteliálními buňkami enterocyty, které vyčnívají do dutiny střeva a mají několik významných funkcí (Snodgrass & Eickwort, 1994). Produkují a vyměšují trávicí enzymy (Lehane & Billingsley, 1996) a navíc vylučují chitinový materiál, tzv. peritroficičnou membránu. Ta chrání enterocyty před obrušováním, toxiny, patogeny a velkými molekulami (Brandt *et al.*, 1978; Lehane, 1997; Hegedus *et al.*, 2009). Další funkcí enterocytů je v případě přítomnosti patogenů v dutině střeva produkce a vyměšování imunitních obranných sloučenin, jakými jsou

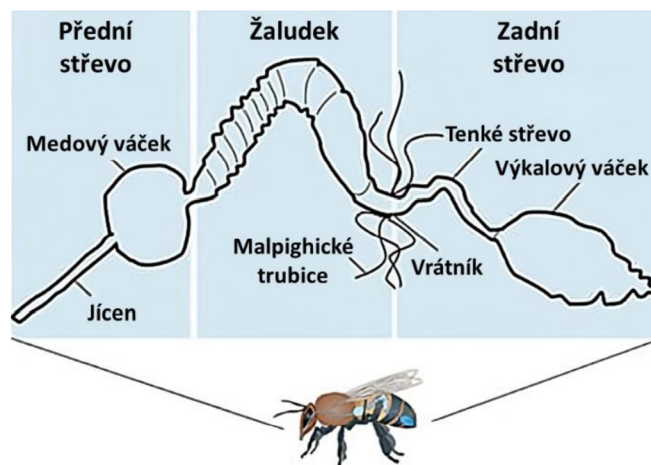
antimikrobiální peptidy a reaktivní formy kyslíku (ROS) (Nakajima *et al.*, 2002; Ha *et al.*, 2005; Buchon *et al.*, 2009; Dussaubat *et al.*, 2012; Harwood & Amdam, 2021a).

Vitellogenin byl lokalizován v enterocytech žaludku stejně starých krmíčků a létavek. Vyskytoval se v celém prostoru jejich cytoplasmy. Z enterocytů je zřejmě vyměšován do peritrofitické membrány podél dutinové strany těchto buněk. Nicméně se zjistilo, že u létavek se tato membrána nevytváří nebo je přítomna pouze v malé míře (Harwood & Amdam, 2021a).

Ve žaludku dochází k expresi *vitellogeninu* u krmíčků i létavek. Nicméně míra exprese je nízká, a navíc se mezi nimi významně neliší, což je neočekávané zjištění vzhledem k jeho vyšší míře exprese v tukových tělískách a obsahu v hemolymfě u krmíčků oproti létavkám (Harwood & Amdam, 2021a).



Obr. 1: Imunoreaktivita vitellogeninu je detekovatelná v různých oblastech a buněčných populacích mozku včely medonosné. A: Čelní rovinový řez hlavou včely medonosné, na kterém jsou vidět tykadlové laloky (AL), optické laloky (OL), houbová tělíska (Mb) a centrální komplex (CC). Intenzivní imunoreaktivita vitellogeninu (VgIR, šípky) je přítomna v hlavních oblastech mozku i v hypofaryngeálních žlázách (HpG). B a C: Snímky předních oblastí mozku včetně tykadlového laloku (AL) s intenzivní VgIR (purpurová, šípky) v hraničních vrstvách, které obklopují synaptické neuropily, jako jsou jednotlivé glomeruly (NP-GI), nebo které oddělují protocerebrální neuropily (NP-Pc) od somatických oblastí (SC; značení DAPI odhalující neuronální a gliová somata, azurová). D: Snímek zobrazující intenzivní VgIR v blízkosti centrálního komplexu (CC). E: Snímek ilustrující distribuci gliových buněk pomocí markeru specifického pro glie (anti REPO, červeně). Naproti tomu DAPI (azurová) označuje gliové i neuronální somata. Šípky ukazují, že lokalizace gliových somat v hraničních vrstvách glomerulů (NP-GI) a protocerebrálních neuropilů (NP-Pc) odpovídá rozložení VgIR zobrazené v části B. Zkratky: do – zadní; ve – přední. Měřítko = 200 μ m v A, 100 μ m v B (pro B a D), 20 μ m v C (převzato od Münch *et al.*, 2015).



Obr. 2: Schéma trávicího traktu včely medonosné s vyznačením tří střevních částí. Potrava prochází jícnem do medového váčku, je trávena ve středním střevě a poté se přesouvá do tenkého střeva a výkalového váčku (upraveno podle Alatawy *et al.*, 2020).

Avšak signál imunitního značení vitellogeninu byl silný, což by hypoteticky mohlo naznačovat, že je do enterocytů vitellogenin přiváděn prostřednictvím hemolymfy. Navíc se již podařilo prokázat přítomnost jeho receptorů v žaludku, pouze však v malé míře (Guidugli-Lazzarini *et al.*, 2008; Harwood & Amdam, 2021a).

Funkce vitellogeninu v žaludku je zatím neznámá. Velkou překážkou v jejím zjištění je totiž fakt, že se zatím nepodařilo provést potlačení jeho genu pomocí metody RNAi (Harwood *et al.*, 2019), a získat tak upravené včely pro porovnání s divoký typem (Harwood & Amdam, 2021a).

2.2 Funkce vitellogeninu v reprodukci

2.2.1 Role a produkce vitellogeninu a jeho receptoru ve vaječnicích

Samičí kasta každého včelstva se skládá z tisíců sterilních dělnic, které mají nedostatečně vyvinuté nebo zmenšené vaječníky, a jediné rozmnožující se matky. Kromě toho se v určitých intervalech rodí samci (trubci) a nové matky, které však včelstvo rychle opouští. Matka se během svých pářících letů obvykle páří s 10-40 (průměrně 12) trubci (Tarpy & Nielsen, 2002). Po páření se vaječníky matky aktivují a během několika dní začnou produkovat oplozená vajíčka. V závislosti na potravním režimu a délce vývoje larev se z oplozených (diploidních) vajíček zpravidla vyvinou samičky, a to buď sterilní dělnice, nebo nové matky. Pokud však spermie pochází ze samce odpovídajícího z hlediska komplementárního systému určování pohlaví, zygota se místo toho vyvíjí jako diploidní samec (Evans *et al.*, 2004). Dělnice mají 2-12 vaječnickových primordií

(anlageny), zatímco u matek jich může být až 180 (Hartfelder & Steinbruck, 1997; Capella & Hartfelder, 1998). Za normálních podmínek matka vypouští feromony a chemické látky, kterými se řídí potomstvo a které omezují vývoj zbývajících vaječnickových primordií u dělnic (Free, 1987). Výsledkem je, že pouze několik dělnic (0,01 %) ve včelstvech, ve kterých je přítomna matka, má aktivní (vyvinuté) vaječníky schopné produkovat neoplozená (haploidní) vajíčka, která se vyvinou jako uniparentální trubci, pokud to podmínky ve včelstvu dovolí (Page & Erickson, 1988; Visscher, 1989; Oldroyd & Osborne, 1999). Ve včelstvu bez matky se však podíl nepářících se dělnic s plně funkčními vaječníky výrazně zvyšuje, přičemž až 10 % dělnic je po sedmi a více dnech bez přítomnosti matky schopno klást samčí (haploidní) vajíčka (Robinson *et al.*, 1990).

U dělnic s nevyvinutými vaječníky, žijících v přítomnosti matky, je potlačena transkripce dvou genů ve srovnání s dělnicemi s vyvinutými vaječníky, žijících bez matky, konkrétně *transferinu* přibližně 8krát a *vitellogeninu* 12krát (Koywiwattrakul & Sittipraneed, 2009).

Hromadění vitellogeninu je totiž u hmyzu pro vývoj oocyty klíčové (Raikhel & Dhadialla, 1992; Tufail & Takeda, 2008). Vitellogenin je primárně produkován v tukovém tělese, načež je vyměšován do hemolymfy a přenášen do oocyty endocytózou zprostředkovanou receptorem pro vitellogenin (VgR), a to buď mezerami, které se rozšiřují mezi epiteliálními buňkami folikulu (Engels, 1973; Engels, 1974), nebo transepiteliálním transportem (Fleig *et al.*, 1991). Receptor pro vitellogenin zprostředkovává inkorporaci vitellogeninu do oocyty a jeho následné zpracování na vitellin. Gen *vgr* byl klonován a sekvencován, načež bylo zjištěno, že jeho exprese ve vaječnicích přímo souvisí se stavem aktivace vaječnicků u matek i dělnic. *In situ* hybridizační analýza odhalila, že *vgr* je vysoce exprimován v sesterských buňkách, které tvoří tzv. trofickou komůrku, odkud je příslušná mRNA transportována do zvětšujícího se oocyty (Guidugli-Lazzarini *et al.*, 2008). S výjimkou několika genů je jádro oocyty v meiotické profázi, a tedy transkripčně neaktivní, což naznačuje, že sesterské buňky hrají významnou roli ve vitellogenním růstu oocyty (Hartfelder *et al.*, 2018).

Míra exprese *vgr* byla měřena ve vaječnicích dělnic žijících s matkou nebo bez ní a také ve vaječnicích panenských matek a matek kladoucích vajíčka. Množství transkriptu *vgr* bylo větší ve vaječnicích matek kladoucích vajíčka ve srovnání s panenskými matkami. U vaječnicků dělnic bylo dosaženo podobného zjištění. Dělnice vykazovaly

velmi nízké úrovně exprese *vgr* ve vaječnicích v přítomnosti matky a podobně slabá exprese byla naměřena u dělnic s neaktivními vaječníky v její nepřítomnosti. Bylo však zjištěno, že hladiny exprese jsou zřetelně zvýšené, jakmile vaječníky vykazují známky aktivity u dělnic bez matky, zejména při přechodu vaječníků z 1. do 2. stadia, kdy se množství mRNA zvyšuje. Pre-vitellogenní až brzké vitellogenní folikuly jsou přítomny ve vaječnicích stadia 2. Mezi vaječníky stadia 2 a vyvinutějšími vaječníky stadia 3 nebyly patrné žádné rozdíly v expresi *vgr*. Výsledky tedy potvrdily předpokládaný vztah mezi expresí *vgr* a reprodukčním stavem včelí samičky bez ohledu na to, zda se jedná o matku nebo dělnici (Guidugli-Lazzarini *et al.*, 2008).

Předpokládaná mRNA kódující VgR byla ve vaječných trubcích (ovarioly) nalezena pouze v buňkách zárodečné linie (oocytech a trofocytech), přičemž růst folikulů doprovází zvýšená úroveň exprese *vgr*. Zdá se, že exprese *vgr* v trofocytech narůstá, jakmile se folikuly oddělí od zárodečnicku (germanium) a rozdělí se na trofickou a vaječnou komůrku. Transkripty *vgr* jsou v této fázi, stejně jako v pozdějších vitellogenních fázích, rovnoměrně rozšířeny v cytoplazmě oocytu, ale chybí v epitelálních buňkách folikulu (Guidugli-Lazzarini *et al.*, 2008).

2.2.2 Vliv mandibulárního feromonu matky a mateří kašičky na expresi *vitellogeninu*

Faktorem, který ovlivňuje reprodukci dospělých dělnic a případně i jejich dlouhověkost, je sociální prostředí. Na jejich plodnost má vliv řada feromonů uvolňovaných včelstvem a matkou, jedním z nich je mandibulární feromon matky (QMP). Tento feromon upozorňuje dělnice na přítomnost matky a potlačuje aktivaci jejich vaječníků (Hoover *et al.*, 2003; Ronai *et al.*, 2016a, 2016b). QMP také ovlivňuje expresi reprodukčních genů, jako je *vg*. Jakmile jsou dělnice vystaveny působení QMP, dochází ke zvýšení exprese *vg* v tukových tělískách (Fischer & Grozinger, 2008). Vysoké hladiny Vg poté způsobují pokles hladiny juvenilního hormonu (JH) v hemolymfě (Guidugli *et al.*, 2005b), což zpožďuje dosažení behaviorální zralosti a přechod z krmiček na létavky (Marco Antonio *et al.*, 2008).

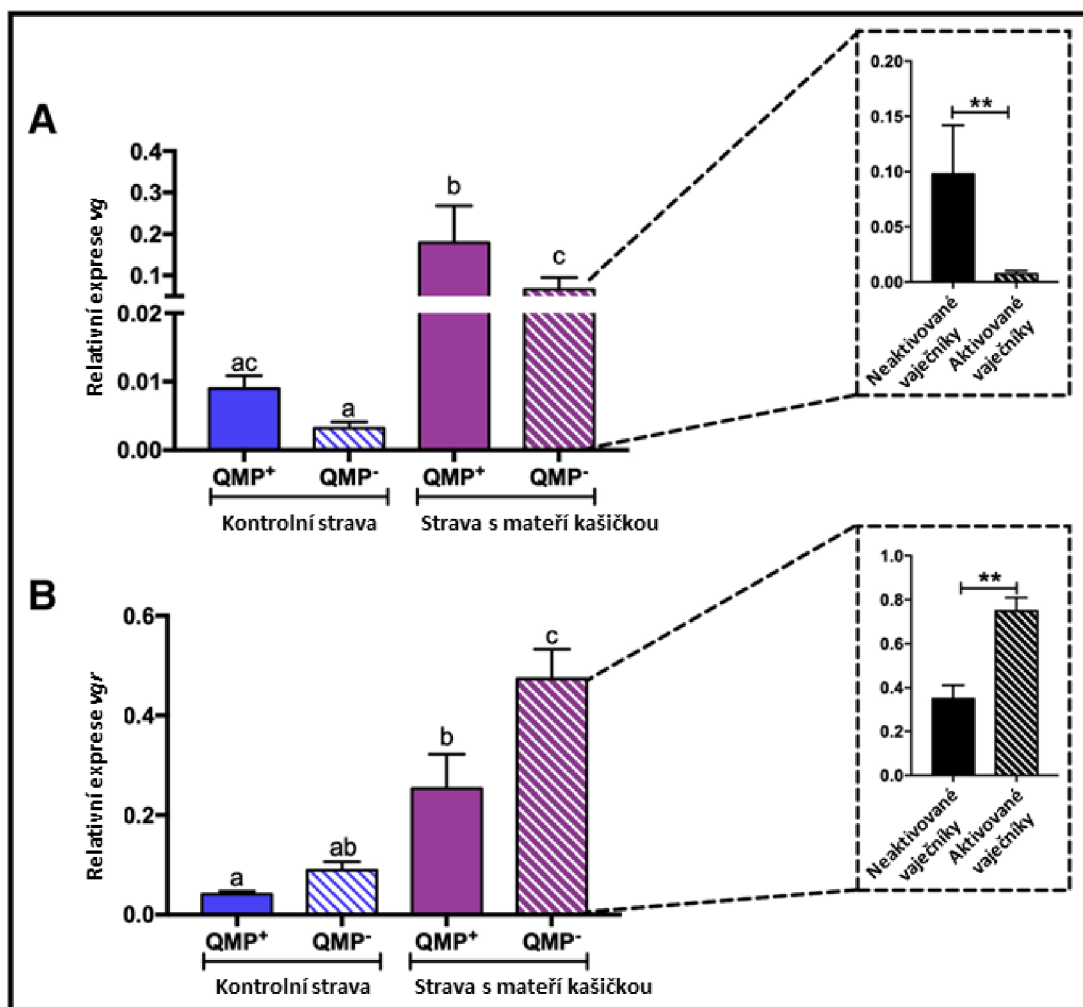
Matky a dělnice se výrazně liší konzumovanou potravou, což pravděpodobně přispívá k jejich rozdílné dlouhověkosti. Dospělé matky jsou krmeny sekrety hypofaryngeálních žláz, obsahujícími mateří kašičku (výživná potrava s vysokým obsahem sacharidů, lipidů a bílkovin) (Rembold & Dietz, 1966; Crailsheim, 1991). Dospělé dělnice se naproti tomu

živí přímo uskladněným medem a pylem nebo potravou vyvrhovanou jinými dělnicemi (Winston, 1987), mohou však také přijímat menší množství žlázových sekretů od jiných dělnic (Crailsheim, 1991).

U dospělých dělnic se při nucené konzumaci mateří kašičky v umělé stravě vyvíjí fenotyp podobný matce, včetně aktivace vaječnicků a delšího života (Lin a Winston, 1998; Wang *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2017). Cardoso-Júnior *et al.* (2021) se podrobněji zabývali vlivem mateří kašičky a QMP u dělnic. Při podávání mateří kašičky byly jejich vaječnický po sedmi dnech aktivovány více než u kontrolní skupiny. Přičemž vyšší aktivita byla u dělnic, které zároveň nebyly vystaveny QMP oproti těm, které QMP vystaveny byly. Oba tyto faktory mají také vliv na expresi *vg* ve vaječnicích dělnic (Obr. 3), ale není mezi nimi spojitost. K nejsilnější expresi *vg* docházelo při podávání mateří kašičky za přítomnosti QMP oproti ostatním třem testovaným skupinám dělnic (QMP+/kontrolní strava,

QMP-/kontrolní strava, QMP-/mateří kašička). Navíc exprese *vg* byla vyšší ve skupině, které byla podávána mateří kašička za nepřítomnosti QMP než při podání kontrolní potravy. Co se týče *vgr*, jeho exprese byla nejsilnější při podání mateří kašičky za nepřítomnosti QMP v porovnání s ostatními třemi skupinami. V této skupině byl také zkoumán vliv aktivace vaječnicků na expresi *vg* a *vgr*. Exprese *vg* byla značně nižší v aktivovaných vaječnicích oproti neaktivovaným. Oproti tomu exprese *vgr* byla v aktivovaných vaječnicích vyšší (Cardoso-Júnior *et al.*, 2021).

Snížení exprese *vg* v aktivovaných vaječnicích je vzhledem k tomu, že se jedná o prekurzor vaječného žloutku, neočekávané (Raikhel & Dhadialla, 1992). Jak již bylo zmíněno, vitellogenin je do oocytů přenášen z hemolymfy prostřednictvím VgR (Guidugli-Lazzarini *et al.*, 2008; Dohanik *et al.*, 2018). Hypotetickým vysvětlením by tak mohlo být, že se přenášením velkého množství vitellogeninu do oocytů ve vaječnicích potlačí jeho transkripce *in situ* (Cardoso-Júnior *et al.*, 2021).



Obr. 3: Relativní exprese *vg* a *vgr* ve vaječnicích dělnic včely medonosné. A: Exprese *vg* ve vaječnicích dělnic vystavených QMP a krmených stravou s mateří kašičkou nebo kontrolní stravou. Informace o velikosti vzorku: QMP+/kontrolní strava – N = 16; QMP-/kontrolní strava – N = 15; QMP+/strava s mateří kašičkou – N = 18 a QMP-/strava s mateří kašičkou – N = 26. Ve vložených rámečcích jsou vzorky QMP-/strava s mateří kašičkou rozdělené podle neaktivovaných (N = 17) a aktivovaných vaječnicků (N = 9). B: Exprese *vgr* v rámci stejných skupin jako u *vg*. Rozdílná písmena představují statistickou významnost ($p < 0,05$) a symbol ** představuje $p < 0,01$ zjištěné po provedení dvouvýběrového Studentova t-testu (upraveno podle Cardoso-Júnior *et al.*, 2021).

2.3 Funkce vitellogeninu v imunitě

2.3.1 Role v trans-generační imunitní přípravě

Základem imunity hmyzu je nespecifická imunitní odpověď, která se skládá z humorální a buněčné složky (Strand, 2008). V případě humorální složky dochází v tukovém tělísku k produkci antimikrobiálních peptidů, které se následně uvolňují do hemolymfy. Takovým peptidem je například lysozym, který procesem hydrolýzy štěpí buněčné stěny

bakterií (Arrese & Soulagés, 2010; Callewaert & Michiels, 2010). Buněčnou složku imunity tvoří hemocyty, které mají schopnost fagocytózy a enkapsulace patogenu. Navíc však ještě vylučují phenoloxidasu (EC 1.14.18.1), která plní funkci při nodulaci, kdy dochází k zachycení patogenu vrstvou hemocytů. Součástí imunity hmyzu jsou také fyzikální bariéry, jako jsou vzdušnice, střeva a kutikula (Strand, 2008; Marmaras & Lampropoulou, 2009; González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012). U eusociálního hmyzu, kterým je včela medonosná, se vyskytuje i tzv. sociální imunita, kterou lze definovat jako soubor behaviorálních, fyziologických a organizačních adaptací, bránících vstupu, usídlení a rozšíření patogenů v kolonii (Cremer *et al.*, 2007).

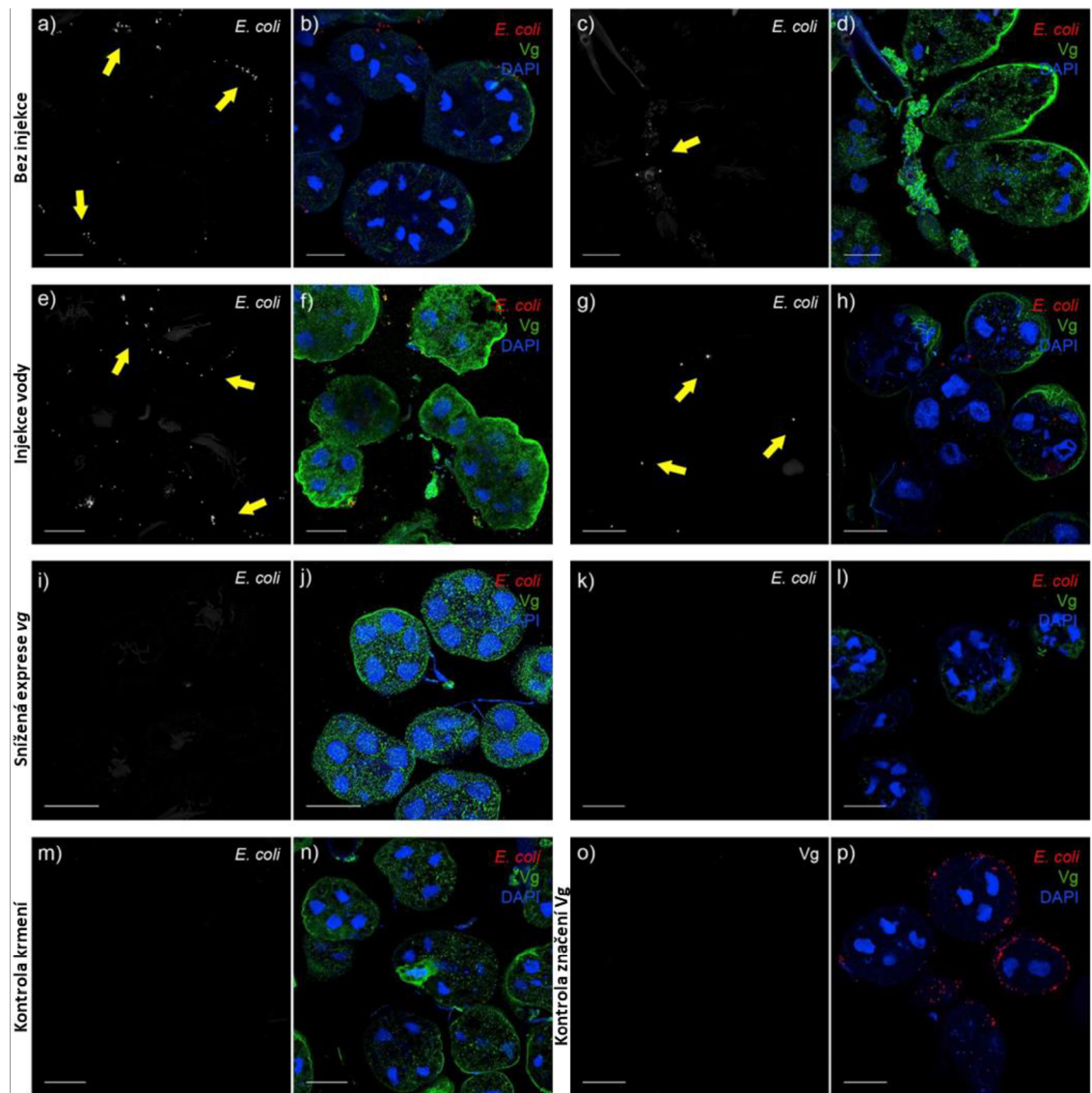
Hmyzu a celkově bezobratlým sice chybí protilátková imunitní paměť, přesto jsou schopni imunitně připravovat sami sebe i své potomstvo proti patogenům v procesu tzv. trans-generační imunitní přípravy (Little *et al.*, 2003; Sadd *et al.*, 2005; Moret, 2006; Sadd & Schmid-Hempel, 2006; Freitak *et al.*, 2009; Roth *et al.*, 2009; Tidbury *et al.*, 2011; Hernández López *et al.*, 2014). Například u samic zavíječe voskového (*Galleria mellonella* L.) k tomu dochází v momentě, kdy jsou pozřené fragmenty patogenů přenášeny do jejich vajíček, kde působí jako elicitory imunitní odpovědi vyvíjejícího se embrya (Freitak *et al.*, 2014).

U včelích matek by tento proces mohl být zprostředkováván vitellogeninem, který byl identifikován jako přenašeč imunitních elicitorů do vajíček (Salmela *et al.*, 2015). Navíc se pravděpodobně dokáže navázat na molekulární vzorce asociované s patogeny (PAMP) (Li *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009; Salmela *et al.*, 2015), jakými jsou lipopolysacharidy a peptidoglykany bakterií a hub, díky čemuž by mohl mít v tomto procesu hlavní roli (Harwood *et al.*, 2019).

U dělnic je vitellogenin zdrojem aminokyselin pro tvorbu mateří kašičky v hypofaryngeálních žlázách (Snodgrass, 1956, Amdam *et al.*, 2003b), které obsahují receptory pro vitellogenin, aby mohl být přijímán z hemolymfy (Guidugli-Lazzarini *et al.*, 2008). Harwood *et al.* (2019) zjistili, že pozřené fragmenty značené bakterie *Escherichia coli* jsou přenášeny do hypofaryngeálních žláz u dělnic v první kontrolní skupině, které byla injekčním vpichem podána voda, a ve druhé kontrolní skupině, které nebyla podána žádná injekce (Obr. 4). Naopak v případě, kdy byla experimentálně potlačena exprese *vitellogeninu* vpichem dsRNA v rámci RNAi metody, k tomuto jevu nedocházelo, případně byl silně potlačen. Což naznačuje, že vitellogenin může být přenašečem této bakterie v dráze imunitní přípravy, kdy dochází k šíření imunologických

signálů ve včelstvu skrze sekrety hypofaryngeálních žláz. Jeho schopnost vázat bakterie *E. coli* byla u včel již dříve prokázána (Shi *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Tong *et al.*, 2010; Salmela *et al.*, 2015), stejně jako jeho nezbytnost pro jejich přenos do vaječnicků u matek (Salmela *et al.*, 2015). Vázat se může také na jiné ligandy, včetně dalších gram-negativních i gram-pozitivních bakterií (Shi *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2009; Tong *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Salmela *et al.*, 2015). V jiném experimentu autorů Harwood *et al.* (2021a) se již potvrdilo, že fragmenty pozřených bakterií *Paenibacillus larvae* se v hypofaryngeálních žlázách stávají součástí mateří kašičky.

Bakteriální fragmenty mohou být tedy přenášeny pomocí vitellogeninu skrze membránu hypofaryngeálních žláz, poté se dostávat do mateří kašičky a následně být orálně předávány larvám nebo matce. Jak bylo zmíněno, u samic hmyzu prokazatelně dochází k přenosu zkonsumovaných bakterií ze žaludku do jejich vaječnicků a probíhá tak proces imunitní přípravy potomků (Freitak *et al.*, 2009; Knorr *et al.*, 2015). Stejně tak tomu může být u včelích matek s výjimkou, že jejich potrava s bakteriálními fragmenty pochází od dělnic v podobě mateří kašičky. Druhou možností je, že by bakteriální fragmenty mohly z membrány hypofaryngeálních žláz spouštět signální kaskádu, jejímž výsledkem by bylo zahájení nespecifické imunitní odpovědi, která by ovlivňovala, jaké látky budou obsaženy v mateří kašičce. Ta obsahuje několik složek, které jsou součástí vrozené imunitní reakce včel, např. defensin 1 nebo major royal jelly protein 3 (Blum *et al.*, 1959; Fujiwara *et al.*, 1990; Okamoto *et al.*, 2003; Fontana *et al.*, 2004; Vučević *et al.*, 2007; Romanelli *et al.*, 2011; Klauđiny *et al.*, 2012; Sugiyama *et al.*, 2012; Bucekova *et al.*, 2017). Například v případě včel, které pozřely bakterie *P. larvae*, došlo k nárůstu obsahu antimikrobiálního peptidu defensinu 1 v mateří kašičce o 68 % oproti kontrole (Harwood *et al.*, 2021b).



Obr. 4: Hypofaryngeální žlázy dělnic krměných *E. coli* a kontrolní stravou. Buněčná jádra jsou značena modře pomocí DAPI, fragmenty *E. coli* jsou značeny červeně pomocí Texas Red a vitellogenin je značen zeleně pomocí Alexa 488. Měřítko = 50 μm . Jedinci, kteří nedostali injekci, a ti, kteří dostali injekci sterilní vody, vykazovali pozitivní signál *E. coli* v hypofaryngeálních žlázách (A-H), ale jedinci, kteří dostali injekci ke snížení exprese *vg*, signál *E. coli* v těchto žlázách nevykazovali (I-L). A-D: reprezentativní vzorky včel, které nedostali injekci, krměných *E. coli*; E-H: reprezentativní vzorky jedinců s injekcí sterilní vody krměných *E. coli*; I-L: reprezentativní vzorky jedinců se sníženou expresí *vg*, krměných *E. coli*; M-N: reprezentativní vzorek jedince, který nedostal injekci, krměného kontrolní stravou; O-P: reprezentativní vzorek kontrolního značení Vg (inkubováno s Alexa 488, ale bez primárních protilátek proti Vg) (upraveno podle Harwood *et al.*, 2019).

2.3.2 Role v hemocytech

Přítomnost vitellogeninu byla také zjištěna u všech skupin dělnic v imunitních buňkách, hemocytech, konkrétně ve dvou jejich typech, v plasmatocytech a granulocytech. Jeho funkce v nich může mít souvislost se schopností vitellogeninu přenášet ionty zinku

(Amdam *et al.*, 2004a), které mají pro imunitní systém důležité regulační a katalytické funkce (Mocchegiani *et al.*, 2000). Případně by mohla hrát roli jeho schopnost vázat se na molekuly patogenů, jako jsou lipopolysacharidy (Salmela *et al.*, 2015), což by mohlo vést k aktivaci hemocytů. Jeho největší výskyt v hemocytech byl naměřen u zimní generace dělnic, což odpovídá i jeho vysoké hladině v hemolymfě u této skupiny (Smedal *et al.*, 2009; Amdam, 2011). Přestože je u létavek hladina Vg v hemolymfě nižší než u krmiček (Amdam *et al.*, 2005a), nebyl zjištěn rozdíl v jeho výskytu v hemocytech mezi těmito skupinami (Hystad *et al.*, 2017).

Kromě toho byla u zimní generace dělnic zjištěna negativní korelace mezi hemocyty obsahujícími vitellogenin a jejich mitotickou aktivitou. To by mohlo být teoreticky vysvětleno tím, že za přítomnosti ochranné molekuly vitellogeninu, není potřeba, aby docházelo u hemocytů k mitóze a zvyšovala se tak obranyschopnost (Hystad *et al.*, 2017).

2.3.3 Vliv infekce na expresi vitellogeninu

Ve studii autorů Antúnez *et al.* (2015) byla ve včelstvu, rozděleného na dvě skupiny podle míry infekce houbou *Nosema ceranae*, naměřena rozdílná exprese vitellogeninu, přičemž u skupiny s nízkou úrovní infekce byla exprese vyšší než u skupiny s vysokou mírou infekce. Následně byly nově vylíhnuté včely z obou skupin infikovány *N. ceranae*, ale exprese vg zůstala velmi podobná. Což naznačuje, že exprese může mít spojitost s mírou infekce u původního včelstva. V expresi genů spojených s imunitou – *abaecinu*, *hymenoptaecinu*, *defensinu*, *glukosadehydrogenasy* (EC 1.1.1.47) a *lysozymu* – nedošlo k žádným významným změnám ani mezi infikovanými včelami z obou skupin či kontrolními včelami z obou skupin. Rozdíl v expresi vg nemohl být dán odchylkami při krmení, které by mohly ovlivnit vývoj tukového tělesa, jelikož se včely vylíhly a byly krmeny při stejných laboratorních podmínkách. Vyšší exprese vitellogeninu u skupiny s nižší mírou infekce by tedy mohla být konstitutivní, nikoliv spouštěna infekcí, jelikož po ní nedošlo k významné změně.

Vliv infekce *P. larvae* u matek byl testován v dalším experimentu autorů Goma *et al.* (2021), kdy bylo zjištěno, že se zvýšil celkový obsah proteinů ve vaječnicích více než třikrát. U infikovaných matek byla naměřena také 20x zvýšená exprese vitellogeninu oproti kontrolní skupině.

Ve studii autorů Kim *et al.* (2022) byla v tukových tělískách krmiček po podávání živých i mrtvých bakterií *P. larvae* po dobu 12 hod. naměřena vyšší exprese vitellogeninu

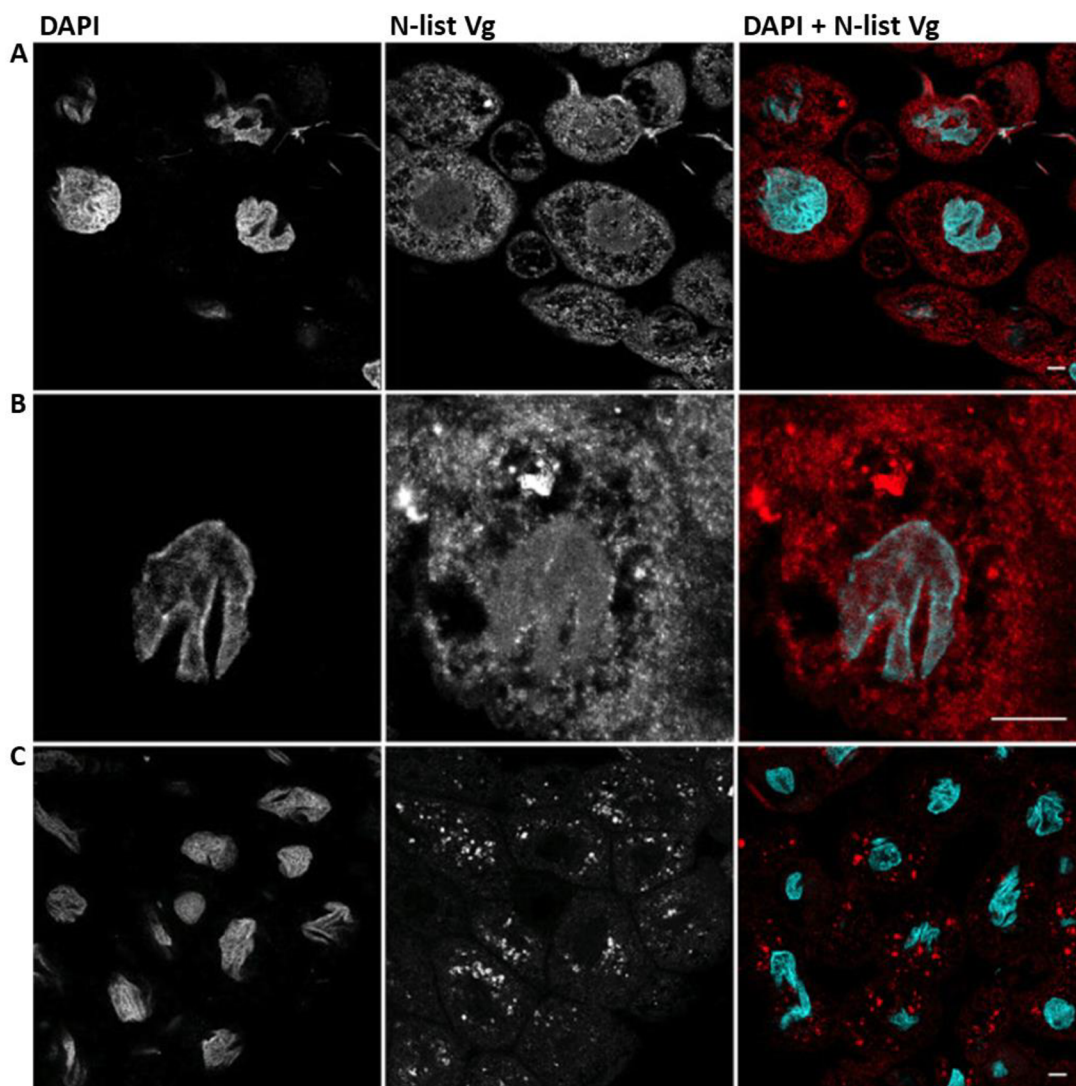
než u kontrolní skupiny, při podání živých bakterií byla exprese vyšší více než 2,5x, v případě mrtvých to bylo více než 2x. Nicméně po krmení po dobu 24 hod. byla zjištěna podobně zvýšená exprese (více než 1,5x) při podání živých i mrtvých bakterií oproti kontrolní skupině. Takto zvýšená exprese *vitellogeninu* následující po bakteriální infekci naznačuje jeho zapojení do imunitních procesů.

2.3.4 Vazba vitellogeninu na geny zapojené v imunitě

Salmela *et al.* (2022) zjistili, že se doména vitellogeninu N-list může dostávat do jader trofocytů tukových tělísek (Obr. 5), kde se váže na mnoho lokusů v DNA u jednodenních i sedmidenních včel.

Přestože bylo u jednodenních včel oproti sedmidenním pozorováno mnohem méně lokusů na DNA, kam se tato doména vázala (150 oproti 927), přes 90 % míst pozorovaných u jednodenních včel bylo přítomno i u sedmidenních včel. Což naznačuje, že tato doména zůstává nejenom navázána na daném místě, ale že se navíc zvyšuje počet lokusů s rostoucím věkem (Salmela *et al.*, 2022).

N-list vitellogeninu se v jádrech trofocytů tukových tělísek váže na sekvence několika významných genů zapojených do imunitních procesů (Fehlbaum *et al.*, 1994; Morishima *et al.*, 1997; Lycett *et al.*, 2006; Salmela *et al.*, 2022). Prvním je gen pro defensin 1, což je důležitý antimikrobiální peptid (Ganz, 2003). Dále se jedná o gen kódující sickie, což je regulátorem imunitních transkripčních faktorů (Foley & O'Farrell, 2004). Nakonec jsou to geny zapojené v autofagii a fagocytóze (Levine & Deretic, 2007; Strand, 2008).



Obr. 5: Lokalizace signálu Vg v tukovém tělisku včely medonosné pomocí protilátky zaměřené na N-list doménu Vg. A-C: Konfokální snímky buněk tukového těliska představující šest biologických vzorků. Levý panel zobrazuje jaderné značení pomocí DAPI, prostřední panel zobrazuje signál N-listu Vg díky vazbě sekundární protilátky s Alexa 568 a pravý panel zobrazuje překryv DAPI (azurová) a signálu N-listu Vg (červená). A: Signál N-listu Vg v jádrech kolokalizuje s DAPI. B: Zvětšení jedné buňky ukazující jadernou translokaci N-listu Vg. C: Buňky, které nevykazují kolokalizaci N-listu Vg s DAPI. Místo toho se signál Vg nachází v podobě zm v cytosolu. Měřítko = 10 μm (upraveno podle Salmela *et al.*, 2022).

2.3.5 Vazba na hydrofobní povrchy

Havukainen *et al.* (2013) objevili, že se vitellogenin může vázat na hydrofobní povrchy včetně buněčných membrán. Zejména pokrývá membrány, ve kterých došlo k pozměnění struktury lipidů, tedy u mrtvých buněk nebo těch, které vykazují první známky apoptózy. Vázání se na takové buňky spolu se schopností rychlé odpovědi na záněty jsou typickými vlastnostmi protizánětlivých lipoproteinů, které jsou však lépe prozkoumány u savců.

Lipidy poškozených membrán vyvolávají záněty, které jsou potlačovány tím, že jsou takové povrchy pokrývány právě lipoproteiny (Seong & Matzinger, 2004; Cho & Seong, 2009). Vitellogenin může takto přispívat k dlouhověkosti včel vzhledem k tomu, že chronické záněty podporují stárnutí (McGeer & McGeer, 2004; Licastro *et al.*, 2005).

2.4 Antioxidační funkce vitellogeninu

Harman (1956) ve své teorii tvrdí, že stárnutí je způsobeno nahromaděným oxidačním poškozením organismu. Tím pádem by dlouho žijící živočichové, jako je včelí matka, měli vytvářet méně reaktivních forem kyslíku, efektivněji je odstraňovat nebo lépe opravovat jimi způsobená poškození. Avšak Corona *et al.* (2005) porovnali osm antioxidačních genů a mitochondriálních proteinů zapojených do buněčné respirace v různých tkáních (hlava, hrud' a zadeček) mladých a starých matek a dělnic, přičemž zjistili, že se exprese těchto genů výrazně snižovala s věkem u matek, naopak rostla nebo se neměnila u dělnic a u starých matek byla výrazně nižší než u starých dělnic. Tento výsledek naznačuje, že vyšší exprese antioxidačních genů není zárukou dlouhého života u sociálního hmyzu. Nicméně stále je potřeba brát v úvahu možnost, že delší doba života je důsledkem menší produkce reaktivních forem kyslíku, jejich alternativního potlačování nebo lepší schopnosti opravovat oxidační poškození (Corona *et al.*, 2007).

Množství vitellogeninu v hemolymfě včelích dělnic koreluje s přežíváním včel po injekční aplikaci paraquat (N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid, organická látka, používá se jako herbicid, stimuluje tvorbu reaktivních forem kyslíku). V důsledku toho byl proveden pokus, při němž byl paraquat injekčně aplikován dělnicím se sníženou hladinou mRNA vitellogeninu (vg-) (pomocí metody RNAi) a normálním dělnicím (vg+), načež se míra přežití skupiny vg- snížila. Kontrolní dělnice vg- a vg+, kterým byla injekčním vpichem podána sterilní voda, přežily stejně. Z toho vyplývá, že pravděpodobně existuje příčinná souvislost mezi funkcí vitellogeninu a odolností včel vůči oxidačnímu stresu (Amdam *et al.*, 2003b; Seehuus *et al.*, 2006; Tufail & Takeda, 2008).

Dále bylo zkoumáno, zdali může mít vitellogenin antioxidační vlastnosti. Bylo tedy testováno, jak velké oxidační poškození ve formě karbonylace, vedoucí ke ztrátě funkce, způsobuje paraquat ve struktuře tohoto proteinu. Ukázalo se, že u vitellogeninu dochází ke karbonylaci více než u apolipoproteinu 1 a hexamerinu, tedy dalších hlavních proteinů hemolymfy, přičemž míra oxidace těchto tří proteinů negativně korelovala s množstvím

vitellogeninu v hemolymfě. Tyto poznatky naznačují, že vitellogenin může mít antioxidační funkci (Dalle-Donne *et al.*, 2006; Seehuus *et al.*, 2006).

V hemolymfě u skupiny vg- bylo objeveno, že imunitní buňky produkují vysoce reaktivní formy kyslíku (hROS) v podobné míře jako u buněk, které byly vystaveny 30% H₂O₂, a významně se odlišovaly od těch v kontrolní skupině. V hemolymfě včel skupiny vg- se navíc vyskytovalo zvýšené množství imunocytů ve fázi pyknózy. Pozorovány zde byly i volně se pohybující buňky tukového tělíska. Docházelo také k rozpadu aktinového cytoskeletu u tukového tělíska. Tato zjištění mohou signalizovat vztah mezi vyšší úmrtností u skupiny včel vg- a poškozením buněk včetně oxidačního v tukových tělískách (Seehuus *et al.*, 2006).

V jiném experimentu autorů Corona *et al.* (2007) byly porovnávány reakce matek a dělnic na injekční podání paraquatu. Matky, které mají vyšší hladinu vitellogeninu než dělnice, přežívaly ve vyšší míře. Patrně jsou tedy odolnější vůči oxidačnímu stresu.

Antioxidační vlastnosti vitellogeninu by mohly souviset s jeho schopností vázat se na zdravé buňky. V experimentu autorů Havukainen *et al.* (2013) byly hmyzí buňky („Hive Five“) inkubované s vitellogeninem více tolerantní vůči oxidačnímu stresu, způsobenému H₂O₂, než kontrolní buňky inkubované v pufovaném fyziologickém roztoku (PBS) nebo hovězím sérovém albuminu (BSA). Mezi kontrolními buňkami nebyl rozdíl. Cytoplazmatická membrána by mohla být ideálním místem, kde by vitellogenin mohl chránit buňky před oxidačním stresem, jelikož lipidy, tvořící její strukturu, jsou na oxidaci náchylné (Gasparovic *et al.*, 2013).

Při experimentu, který provedli Tarek *et al.* (2018), kdy se testovala exprese *vitellogeninu* v závislosti na orálním a lokálním podání tří insekticidů (imidaklopridu, klothianidinu a karbarylu), žily včely, kterým byly tyto látky podány, výrazně kratší dobu než kontrolní včely. Jejich délka života se zkrátila o 2-8 dnů (snížení o 7-27 %). Při podání neonikotinoidů (klothianidinu a imidaklopridu), které jsou spojovány s indukcí oxidačního stresu, došlo ke krátkodobě zvýšené expresi vg po 24 hod. od podání, avšak po 72 hod. se exprese výrazně snížila. Podobného výsledku, tedy dlouhodobého snížení exprese, bylo dosaženo i v jiné studii, kdy byly včely vystaveny akaricidům – thymolu a kumafosu (Boncristiani *et al.*, 2012; Balieira *et al.*, 2018; Tarek *et al.*, 2018; Abdelkader *et al.*, 2019).

Takto snížená exprese *vitellogeninu* mohla být příčinou kratší délky života včel, kterým byly podány neonikotinoidy. Jak naznačují předešlé experimenty, kdy byl

oxidační stres vyvolán paraquatem, vitellogenin může působit antioxidačně. Tedy v tomto případě, jeho snížená exprese mohla vést k narušení ochrany vůči oxidačnímu stresu (Seehuus *et al.*, 2006; Corona *et al.*, 2007; Tarek *et al.*, 2018).

Nicméně Christen *et al.* (2016) ve svém experimentu zjistili, že při vystavení včel imidaklopridu a klothianidinu dochází ke zvýšené expresi *vitellogeninu*. Takové rozdíly v expresi mezi experimenty od Tarek *et al.* (2018) a Christen *et al.* (2016) by mohly být dány rozdílnou tkání, ze které byla RNA extrahována, v prvním případě to byly celé včely, kdežto v tom druhém se jednalo o mozek a hrud'. Případně by příčinou mohly rozdíly ve způsobu krmení, kdy v prvním případě nově vylíhnuté včely dostaly jednu dávku insekticidů, kdežto v tom druhém byly létavky neznámého stáří krmeny těmito látkami jakožto součást cukrového sirupu (Tarek *et al.*, 2018).

Nicméně v novější studii, kdy byly včely vystaveny klothianidinu, nebyl naměřen rozdíl v množství vitellogeninu v hemolymfě oproti kontrolní skupině. V mozku se však podařilo detekovat zvýšenou hladinu fragmentu vitellogeninu o velikosti cca 150 kDa a v tukovém tělísku došlo k trojnásobnému nárůstu kompletního proteinu oproti kontrolní skupině (Christen *et al.*, 2019).

2.5 Využití metody RNAi k ovlivnění produkce vitellogeninu

Amdam *et al.* (2003c) použili metodu RNA interference (RNAi), kdy injekčně vpravili dvouřetězcovou RNA (dsRNA) do vajíček, načež došlo k výraznému snížení hladiny mRNA *vitellogeninu* u 15 % dospělých včel, vyvinutých z těchto vajíček. Avšak v případě, kdy byla injekce podána do zadečku již čerstvě vylíhnutých dospělých včel, se exprese *vitellogeninu* snížila u 96 % z nich. Z čehož vyplývá, že provedení RNAi metody u vajíček v období preblastodermy může sloužit k potlačení exprese tohoto genu ve fázích embrya, larvy i kukly. Avšak jako výrazně účinnější a jednodušší se jeví vpich dsRNA do zadečku dospělých dělnic.

Přechod ze stádia krmiček do stádia létavek je spojen s fyziologickými a sensorickými změnami, což znamená, že létavky mají typicky vyšší hladinu juvenilního hormonu, menší množství vitellogeninu a zvýšenou citlivost na podněty v podobě vody a sacharosy. Dříve se předpokládalo, že juvenilní hormon může být hlavním regulátorem změn chování, fyziologie a sensorické citlivosti u dělnic. Avšak se zjistilo, že hladina tohoto hormonu u dělnic je regulována vitellogeninem a snížením jeho exprese pomocí RNAi dochází

k nárůstu množství juvenilního hormonu v hemolymfě (Guidugli *et al.*, 2005b) a zvýšení chuťové citlivosti (Amdam *et al.*, 2006).

Vysoká chuťová citlivost znamená, že dělnice reagují již na nízké koncentrace sacharosy, zároveň létají pro potravu při nižším věku a sbírají více pylu a méně nektaru než včely s nízkou citlivostí (Pankiw & Page, 2000; Wang *et al.*, 2012).

Laboratorní podání látky imitující juvenilní hormon (hydrochlorinační reakční směs, tzv. Law-Williams) způsobuje zvýšení citlivosti na sacharosu (Jaycox *et al.*, 1974; Pankiw & Page, 2003) a zároveň snižuje syntézu vitellogeninu (Pinto *et al.*, 2000). To může být dáno regulační zpětnovazebnou smyčkou mezi vitellogeninem a juvenilním hormonem (Amdam & Omholt, 2003a; Guidugli *et al.*, 2005b). Není však známo, jestli podání této látky vede k cirkulaci juvenilního hormonu v hemolymfě v takové míře, která by byla fyziologicky významná. Proto je důležité zjištění, že při použití metody RNAi ke snížení exprese *vitellogeninu* dochází jak k nárůstu hladiny juvenilního hormonu, ale také chuťové citlivosti. Což by mohlo naznačovat, že vitellogenin hraje důležitou roli v regulaci dlouhodobých změn v chování včel (Amdam *et al.*, 2006).

Při experimentu autorů Wang *et al.* (2012) došlo ke zvýšení citlivosti na sacharosu, až když byla použita metoda RNAi k potlačení exprese *vitellogeninu* a zároveň *usp*, což je předpokládaný receptor juvenilního hormonu. Také se snížila rezistence vůči hladovění, zvýšila se hladina glukosy, trehalosy a juvenilního hormonu v hemolymfě a v tukových tělískách došlo ke změnám v expresi genů zapojených v signalizaci nutrientů. Fakt, že v tomto experimentu byla citlivost na sacharosu zvýšena až při snížení exprese *vitellogeninu* a *usp*, může být dán rozdílným prostředím, kde se včelstva nachází, a stářím včel. Přičemž chuťovou citlivost může ovlivnit i roční období, teplota či dostupnost nektaru (Pankiw & Page, 2003).

Experimentální snížení exprese *vitellogeninu* vede také k dřívějším letům za potravou. Což potvrzuje hypotézu, že vitellogenin má vliv na dělbu práce dělnic tím způsobem, že potlačuje přechod létavek do stádia krmiček (Amdam & Omholt, 2003a; Guidugli *et al.*, 2005b). Navíc byla u takto upravených včel naměřena o 1,29 dne kratší délka života oproti kontrolám, kterým byla podána dsRNA zeleného fluorescenčního proteinu (GFP). Kromě toho tyto létavky s uměle sníženou expresí *vitellogeninu* sbíraly větší množství nektaru oproti kontrolám. Nicméně celkové hodnoty byly stále v rozmezí normálního množství, které obvykle včely do úlu přináší (60 mg nektaru a 30 mg pylu) (Hunt *et al.*, 1995; Page *et al.*, 2000; Nelson *et al.*, 2007).

Fakt, že potlačení vitellogeninu vede k předčasnému přechodu do stavu létavek může naznačovat, že tento protein je jeho hlavním regulátorem. Marco Antonio *et al.* (2008) tedy navrhli model vývoje chování dělnic, skládající se ze tří kroků. V prvním kroku v období dospívání mladých dělnic dochází k postupnému nárůstu hladiny vitellogeninu, který zabraňuje přechodu do stádia létavek. Hladiny juvenilního hormonu a ekdysteroidu jsou na nízké úrovni (Jassim *et al.*, 2000; Hartfelder *et al.*, 2002), což pravděpodobně urychluje dospívání včel, zejména zlepšení jejich letových schopností (Fielding *et al.*, 1980; Harrison & Fewell, 2002; Roberts & Elekonich, 2005; Schippers *et al.*, 2006). Druhá fáze se týká krmiček, přičemž její délka závisí na potlačování syntézy juvenilního hormonu pomocí vitellogeninu, což odpovídá dvojitému represorovému modelu (Amdam & Omholt, 2003a). Jakmile však dochází ke snížení syntézy vitellogeninu (Guidugli *et al.*, 2005b), hladina juvenilního hormonu narůstá současně s probíhajícím přechodem do stádia létavek (Fahrbach & Robinson, 1996; Huang & Robinson, 1996; Robinson & Huang, 1998). Následuje potlačování tvorby vitellogeninu juvenilním hormonem (Pinto *et al.*, 2000), což zajišťuje stálou fázi létavek.

V jiném experimentu Zhang *et al.* (2022) nejprve provedli analýzu transkriptomu jednotlivých mozkových buněk matek a dělnic, které mají velmi podobné genomy, a zjistili, že vitellogenin je silněji exprimován v různých podskupinách gliových buněk u matek než u dělnic. Také pomocí RNAi metody snížili expresi *vitellogeninu* v brzké larvální fázi matek, načež pozorovali významné potlačení vývoje v dospělé jedince, což naznačuje určitou roli vitellogeninu v regulování diferenciaci včelích kast. Následně byla stejná metoda použita v pozdní larvální fázi (po 96 hod.), tedy v období, kdy je vývoj v matku již definitivně předurčen (Weaver, 1966). V takovém případě nebyl pozorován žádný vliv této metody. Tyto výsledky tedy naznačují, že vitellogenin může ovlivňovat vývoj matek již v brzké larvální fázi (Zhang *et al.*, 2022).

2.6 Vitellogenin, vg-like proteiny a jejich funkce

U blanokřídlých se nachází tři geny, které jsou homologní k *vitellogeninu*. Označují se *vg-like-A*, *-B* a *-C* (Morandin *et al.*, 2014). U včel leží gen *vg* na dvou chromosomech LG2 a LG4 (NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (31. 3. 2023)). *vg-like-A* je umístěn na chromosomu LG13, kdežto *vg-like-B* se spolu s *vg-like-C* nachází na chromosomu LG2 (Salmela *et al.*, 2016).

Expresse *vitellogeninu* i všech tří homologních genů probíhá u letních i zimních dělnic. Nejvíce se exprimuje *vg*, následně *vg-like-A* a *-B*, kdežto *vg-like-C* se exprimuje v malé míře. Přičemž exprese *vg-like-A* zimních dělnic je vyšší oproti letním podobně jako u *vg* (Dainat *et al.*, 2012). Tento fakt odpovídá předpokladům, že je *vg-like-A* zapojen v dlouhověkosti zimní generace dělnic, jako tomu je i u *vg* (Münch & Amdam 2010; Münch *et al.*, 2013). Nicméně se zjistilo, že se exprese *vg-like-A* může zvýšit u letních dělnic po podání injekce fyziologického roztoku nebo paraquatu při porovnání s kontrolními včelami, které nedostali žádnou injekci, a to dokonce více než v případě *vg*. Je možné, že *vg-like-A* je zapojen v melanizační reakci, ke které dochází po vpichu jehly. Například u potměníka moučného (*Tenebrio molitor* L.) se protein příbuzný vitellogeninu účastní syntézy melaninu (Lee *et al.*, 2000). U *vg-like-B* a *vg-like-C* vpich fyziologického roztoku nevyvolal nárůst exprese. Avšak injekce paraquatu měla za následek zvýšení exprese *vg-like-B*. Teoreticky tedy může mít tento gen jistou funkci v reakci na oxidační stres, ale nereaguje na mírný zánět způsobený vpichem jehly. U *vg-like-C* nedošlo ke změně exprese ani u jedné látky (Salmela *et al.*, 2016).

2.7 Expresse *vitellogeninu* v závislosti na potravě a prostředí

Zásobní funkce vitellogeninu je teoreticky životně důležitá pro přežívání včel v mírném podnebí (Amdam *et al.*, 2005b) a jeho syntéza je závislá na příjmu proteinů v potravě (Wheeler & Kawooya, 1990; Bitondi & Simões, 1996).

Větší množství potravy v určité oblasti pravděpodobně vede ke snížení výdajů ze zásob živin jednotlivých včel a také celého včelstva během sběru pylu a nektaru v okolí. Včelstva, u nichž se dochází ke zvýšení nutričního statutu (vyšší exprese *vitellogeninu*, *insulin-like peptidul* a větší množství lipidů), pochází z míst s větším množstvím potravy. V těchto místech produkují také více medu. S lepší kvalitou oblastí bohatších na potravu pravděpodobně souvisí i to, že pouze jedna zdejší kolonie se zmenšovala a žádná kolonie spontánně neuhynula během tříletého pozorování (Smart *et al.*, 2016).

Měření stavu výživy a imunitního systému u sedmidenních krmiček, které byly odebrány ze včelstev v září odhalilo čtyři ukazatele spojující zdraví včel s jejich přežíváním. Jednalo se o expresi *defensin1*, *vitellogeninu*, *lysozymu2* a v menší míře množství lipidů zadečku. Vyšší úroveň exprese *vg* a větší množství lipidů bylo pozitivně spjato s přežíváním, kdežto vyšší úroveň transkripce u genů pro antimikrobiální peptidy *defensin1* a *lysozym2* korelovala se schopností přežít negativně (Smart *et al.*, 2016).

Včelstva z oblastí, kde se nacházelo potenciálně největší množství potravy, měla nejvíce přineseného pylu za den, větší množství vitellogeninu, nižší hladiny defensinu 1 a lysozymu 2 a nejdelší délku života. Tyto poznatky naznačují spojitost mezi množstvím potravy v určité oblasti a včelí výživou a imunitou (Smart *et al.*, 2016).

V jiném experimentu autorů Ricigliano *et al.* (2018) bylo zjištěno, že se exprese *vitellogeninu* u krmiček i létavek lišila mezi různými oblastmi, kde se včelstva nacházela, a také v průběhu roku, což mohlo být dáno výkyvy podmínek prostředí nebo fenologií včelstva před zimou. Také byla pozorována korelace mezi celkovou velikostí snůšky, zásobami pylu a expresí *vg* u krmiček, přičemž se tento vztah také proměňoval podle období, kdy měření probíhalo.

Americký program pro konzervaci přírodních rezervací (US Conservation Reserve Program, CRP) by podle výzkumů měl mít kladný vliv na stanoviště včelstev (Otto *et al.*, 2016; Otto *et al.*, 2018). Na základě tohoto poznatku byl proveden experiment, kdy byly zkoumány dvě rozdílná včelstva v doletové vzdálenosti od CRP oblastí a další dvě včelstva v blízkosti hojně obdělávaných zemědělských ploch. Bylo zjištěno, že exprese *vitellogeninu* před zimou (říjen) i po zimě (únor) byla zhruba dvakrát vyšší u včelstev v blízkosti CRP oblastí než těch u obdělávaných ploch a exprese *vg* pozitivně korelovala s hmotností dospělých včel. Vzhledem k tomu, že vitellogenin je považován za nutriční marker, tyto výsledky naznačují zlepšení nutričního stavu včelstev poblíž CRP oblastí (Ricigliano *et al.*, 2019).

Kromě toho, že syntéza vitellogeninu závisí na podmínkách prostředí nebo dostupnosti živin, je také ovlivňována genetickými predispozicemi dělnic (Amdam *et al.*, 2004b). Adaptace produkce vitellogeninu na změny podmínek může u včelích poddruhů přispívat ke zvýšení odolnosti včelstev (Ihle, 2023).

Ihle (2023) ve svém experimentu pozorovala u včel ze čtyř různých populací, že na expresi *vitellogeninu* má vliv potrava, a přestože nebyl pozorován samostatný vliv populace, společný efekt populace s potravou zaznamenán byl, což naznačuje, že reakce na potravu se lišila v rámci rozdílných genetických podmínek. Výsledně byla exprese *vg* vyšší ve třech rozdílných populacích u volně se pohybujících včel ve včelstvu a včel, kterým byla v klíčkách podána pylová pasta se sacharosovým roztokem, oproti skupině včel, která byla krmena v klíčkách pouze tímto roztokem. Tento poznatek odpovídá předešlým výsledkům, které předpovídaly důležitost proteinů v potravě pro produkci vitellogeninu (Bitondi & Simões, 1996; Ricigliano *et al.*, 2021).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

Biologické centrum AV ČR (Česká republika): polyklonální králičí primární protilátka proti vitellogeninu

Bio-Rad (USA): Coomassie Brilliant Blue G-250 ($C_{47}H_{50}N_3NaO_7S_2$), Coomassie Brilliant Blue R-250 ($C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$), QC Colloidal Coomassie (komerční roztok), 5x iScript Reaction Mix, iScript Reverse Transcriptase, barvivo Sample Loading Dye

Fortis Life Sciences (USA): kozí anti-králičí sekundární protilátka s navázaným FITC (fluorescein isothiokyanát ($C_{21}H_{11}NO_5S$))

Lachema (Česká republika): methanol (CH_3OH)

Lach-Ner (Česká republika): chlorid draselný (KCl), chlorid sodný (NaCl)

Lonza (USA): agarosa pro gelovou elektroforézu

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

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

Nippon Genetics (Německo): barvivo pro DNA/RNA Midori Green Advance

PanReac, Applichem, ITW Reagents (Španělsko, Německo, Itálie): hovězí sérový albumin (frakce V) (BSA)

Promega (USA): GoTaq DNA Polymerase, PCR marker (50 lanes)

Serva (Německo): marker molekulové hmotnosti (Triple Color Protein Standard III, 5-245 kDa)

Sigma-Aldrich (Německo): akrylamid (C_3H_5NO), β -merkптоethanol (C_2H_6OS), ethanol (EtOH (C_2H_5OH)), kyselina fosforečná (H_3PO_4), kyselina chlorovodíková (HCl), guanidium isothiokyanát ($C_2H_6N_4S$), N,N'-metylen-bis-akrylamid (bisakrylamid ($C_7H_{10}N_2O_2$)), DAPI (2-(4-amidinofenyl)-6-indolkarbamidin) ($C_{16}H_{15}N_5 \cdot 2HCl$), dodecylsírán sodný (SDS ($NaC_{12}H_{25}SO_4$)), peroxodisírán amonný (APS ($(NH_4)_2S_2O_8$)), N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED ($C_6H_{16}N_2$)), EDTA (kyselina ethylendiaminotetraoctová, $C_{10}H_{16}N_2O_8$), glycin ($C_2H_5NO_2$), *n*-butanol (C_4H_9OH), dithiotreitol (DTT ($C_4H_{10}O_2S_2$)), glycerol ($C_3H_8O_3$), kyselina octová (CH_3COOH), bromfenolová modř (3,3',5,5'-tetrabromfenolsulfonftalein ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$)), dimethylsulfoxid (DMSO (C_2H_6OS)), chlorid hořečnatý ($MgCl_2$), Tween-20

(C₅₈H₁₁₄O₂₆), dihydrogenfosforečnan draselný (KH₂PO₄), hydrogenfosforečnan sodný (Na₂HPO₄), hydrogenfosforečnan draselný (K₂HPO₄), nitrotetrazoliová modř (NBT (C₄₀H₃₀Cl₂N₁₀O₆)), p-fenylen diamin (C₆H₈N₂), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát (BCIP (C₈H₆BrClNO₄P)), trifluoroctová kyselina (TFA, C₂HF₃O₂), dimethylformamid (DMF, C₃H₇NO), aceton (C₃H₆O), Triton X-100 (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_{n(n=9-10)}), hovězí sérový albumin (BSA), marker molekulové hmotnosti (SigmaMarker wide range 6,5-200 kDa), sekundární protilátka (kozí anti-králičí protilátka s navázanou alkalickou fosfatase (EC 3.1.3.1)), paraformaldehyd (OH(CH₂O)_nH_(n=8-100)), sacharosa (C₁₂H₂₂O₁₁), lipopolysacharidy (LPS) (*E. coli* sérovar O111:84), paraquat (PQ) (N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichlorid hydrát) (C₁₂H₁₄Cl₂N₂·xH₂O)

Thermo Fisher (USA): SYBR Select Master Mix

Elisabeth Pharmacon (Česká republika), **Sigma-Aldrich** (Německo): Primery pro geny (v závorce název primerů): *elongation factor 1-alpha F2* (EF1), *40S ribosomal protein S5* (RPS5), *vitellogenin* chromosom LG2+LG4 (VgLG2+LG4), *vitellogenin* chromosom LG2 (VgLG2), *vitellogenin* chromosom LG4 (VgLG4) a *vg-like-B* (Vg-like-B)

3.1.2 Použité roztoky

- Koloidní Coomassie Brilliant Blue G-250 (komerční roztok)
- Zásobní roztok Coomassie Blue (50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 v 25 ml EtOH a 50 ml 85 % kys. fosforečné, doplněno ddH₂O na 100 ml)
- Akrylamid/N,N'-mehylenbisakrylamid (AA/BIS): 30 % (w/v) akrylamidu, 0,8 % bisakrylamidu (w/v) v ddH₂O (30 g akrylamidu + 0,8 g bisakrylamidu rozpustit v 60 ml ddH₂O a doplnit ddH₂O do 100 ml)
- Pufr do dělicího gelu: 1,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 8,8 (36,3 g Tris rozpustit ve 150 ml ddH₂O, upravit pH na 8,8 s HCl a doplnit ddH₂O na 200 ml)
- Pufr do zaostřovacího gelu: 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8 (3 g Tris rozpustit ve 40 ml ddH₂O, upravit pH na 6,8 s HCl a doplnit ddH₂O na 50 ml)
- 10% (w/v) SDS (10 g SDS rozpustit v ddH₂O a doplnit ddH₂O do 100 ml)
- Vodou nasycený *n*-butanol (k 50 ml *n*-butanolu přidat 5 ml ddH₂O, protřepat)
- 10% (w/v) peroxosíran amonný (APS) (0,1 g peroxosíranu amonného rozpustit v 1 ml ddH₂O)

- Vzorovací pufr (2x Laemmli): $0,125 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) glycerol, $0,2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT, 0,02 % (w/v) bromfenolová modř, pH 6,8 (2,5 ml pufru do zaostřovacího gelu, 4 ml 10% SDS, 2 ml glycerolu, 2 mg bromfenolové modři, 0,31 g DTT, doplnit ddH₂O do 10 ml)
- Elektrodotový pufr: $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, $0,192 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3 (6,05 g Tris, 28,82 g glycinu a 2 g SDS rozpustit v 1 l ddH₂O, zkontrolovat pH, doplnit ddH₂O do 2 l)
- GITC pufr ($5,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ guanidine isothiokyanát, $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 6,4), $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, 1,3% Triton X-100, 1% β-merkapt ethanol) (124,16 g guanidine isothiokyanátu a 1,169 g EDTA rozpustit v 100 ml $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl, přidat 2,6 ml Triton X-100 a po autoklávování 2 ml β-merkapt ethanolu, doplnit ddH₂O do 200 ml)
- Barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB): 0,1 % (w/v) CBB R-250 v 10% (v/v) kys. octové a 50% (v/v) methanolu (0,1 g CBB R-250 rozpustit v roztoku 10 ml kys. octové, 50 ml methanolu a 40 ml ddH₂O)
- 50x TAE pufr (121 g Tris rozpustit v 28,55 ml kyseliny octové a 50 ml $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA, doplnit ddH₂O do 500 ml, 50x zředit před použitím)
- Odbarvovací roztok po barvení gelu CBB R-250: 40 % (v/v) methanol, 10 % kys. octová (40 ml methanolu, 10 ml kys. octové a 50 ml ddH₂O)
- Barvicí roztok s Ponceau S: 0,2 % Ponceau S v 10% (v/v) kys. octové (0,2 g Ponceau S rozpustit v roztoku 10 ml kys. octové a 90 ml ddH₂O)
- Zalévací („mounting“) médium (0,1% p-fenylen diamin, 90 % glycerol, 10 % PBS, pH 8,45) (0,03 g p-fenylen diaminu rozpustit s 3 ml PBS a 27 ml glycerolu)
- Blotovací pufr: $0,025 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, $0,192 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ glycinu, 20 % (v/v) methanol, pH 8,3 (3,025 g Tris a 14,41 g glycinu rozpustit ve 200 ml ddH₂O, přidat 200 ml methanolu, zkontrolovat pH, doplnit ddH₂O do 1 l)
- Fixační roztok pro barvení CBB R-250: 10 % (v/v) kys. octová, 50 % (v/v) methanol (10 ml kys. octové, 50 ml methanolu, 40 ml ddH₂O)
- Fixační roztok pro barvení koloidním CBB G-250: 10 % (v/v) kys. octová, 40 % (v/v) ethanol (10 ml kys. octové, 40 ml ethanolu, 50 ml ddH₂O)
- Fosfátový pufr (rozpustit 16,282 g hydrogenfosforečnanu draselného a 0,8878 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 800 ml ddH₂O, upravit pH na 6,8 a doplnit ddH₂O do 1 l)

- 5x TBS (solný roztok pufrovaný Tris) pracovní pufr pro imunodetekci (5x TBS): 100 mmol·l⁻¹ Tris, 2,5 mol·l⁻¹ NaCl, pH 7,5 (24,2 g Tris a 292,2 g NaCl rozpustit v 1 l ddH₂O, upravit pH na 7,5 s HCl, doplnit ddH₂O do 2 l)
- Roztok 5% BSA v PBS pufru (rozpustit 5 g BSA v 80 ml PBS a doplnit PBS do 100 ml)
- PBS pufr (rozpustit 8 g chloridu sodného, 0,2 g chloridu draselného, 1,44 g hydrogenfosforečnanu sodného a 0,245 g dihydrogenfosforečnanu draselného v 800 ml ddH₂O, upravit pH na 7,4 pomocí HCl a doplnit ddH₂O do 1 l)
- Blokovací roztok 5% BSA v PBS pufru a 0,1% Triton X-100 (rozpustit 5 g BSA v 80 ml PBS, přidat 0,1 ml Triton X-100 a doplnit PBS do 100 ml)
- Roztok PBS s 0,1% Triton X-100 a DAPI (k 29,997 ml roztoku PBS s 0,1% Triton X-100 přidat 0,003 ml 2,86mmol·l⁻¹ DAPI)
- Blokovací roztok 1% BSA v TBS (rozpustit 0,1 g BSA v 10 ml TBS (4 ml 5x TBS a 16 ml ddH₂O))
- Roztok 4% agarosy (8 g agarosy rozpustit ve 150 ml ddH₂O a doplnit ddH₂O do 200 ml)
- Roztok LPS v 50% sacharose (LPS - 15, 30, 60 µg·ml⁻¹ 50% roztoku sacharosy)
- Roztok paraquatu v 50% sacharose (PQ – 25 a 50 mmol·l⁻¹ 50% roztoku sacharosy)
- Roztok 0,1% TFA (trifluoroctové kyseliny) (0,1 ml TFA smíchat s 99,9 ml ddH₂O)
- Fixační roztok 4% paraformaldehydu (0,8 g paraformaldehydu rozpuštěno v 15 ml ddH₂O a doplněno ddH₂O do 20 ml)
- Roztok sekundární protilátky s navázaným FITC v 5% BSA v PBS pufru s 0,1% Triton X-100: (k 29,940 ml roztoku 5% BSA v PBS pufru s 0,1% Triton X-100 přidat 0,06 ml sekundární protilátky s FITC)
- Roztok primární protilátky (4 µl primární protilátky a 9996 µl roztoku 1% BSA v TBS)
- Roztok sekundární protilátky (0,67 µl sekundární protilátky a 9999,33 µl roztoku 1% BSA v TBS)
- Tween TBS (TBS-T) (0,15 ml Tween-20 a 300 ml TBS (60 ml 5x TBS a 240 ml ddH₂O))

- Roztok NBT-BCIP pro detekci alkalické fosfatasy (33 μ l roztoku NBT (10% NBT v 70% DMF), 33 μ l roztoku BCIP (5% BCIP v 100% DMF), 10 ml pufru pro alkalickou fosfatasy (100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgCl_2 , 100 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris-HCl (pH 9,5)))

3.1.3 Přístroje a vybavení

- Analytické váhy (Radwag, Česká republika)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Blotovací komůrka Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA)
- Blotovací papír ALBET (ScienceLab, USA)
- Centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga 5424 R (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga pro destičky (VWR, USA)
- Destička (12 jamek) (Techno Plastic Products, Švýcarsko)
- Destička Take3 (BioTek Instruments, USA)
- Digitální předvážky (Radwag, Česká republika)
- Elektroforetická sestava MINI-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, USA)
- Elektroforetická sestava MULTISUB MIDI 10 CLEAR SIGHT (Clever Scientific, UK)
- Homogenizační sáčky (Extraction Bags “Universal“) (Bioreba, Švýcarsko)
- Homogenizátor BagMixer (Interscience, Francie)
- Inkubátor Dry Bath (Major Science, USA)
- Kit pro izolaci RNA NucleoSpin RNA plus (Binding Solution (BS), gDNA Removal Column, RNA Plus Column, Collection Tube (2ml), Collection Tube (1,5 ml), Wash Buffer 1 (WB1), Wash Buffer 2 (WB2), RNase-free voda, Lysis Buffer (LBP) (Macherey-Nagel, Německo)
- Konfokální laserový skenovací mikroskop LSM710 (Carl Zeiss, Německo)
- Magnetická míchačka Big Squid (IKA, Německo)
- Mikrodestička (96 jamek) (Techno Plastic Products, Švýcarsko)
- Mikrodestičkový spektrofotometr PowerWave XS (BioTek Instruments, USA)
- Multidetekční reader Synergy H1 (BioTek Instruments, USA)
- Nitrocelulosaová membrána (póry o velikosti 0,45 μm) (Bio-Rad, USA)

- Petriho misky (Techno Plastic Products, Švýcarsko)
- Přístroj pro dokumentaci gelů Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)
- PCR destička 96 jamek (Deltalab, Španělsko)
- PCR fólie (Deltalab, Španělsko)
- Sklíčka podložní a krycí (Thermo Fisher, USA)
- Svářečka plastových fólií (200 H, KF)
- Termocykler CFX96 (BioRad, USA)
- Termocykler T100 (BioRad, USA)
- Třepačka 3D (Biosan, Lotyšsko)
- Vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)
- Vibratom VT1000 S (Leica, Německo)
- Zdroj pro elektroforézu PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

3.1.4 Biologický materiál

Letní dělnice včely medonosné byly poskytnuty Mgr. Jiřím Danihlíkem, Ph.D. v srpnu 2022. Matky a zimní dělnice byly poskytnuty Mgr. Bronislavem Grunou v listopadu 2022.

3.2 Metody

3.2.1 Krmení včel a příprava vzorků

Před samotným krmením byly letní dělnice uspány pomocí plynného oxidu uhličitého (CO₂) po dobu 1 min. a roztrženy do plastových klíček, podle skupin odpovídajících rozdílnému stáří (1-2 a 2-3 dny pro krmení roztokem LPS a 1-2 dny pro krmení roztokem PQ) a rozdílným koncentracím LPS a PQ ve stravě (Tab. 1). Včely byly krmeny *ad libitum* z plastových stříkaček obsahujících 3-5 ml roztoku 50% sacharosy s LPS (15, 30 a 60 µg·ml⁻¹) nebo 50% sacharosy s PQ (25 a 50 mmol·l⁻¹) nebo 50% sacharosy (kontrolní skupina), přičemž byly uchovávány při 30 °C. Po krmení dlouhém 24 nebo 48 hod. byly včelám odstrženy zadečky a pomocí automatické pipety byly odebrány 2 µl hemolymfy z hrudí jednotlivců, aby nedošlo ke kontaminaci z trávicího traktu. U experimentu s LPS byla hemolymfa ze tří včel (celkem 6 µl) smíchána se 100 µl 0,1% TFA. U experimentu s PQ byla hemolymfa z deseti včel (celkem 20 µl) smíchána se 100 µl 0,1% TFA. Takto získané vzorky a zbývající celé včely byly zamrazeny při

-80 °C. Následně byly vzorky hemolymfy lyofilizovány a opět zamraženy pro další použití.

Stejný postup byl aplikován u včelích matek a zimní generace dělnic s několika rozdíly. Matky a dělnice byly po usnutí rozděleny do klíček podle krmení (kontrola – 50% sacharosa, LPS – 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 50% sacharose a PQ – 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose). Matky byly krmeny po dobu 24 hod., kdežto dělnice i po dobu 48 hod. Hemolymfa byla odebírána pouze včelám po 24hod. krmení. 2 μl hemolymfy byly smíchány se 100 μl 0,1% TFA, zamraženy při -80 °C, lyofilizovány a opět zamraženy. Vzhledem k tomu, že krmení LPS po dobu 24 hod. a PQ po dobu 24 i 48 hod. nepřežil dostatečný počet dělnic, byly zamraženy celé včely pouze po 48hod. krmení LPS. Z dalších matek i dělnic (kromě krmení PQ po dobu 48 hod.) byly po krmení odebrány i žaludky. Včely byly uspány pomocí oxidu uhličitého (CO_2) po dobu 1 min. Následně byl uchycením posledního článku zadečku vytáhnout trávicí trakt pomocí pinzety. Skalpelem byl oddělen žaludek od ostatních částí traktu, načež byl vložen do 1 ml fixačního roztoku 4% paraformaldehydu v mikrozkuhavce a skladován při 4 °C do dalšího použití.

Tab. 1: Rozpis vzorků a jejich využití při jednotlivých metodách.

Včelí kasta	Stáří (dny)	Krmení	Doba krmení (hod.)	Tělní část	Metoda
Letní dělnice	1-2 2-3	LPS (15, 30 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	24/48	HL*	Bradf. met. SDS-PAGE Western blot
Letní dělnice	1-2	PQ (25 a 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	2/4/8	HL*	Bradf. met. SDS-PAGE Western blot MALDI [‡]
Zimní dělnice	-	LPS (30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) PQ (50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	24	HL* Ž [†]	Bradf. met. SDS-PAGE Western blot
Matky	-	LPS (30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) PQ (50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	24	HL* Ž [†]	Imunohisto-chem. det.
Zimní dělnice	-	LPS (30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	48	Ž [†]	Imunohisto-chem. det.
Letní dělnice	1-2 2-3	LPS (30 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	48	celé včely	qPCR
Zimní dělnice	-	LPS (30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	48	celé včely	qPCR

*hemolymfa, [†]žaludek, [‡]pouze vzorky z krmení po dobu 8 hod.

3.2.2 Stanovení proteinů Bradfordovou metodou

3.2.2.1 Příprava roztoku Bradfordova činidla

Zásobní roztok Coomassie Blue byl v poměru 1:4 naředěn ddH₂O (2,4 ml zás. roztoku a 9,6 ml ddH₂O). Výsledný pracovní roztok má hnědomodrou barvu a je stabilní cca týden při 4 °C.

3.2.2.2 Příprava standardů proteinu BSA

Zásobní roztok BSA o hmotnostní koncentraci 4 mg·ml⁻¹ (4000 µg·ml⁻¹) byl připraven tak, že 200 mg BSA bylo rozpuštěno v 50 ml ddH₂O. Poté byla postupným ředěním připravena kalibrační řada BSA o koncentracích 0,001; 0,25; 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 1,75; 2,00; 2,25; 2,50; 2,75; 3,00; 3,25; 3,50; 3,75; 4,00 mg·ml⁻¹.

3.2.2.3 Postup spektrofotometrického měření standardů BSA

Koncentrace proteinů byla měřena podle protokolu Bradforda (1976). Do 54 jamek (blank + 17 vzorků, 3 opakování v řádku) 96jamkové mikrodestičky bylo napipetováno postupně: 45 µl ddH₂O, 5 µl připraveného standardu BSA (pro blank 5 µl ddH₂O), 200 µl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Následně byla destička zakryta víkem, jemnými pohyby protřepána. Po 5 min., během kterých došlo k vyvinutí zbarvení, byla změřena absorbance na mikrodestičkovém spektrofotometru PowerWave XS při vlnových délkách 590 a 450 nm, pro zvýšení přesnosti a citlivosti metody (Zor & Selinger, 1996). Data z tohoto měření byla vyhodnocena pomocí programu Gen5 v podobě grafu kalibrační křivky závislosti poměru absorbance při vlnových délkách 590/450 nm na koncentraci standardů proteinu BSA (hodnoty absorbance při koncentracích 3,25-4,00 mg·ml⁻¹ byly z grafu vyjmuty kvůli nepřesnostem při pipetování).

3.2.2.4 Příprava vzorků proteinu z hemolymfy včel

Vzorky lyofilizované hemolymfy byly rozmrazeny ponecháním v pokojové teplotě po dobu 20 min., naředěny přidáním 50 µl ddH₂O a promíchány na vortexu po dobu 1 min.

3.2.2.5 Postup spektrofotometrického měření proteinů

Do jamek (3 opakování v řádku) mikrodestičky bylo postupně napipetováno 45 µl ddH₂O, 5 µl vzorku hemolymfy a 200 µl pracovního roztoku Bradfordova činidla.

Mikrodestička byla zakryta víkem a protřepána. Po 5 min., během kterých došlo k vyvinutí zbarvení, byla na mikrodestičkovém spektrofotometru PowerWave XS změřena absorbance při vlnových délkách 590 a 450 nm. Data z tohoto měření byla vyhodnocena pomocí programu Gen5 (BioTek Instruments, USA). Koncentrace proteinů ve vzorcích byla následně vypočítána pomocí kalibrační křivky závislosti poměru absorbance při vlnových délkách 590/450 nm na koncentraci standardů proteinu BSA, které byly změřeny předtím.

3.2.3 Metoda SDS-PAGE a Western blot

3.2.3.1 Příprava vzorků

Ke vzorkům lyofilizované hemolymfy bylo přidáno 50 μ l (v experimentu s LPS u letních včel a experimentu s matkami a zimními dělnicemi) nebo 166,67 μ l (v experimentu s PQ u letních včel) fosfátového pufru. 10 μ l takto naředěné hemolymfy bylo smícháno s 90 μ l ddH₂O a 100 μ l vzorkovacího pufru. Takto připravené vzorky byly promíchány na vortexu po dobu 20 s. a zahřáty na 70 °C v inkubátoru po dobu 15 min. Následně byly ochlazeny v ledové lázni a centrifugovány v centrifuze 5 min. při 15000 g a 4 °C.

3.2.3.2 Metoda SDS-PAGE

Skleněné desky pro nalévání gelu byly očištěny pomocí ethanolu. Mezi ně byly vloženy plastové hřebínky a na držáky skel byla vyznačena vzdálenost 1 cm od konce zubů hřebínku. Následně byly hřebínky vyjmuty.

Do dvou kádínek pro přípravu zaostřovacího a dělicího gelu byly napipetovány jednotlivé roztoky (tedy složky gelu):

- 7% dělicí gel: 2,3 ml AA/BIS (30%/0,8%); 2,5 ml pufru Tris-HCl (1,5 mol·l⁻¹; pH 8,8); 5,1 ml ddH₂O; 0,1 ml SDS (10%); 0,01 ml TEMED
- 4% zaostřovací gel: 1,3 ml AA/BIS (30%/0,8%); 2,5 ml pufru Tris-HCl (0,5 mol·l⁻¹; pH 6,8); 5,9 ml ddH₂O; 0,2 ml SDS (10%); 0,02 ml TEMED

Čerstvě připravený roztok APS o objemu 0,07 ml byl přidán do kádinky pro dělicí gel, čímž byla zahájena polymerace gelu. Takto připravená směs byla po promíchání na magnetické míchačce Big Squid rychle nanášena pomocí Pasteurovy pipety do prostoru mezi skly až po značku na držáku.

Na směs dělicího gelu byla nanášena tenká vrstva *n*-butanolu. Jakmile dělicí gel po cca 30 min. ztuhnul, byl *n*-butanol odstraněn a oblast nad povrchem dělicího gelu byla opláchnuta destilovanou vodou pomocí stříčky a vysušena filtračním papírem.

Následně bylo do kádinky pro zaostřovací gel přidáno 0,12 ml APS, směs byla rychle promíchána na magnetické míchače a přenesena Pasteurovou pipetou do prostoru mezi skly na již ztuhlý dělicí gel. Do směsi pro zaostřovací gel byly opatrně vloženy hřebínky. Zaostřovací gel ztuhnul po 30 min.

Na vnější straně silných skel byly vyznačeny zuby hřebíků, které byly poté opatrně vyjmuty. Skla obsahující připravené gely byla vložena do elektroforetické komůrky MINI-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, USA), do níž byl poté nalit dostatečný objem elektrodového pufru, aby přetekl do jamek gelu a dosahoval po risku komůrky.

Do krajních jamek (č. 1 a 15) gelů bylo automatickou pipetou aplikováno 4,5 μ l markeru molekulové hmotnosti proteinů (SigmaMarker wide range 6,5-200 Da) (v případě experimentu, kdy následovala metoda MALDI byl použit Triple Color Protein Standard III, 5-245 kDa pro lepší viditelnost pásů po provedení metody Western blot). Do jamek mezi markery bylo postupně aplikováno 10 μ l jednotlivých vzorků podle skupin či krmení a pozitivního kontrolního vzorku hemolymfy (včely krmené 50% sacharosovým roztokem s *P. larvae* kmen CCM 4483 (2.4×10^4 CFU), poskytnuto Mgr. Silvií Dostálkovou, Ph.D.). Elektroforetická komůrka byla poté uzavřena víkem a připojena ke zdroji elektrického napětí, kde bylo nastaveno konstantní napětí 100 V.

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

Po doputování pásu bromfenolové modři v gelu téměř na úroveň dolního okraje skel (po další cca 1 hod.) byl zdroj napětí vypnut, elektrické kabely vypojeny, víko odejmuto a elektrodový pufr vylit. Plastovou špachtlí byla oddělena skla a gely byly označeny odkrojením levého dolního rohu (pro zorientování při vyhodnocování pásů na gelu).

Gely byly špachtlí rozděleny na poloviny a polovina z každého gelu uložena do plastových krabiček s 20 ml fixačního roztoku pro barvení Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) a ponechána na třepače 3D 15 min. Ke gelům bylo po vylití fixačního roztoku přidáno 20 ml barvicího roztoku CBB a v plastových krabičkách byly ponechány na třepače 30 min. Barvicí roztok CBB byl poté odlit a gely byly pětkrát promyty 20 ml odbarvovacího roztoku. Po jeho vylití byly gely pětkrát promyty 20 ml ddH₂O.

Pro následné provedení maticí asistované laserové desorpce/ionizace (MALDI) byly gely fixovány 15 min. ve fixačním roztoku pro koloidní barvení CBB G-250, poté barveny ve 20 ml barviva QC Colloidal Coomassie Stain přes noc (18 hod.) na třepače a po odstranění barvicího roztoku byly třikrát promyty ve 20 ml ddH₂O po dobu 3 hod. Tyto gely byly předány panu prof. Mgr. Marku Šebelovi, Dr., který provedl jejich analýzu pomocí MALDI.

Za použití dokumentačního přístroje Gel Doc EZ Imager a programu Image Lab (Bio-Rad, USA) byly gely po barvení CBB naskenovány pro následné vyhodnocení.

K semikvantitativnímu vyhodnocení intenzity pásů celkových proteinů (pro normalizaci při vyhodnocování intenzity pásů vitellogeninu po provedení metody Western blot) byl použit program ImageJ (National Institutes of Health and the Laboratory for Optical and Computational Instrumentation, USA).

3.2.3.3 Metoda Western blot

Druhé poloviny gelů byly ponořeny po dobu 20 min. do 20 ml blotovacího pufru spolu s filtračními papíry a nitroceluloseovou membránou, která předtím byla vystřižena podle velikosti gelu (4,5 x 4 cm).

Na anodu (spodní elektrodu) blotovací komůrky Trans Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad, USA) byly pokládány jednotlivé vrstvy v tomto pořadí: 1 ks filtračního papíru, nitroceluloseová membrána, gel, 1 ks filtračního papíru. Skleněnou tyčinkou byly odstraněny vzduchové bubliny mezi gelem a membránou. Poté byla na horní filtrační papír přiložena katodová elektroda. Komůrka byla uzavřena víkem a připojena ke zdroji napětí, kde byl nastaven konstantní proud 90 mA pro jeden gel. Po 1 hod. bylo blotování ukončeno, zdroj napětí odpojen, membrána pomocí pinzety opatrně vyjmuta a ponořena do 20 ml barvicího roztoku Ponceau S v plastové krabičce po dobu 5 min. Následně byl roztok odlit, membrána byla třikrát promyta ve 20 ml ddH₂O a použita pro imunochemické detekování proteinů.

Imunochemické detekování proteinů bylo započato blokací membrány v 10 ml blokovacího roztoku 1% BSA v TBS na třepače přes noc (18 hod.) při 4 °C. Dále byla dvakrát promyta v 10 ml roztoku Tweenu-20 v TBS (TBS-T) po dobu 10 min. Poté byla membrána inkubována v 10 ml roztoku primární protilátky (ředění 1:2500) v 1% BSA v TBS po dobu 1,5 hod. Následně byla opět dvakrát promyta 10 ml roztoku TBS-T po dobu 10 min. Poté byla inkubována v 10 ml roztoku sekundární protilátky (ředění

1:15000) v 1% BSA v TBS. Opět byla dvakrát promyta 10 ml roztoku TBS-T po dobu 10 min. Načež byla membrána inkubována v 10 ml roztoku NBT-BCIP pro detekování alkalické fosfatasy po dobu 10 min. Poté byla membrána pětikrát promyta 10 ml ddH₂O, načež byla položena na skleněnou podložku a vyfocena mobilním telefonem pro následné vyhodnocení.

Intenzita jednotlivých pásů vitellogeninu byla normalizována k intenzitě pásů celkových proteinů v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Ke změření intenzity pásů byl použit software ImageJ (National Institutes of Health, Laboratory for Optical and Computational Instrumentation (LOCI, University of Wisconsin)). Normalizovaná intenzita byla poté vypočítána tak, že intenzita pásů vitellogeninu byla dána do poměru se součtem intenzit pásů celkových proteinů na SDS-PAGE gelu a vyobrazena v podobě grafů v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA).

3.2.4 Metoda qPCR

Celé včely byly rozmrazeny ponecháním 30 min. při pokojové teplotě. Homogenizační sáčky byly rozděleny na poloviny tak, že byl svářečkou plastových folií vytvořen v jejich středu spoj. Do těchto polovin sáčků byly vloženy vždy tři včely, odpovídající jednomu vzorku. Následně bylo ke včelám přidáno 1800 μ l GITC pufru a sáček byl na svářečce zataven v horní části. Včely byly homogenizovány v homogenizátoru BagMixer (Interscience, Francie) po dobu 1 min., následně pomocí tloučku 20 s. a opět v homogenizátoru po dobu 1 min. Homogenizované vzorky v GITC pufru byly v digestoři přeneseny ze sáčků do sterilních 2ml mikrozkušavek, které byly následně centrifugovány (16 000 g, 5 min) na centrifuze 5424 R. Izolace RNA byla provedena podle návodu výrobce (Macherey-Nagel, Německo) kitu pro izolaci RNA NucleoSpin RNA plus. Izolovaná RNA byla zředěna v 60 μ l vody bez RNAas, načež byla provedena analýza její koncentrace a integrity.

Na destičku Take3 byly nejprve napipetovány 2 μ l PCR-vody (blank) a poté 2 μ l vzorků v duplikátu. Destička byla vložena do multidetekčního readeru Synergy, H1 a naměřené hodnoty koncentrace a čistoty RNA byly vyexportovány v programu Microsoft Excel 2016. Koncentrace by měla být vyšší než 100 ng \cdot μ l⁻¹. Poměr hodnot absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm by měl být ~ 2, což je považováno za čistou RNA.

Integrita RNA byla zkontrolována na agarosovém gelu. V Erlenmayerově baňce bylo rozpuštěno 0,55 g agarosy v 50 ml 1x TAE pufru a v mikrovlnné troubě zahřáto na teplotu cca 95 °C. Následně byl roztok zchlazen na cca 60 °C, byly do něj přidány 2 µl barviva Midori Green Advance a promíchán. Roztok byl nalit do elektroforetické formy pro přípravu gelu, byl do něj vložen hřebínek a roztok byl ponechán ztuhnout min. 30 min. Ze ztuhlého gelu byl vytáhnut hřebínek a i s formou byl vložen do elektroforetické vany MULTISUB MIDI 10 CLEARSIGHT (Clever Scientific, UK) tak, aby jamky pro vzorky byly blíže katodě. Vana byla naplněna po rysku 1x TAE puftrem. 2 µl vzorků byly na proužku parafilmu smíchány s 2 µl barviva Gel Loading Dye a 4 µl vody bez RNAas. Do druhé jamky gelu byly nanесeny 3 µl PCR markeru a do dalších jamek byly napipetovány připravené vzorky. Elektroforetická vana byla zakryta víkem a zapojena do zdroje, kde bylo nastaveno napětí 80 V a čas 60 min a spuštěna elektroforéza. Po jejím dokončení byl vypnut zdroj a gel byl vyjmut z elektroforetické vany. Gel byl vložen do přístroje Gel Doc EZ Imager a přítomnost a integrita RNA vyhodnocena v programu Image Lab. Zkontrolováno bylo, zdali jsou v jednotlivých drahách gelu přítomny pásy odpovídající podjednotkám 28S a 18S. 28S pás by měl mít 2x větší intenzitu než ten odpovídající produktu 18S. Také se kontrolovala integrita RNA, tedy jasně ohraničené pásy RNA bez šmouh.

V dalším kroku byl proveden přepis RNA do cDNA. Vzorky RNA byly naředěny vodou bez RNAas na koncentraci 50 ng·µl⁻¹. Poté byl připraven reakční mix obsahující na jednu reakci 2 µl 5x iScript Reaction Mix a 0,5 µl iScript Reverse Transcriptase. Do 200µl mikrokumavek (stripy) bylo na jednu stranu napipetováno 2,5 µl reakčního mixu a na druhou stranu 7,5 µl ředěné RNA. Mikrokumavky byly krátce (10 s.) centrifugovány a vloženy do Termocykleru T100, ve kterém byl spuštěn protokol iScript (Tab. 2). Po ukončení přepisu do cDNA bylo ke každému vzorku přidáno 70 µl vody bez RNAas (finální objem – 80 µl).

Tab. 2: Reakční protokol iScript.

Krok	Čas (min.)	Teplota (°C)
„Priming“	5	25
Reverzní transkripce	20	46
Inaktivace reverzní transkripce	1	95
	∞	4

Po přepisu do cDNA byl provedena kontrola kvality pomocí endpoint PCR. Nejprve byl připraven premix obsahující na 1 reakci 0,5 µl primeru F („forward“), 0,5 µl primeru R („reverse“), 4,75 µl PCR-vody a 6,25 µl GoTaq polymerase. Do stripů bylo pipetováno 12 µl namíchaného premixu na jednu stranu a 0,5 µl cDNA nebo PCR-vody jako negativní kontroly na druhou stranu. Stripy byly vloženy do Termocykleru T100 a poté byl spuštěn protokol GoTaq (Tab. 3).

Tab. 3: Reakční protokol GoTaq.

Krok	Čas (s.)	Teplota (°C)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	120	95	1
Denaturace	40	95	
Nasednutí	30	60	35
Prodlužování	60	72	
Finální prodlužování	300	72	1
	∞	4	1

Produkty z endpoint PCR byly kontrolovány na 2,5% agarosovém gelu. Postup byl až na několik výjimek, které jsou následně uvedeny, shodný s postupem při kontrole integrity RNA. Bylo rozpuštěno 1,25 g agarosy s 50 ml 1x TAE pufru a 2 µl barviva Midori Green Advance. Vzorky nebyly míchány s barvivem Gel Loading Dye, obsahuje jej již reakční premix z PCR reakce Do jamek gelu bylo pipetováno 10 µl vzorků.

Při vyhodnocení gelu se kontrolovala přítomnost jednoho pásu u vzorků DNA, který odpovídá produktu z PCR reakce. U vzorku RNA a negativní kontroly by neměl být

přítomen žádný pás, jinak by byl vzorek kontaminován gDNA. Porovnává se velikost DNA vůči PCR markeru. Pás DNA by měl být jasně ohraničen bez šmouh, což znamená, že DNA nebyla fragmentována a poškozena.

V naředěné vzorcích cDNA byla metodou qPCR změřena relativní genová exprese. Nejprve byl připraven premix se šesti různými primery (Tab. 4 a 5). Jednotlivé primery byly naředěny vodou bez RNAas ze 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ na 3,33 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Master mix obsahoval na jednu reakci 0,45 μl 3,33 μM primeru F, 0,45 μl 3,33 μM primeru R a 2,5 μl Syber Select Master Mix. Poté byl nachystán kalibrátor, kdy bylo smícháno 5 μl cDNA z každého vzorku. Do každé jamky na PCR destičce bylo napipetováno automatickou pipetou 3,4 μl připraveného premixu na jednu stranu a 1,6 μl cDNA na druhou stranu. Vzorky byly nanášeny v duplikátech. Do posledního řádku byl místo cDNA střídavě pipetován kalibrátor a negativní kontrola v podobě PCR-vody. Připravená PCR destička byla přelepena PCR fólií a stočena po dobu 5 s. na centrifuze pro destičky a vložena do Termocykleru CFX96. V softwaru CFX Maestro (verze 1.0) (Bio-Rad, USA) byl nastaven příslušný protokol (Tab. 6) a spuštěn experiment.

Tab. 4: Sekvence a teplota tání „forward“ primerů.

Název primeru	Sekvence „forward“ primeru (F)	Teplota tání (°C)
EF1	GGAGATGCTGCCATCGTTAT	57,3
RPS5	AATTATTTGGTCGCTGGAATTG	63,6
VgLG2+LG4	AATGGAAGATCTGGCCGATGAA	58,4
VgLG2	ATGATCACGTCCGTCAGTCG	55
VgLG4	AGTTCCGACCGACGACG	65,2
Vg-like-B	ATTGCAACAATGCAGTTTGAATCAT	56,4

Tab. 5: Sekvence a teplota tání „reverse“ primerů.

Název primeru	Sekvence „reverse“ primeru (R)	Teplota tání (°C)
EF1	CAGCAGCGTCCTTGAAAGTT	57,3
RPS5	TAACGTCCAGCAGAATGTGGTA	64,3
VgLG2+LG4	CGGTCCCTCGTTCTTTGGA	59,4
VgLG2	ACTTGTACTCGGGAATCCGC	55
VgLG4	TTCCCTCCCACGGAGTCC	67,6
Vg-like-B	GCAAATCAGCCACATCTTTAGGA	58,9

Tab. 6: Reakční protokol qPCR.

Krok	Čas (s.)	Teplota (°C)	Počet cyklů
aktivace „AmpliTaq“ DNA polymerasy	600	95	1
Denaturace	15	95	35
Nasednutí/ Prodlužování	60	60	
Křivka tání	10	60	0,5 °C/cyklus
		95,5	

Následně byla kontrolována účinnost primerů Z nachystaného kalibrátoru byla připravena kalibrační řada o 11 krocích, kdy v každém byl kalibrátor dvakrát ředěn PCR-vodou. Opět byl připraven stejný premix jako u qPCR metody v předchozím odstavci. Do jamek PCR destičky bylo pipetováno 3,4 μ l premixu a 1,6 μ l kalibrátoru z každého kroku ředění. Do posledních jamek byla místo kalibrátoru pipetována PCR-voda. Pipetováno bylo vždy v duplikátech. Poté byla destička přelepena PCR fólií, stočena po dobu 5 s. na centrifuze pro destičky a vložena do Termocykleru CFX96 a po nastavení protokolu spuštěn experiment. Následně byly v softwaru CFX Maestro (verze 1.0) zkontrolovány hodnoty cyklů prahu (Ct).

Při výpočtu relativní exprese byly použity hodnoty Ct pro jednotlivé vzorky. Relativní exprese genů zájmu (GOI) byla vypočítána delta-delta Ct metodou v programu Microsoft Excel 2016 porovnáním poměru mezi expresí provozních („housekeeping“, HKG) genů a genů zájmu k jejich účinnosti podle Pfaffl (2001). Získané hodnoty relativní genové exprese byly v programu Statistica 14.0.0 (TIBCO Software, USA) vyobrazeny v podobě grafů a mezi mediány hodnot byla vypočítána statistická významnost pomocí Kruskal-Wallisova testu, jelikož data neměla normální rozdělení.

3.2.5 Imunohistochemická detekce vitellogeninu

Žaludky včelích matek a dělnic zimní generace byly pomocí pinzety přeneseny z mikrozkuřavky obsahující 4% roztok paraformaldehydu do mikrozkuřavek s 1 ml PBS pufru a 3x v něm byly promyty po dobu 10 min.

Ztuhlý 4% roztok agarosy byl v mikrovlnné troubě rozeřát na teplotu cca 95 °C, kdy zkapalněl, a následně byl nalit do Petriho misky. Do tohoto roztoku byly pomocí pinzety přeneseny žaludky z PBS pufru a Petriho misky se vzorky byly ponechány 15 min. na vrstvě ledu, aby došlo ke ztuhnutí a vznikl agarosový gel. Pomocí skalpelu byly z gelu vyřezány kvádry o velikosti cca 2,5 x 1,5 x 1 cm obsahující jednotlivé žaludky. Takový kvádr gelu byl vteřinovým lepidlem nalepen na kovovou podložku, která byla vložena a přišroubována do komory vibratomu VT1000 S (Leica, Německo). Následně zde bylo nalito cca 50 ml PBS pufru. Na ovládacím panelu vibratomu byla nastavena tloušťka řezu 250 µm a spuštěn přístroj. Jednotlivé podélné řezy žaludku byly přenášeny špachtlí do 12jamkové destičky, obsahující 1 ml PBS pufr v jednotlivých jamkách. Tyto destičky byly uskladněny přes noc (18 hod.) při 4 °C.

PBS pufr by v jednotlivých jamkách nahrazen 1 ml blokovacího roztoku 5% BSA v PBS pufru s 0,1% Triton X-100, ve kterém byly řezy blokovány 10 min na třepačce. K tomuto roztoku byly přidány primární protilátky proti vitellogeninu (ředění 1:1000) (kromě vzorků sloužících jako negativní kontrola) a řezy byly inkubovány přes noc (18 hod.) při 4 °C. Následně byly řezy 3x promývány 1 ml PBS pufru po dobu 10 min na třepačce a poté 3 hod. inkubován s 1 ml roztoku sekundární protilátky (ředění 1:500 s navázaným FITC v 5% BSA v PBS pufru s 0,1% Triton X-100 při pokojové teplotě. Následně byly opět 3x promývány v 1 ml PBS pufru po dobu 10 min na třepačce. Řezy byly poté 15 min. inkubovány s roztokem PBS pufru s 0,1% Triton X-100 a DAPI (ředění 1:10000). Nakonec byly řezy 5x promývány v PBS pufru po dobu 10 minut na třepačce.

Jednotlivé řezy byly přeneseny do několika kapek zalévacího média na podložním sklíčku a přikryty krycím sklíčkem. Takto připravené vzorky byly pozorovány pomocí konfokálního skenovacího laserového mikroskopu LSM710 (Carl Zeiss, Německo) při 10x zvětšení objektivu. Laserový paprsek, kterým byla excitována fluorescence DAPI a FITC, měla vlnovou délku 405 nm, respektive 488 nm. Každý řez byl snímán pomocí funkce z-stack sekvenčně pro jednotlivé fluorofory, aby nedocházelo k překryvům excitačních a emisních spekter. K ovládní mikroskopu a zdokumentování signálu fluorescence z jednotlivých řezů v podobě obrázků byl použit program ZEN (black edition) (Carl Zeiss, Německo).

Pro následné měření intenzity signálu fluorescence a úpravu obrázků byl použit program ZEN (blue edition) (Carl Zeiss, Německo). V okně histogramu byla pro kanál

DAPI u všech vzorků včetně negativních kontrol nastavena úroveň kontrastu (černá) na hodnotu 0 a jasů (bílá) na 11. Pro kanál FITC byla nastavena úroveň kontrastu na hodnotu 1 a jasů na 85. Hodnota gamma byla vždy 1,00. K obrázkům bylo přidáno měřítko a v záložce Graphics byla zvolena funkce „Draw Spline Contour“, načež byla na obrázcích označena oblast tkáně střeva a pomocí této funkce byla v této oblasti vypočítána průměrná intenzita fluorescence. Od intenzity fluorescence vzorků byla poté odečtena intenzita fluorescence u negativních kontrol pro odstranění nespecifického signálu. Intenzita fluorescence jednotlivých vzorků byla vyobrazena v podobě grafů v programu Microsoft Excel 2016 (Microsoft, USA).

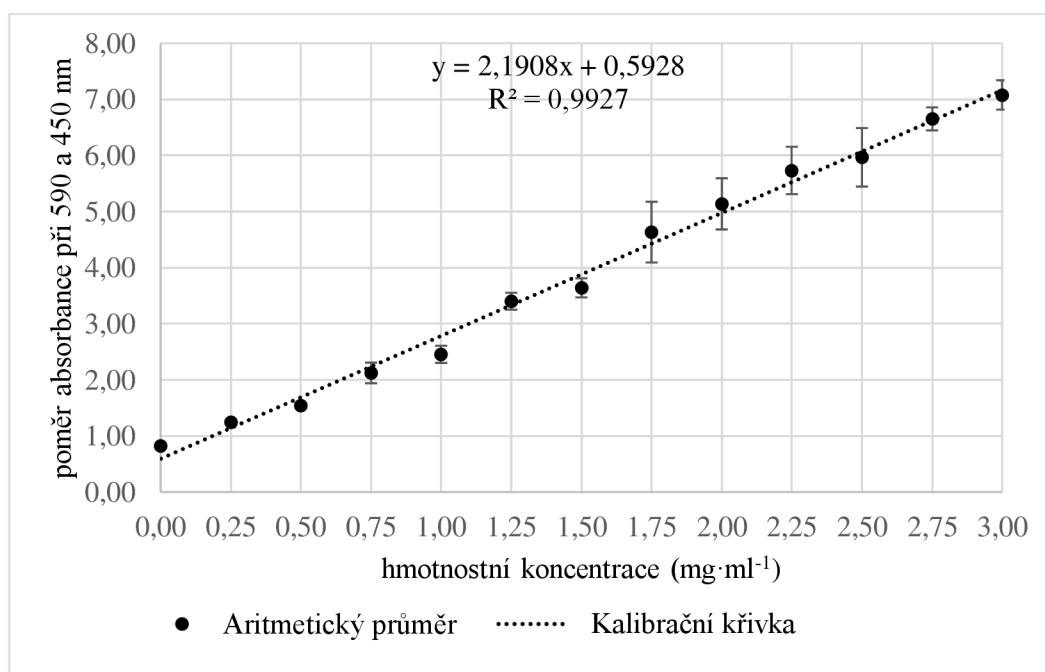
4 VÝSLEDKY

4.1 Vyhodnocení měření celkové koncentrace proteinů

4.1.1 Kalibrační křivka a rovnice

Standardy BSA byly postupně pipetovány do jamek destičky v triplikátech. Změřené hodnoty absorbance byly aritmeticky zprůměrovány a následně z nich byla vypočítána směrodatná odchylka hodnot. Z naměřené absorbance standardů proteinu BSA byla vytvořena kalibrační křivka závislosti poměru absorbancí při vlnových délkách 590/450 nm na koncentracích standardů BSA ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) (Obr. 6). Poté byla pro změřenou závislost poměru absorbancí na koncentracích standardů pomocí metody lineární regrese vytvořena rovnice kalibrační křivky (Tab. 7).

V jednotlivých vzorcích hemolymfy (viz kapitoly 4.1.2; 4.1.3; 4.1.4) byly změřeny hodnoty poměru absorbancí při 590/450 nm (měřeno třikrát), které byly dosazeny do kalibrační rovnice za neznámou y , načež byly spočítány hodnoty hmotnostní koncentrace proteinů. Z jednotlivých měření byl poté spočítán aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Hodnoty koncentrace proteinů v hemolymfě byly srovnávány vůči kontrolám.



Obr. 6: Kalibrační křivka závislosti průměru poměrů absorbancí při 590/450 nm na koncentracích standardu BSA ($\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). $n = 3$; chybové úsečky označují směrodatné odchylky.

Tab. 7: Hodnoty parametrů rovnice kalibrační křivky.

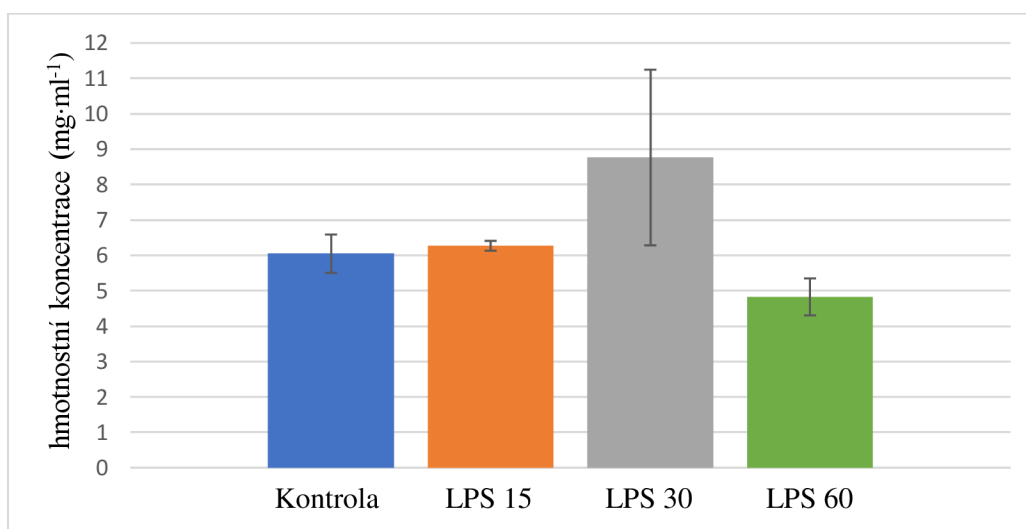
Rovnice kalibrační křivky	Parametr	Hodnota
$y = ax + b$	a	0,0022
	b	0,5928

4.1.2 Změny koncentrace proteinů po krmení lipopolysacharidy

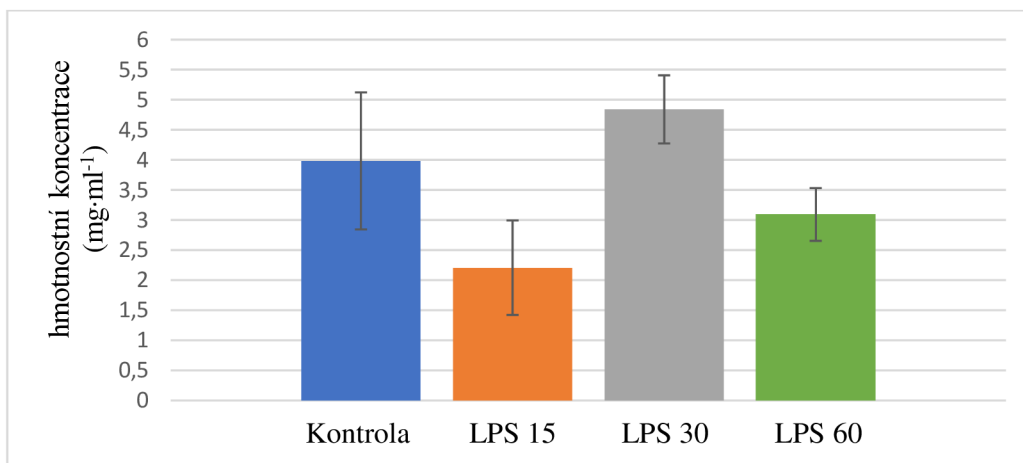
Koncentrace proteinů byla změřena ve vzorcích hemolymfy letních včel starých 1-2 a 2-3 dny po krmení 50% sacharosou (kontrola), 15 (LPS 15), 30 (LPS 30) a 60 (LPS 60) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose po dobu 24 a 48 hod. Hodnoty koncentrace proteinů v hemolymfě po krmení LPS byly srovnávány vůči kontrolám.

Ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic, krmených 24 hod., byla pozorována podobná koncentrace proteinů u skupiny LPS 15 (Obr. 7) jako u kontroly. Vyšší koncentrace proteinů byla zaznamenána u skupiny LPS 30, avšak s výraznou směrodatnou odchylkou, a naopak mírně nižší u skupiny LPS 60.

Vzorky hemolymfy letních dělnic, starých 2-3 dny a krmených 24 hod., obsahovaly ve skupině LPS 15 skoro o polovinu méně proteinů než u kontroly (Obr. 8), u obou skupin však byly vypočítány výrazné odchylky. Nárůst byl nicméně pozorován u skupiny LPS 30 a naopak k poklesu došlo u skupiny LPS 60.

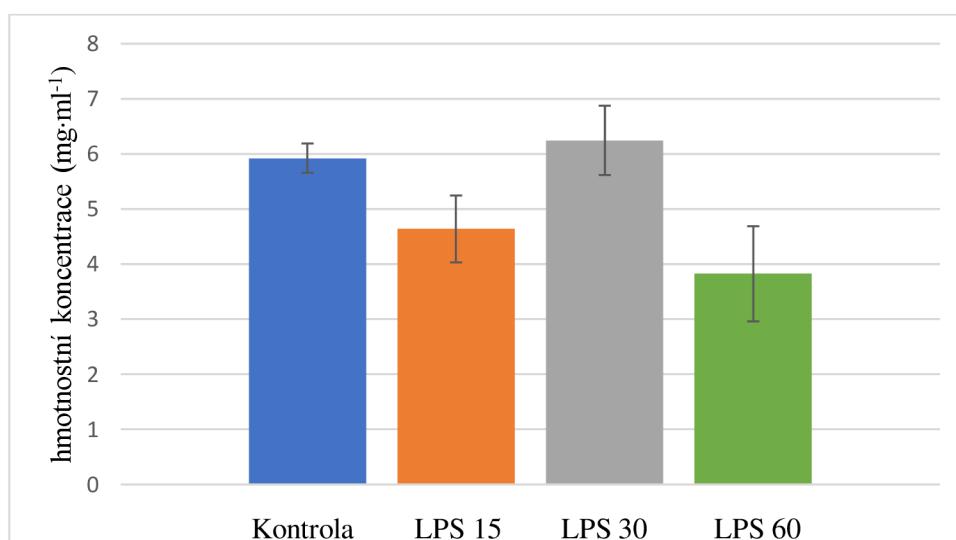


Obr. 7: Průměrná koncentrace proteinů ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu rozdílných koncentrací LPS ve stravě (15, 30 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 50% sacharose) podávané po dobu 24 hod. $n = 3$; chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.



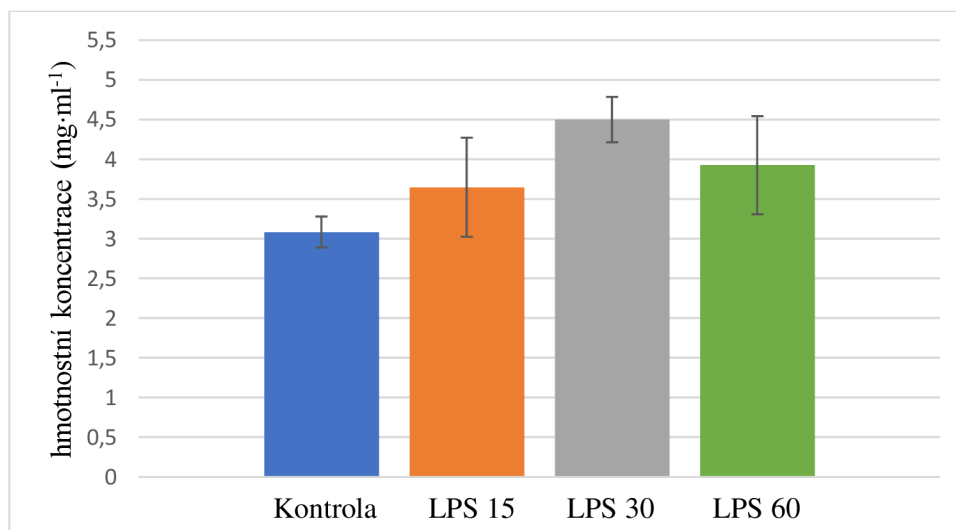
Obr. 8: Průměrná koncentrace proteinů ve vzorcích hemolymfy 2-3 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu rozdílných koncentrací LPS ve stravě (15, 30 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 50% sacharose) podávané po dobu 24 hod. $n = 3$; chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.

V hemolymfě 1-2 dny starých letních včel, krmených po dobu 48 hod., byla naměřena nižší koncentrace proteinů u skupiny LPS 15 oproti kontrole (Obr. 9). Hladina proteinů ve skupině LPS 30 byla s kontrolou srovnatelná a u skupiny LPS 60 byl pozorován výrazný pokles.



Obr. 9: Průměrná koncentrace proteinů ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu rozdílných koncentrací LPS ve stravě (15, 30 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 50% sacharose) podávané po dobu 48 hod. $n = 3$; chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.

V hemolymfě 2-3 dny starých letních dělnic, krmených po dobu 48 hod., bylo naměřeno mírně vyšší množství proteinů u skupiny LPS 15 oproti kontrole (Obr. 10), avšak s velkou odchylkou. U skupiny LPS 30 byla hladina proteinů vyšší skoro o třetinu a u skupiny LPS 60 byla také zvýšena, ale ne tak značně a s velkou odchylkou.



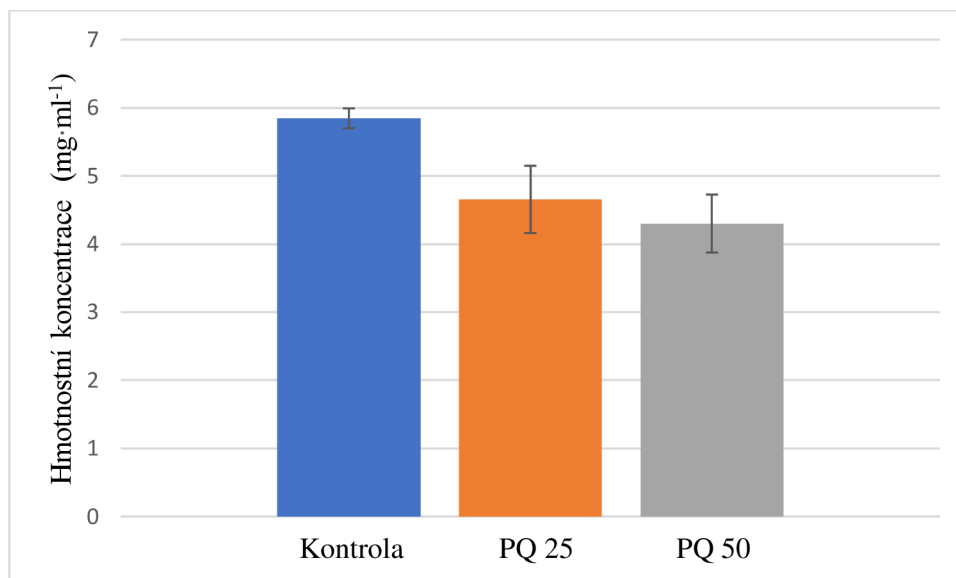
Obr. 10: Průměrná proteinů ve vzorcích hemolymfy 2-3 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu rozdílných koncentrací LPS ve stravě (15, 30 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 50% sacharose) podávané po dobu 48 hod. $n = 3$; chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.

4.1.3 Změny koncentrace proteinů po krmení paraquatem

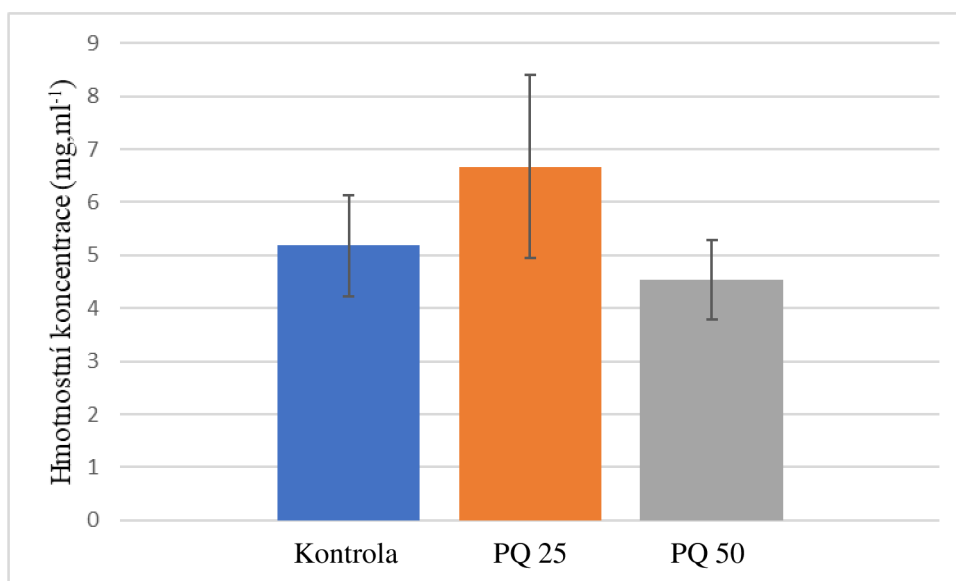
Koncentrace proteinů byla změřena ve vzorcích hemolymfy letních dělnic po krmení 25 (PQ 25) a 50 (PQ 50) $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose po dobu 2, 4 a 8 hod. Hodnoty koncentrace proteinů v hemolymfě po krmení PQ byly srovnávány vůči kontrolám.

Obsah proteinů v hemolymfě 1-2 dny starých letních včel, krmených PQ po dobu 2 hod., poklesl u skupiny PQ 25 oproti kontrole (Obr. 11). U skupiny PQ 50 byla hladina proteinů ještě nižší.

Při krmení po dobu 4 hod. došlo k nárůstu množství proteinů v hemolymfě u skupiny PQ 25 oproti kontrole, nicméně se značnou směrodatnou odchylkou. U skupiny PQ 50 byla koncentrace proteinů mírně nižší než u kontrolních včel (Obr. 12).

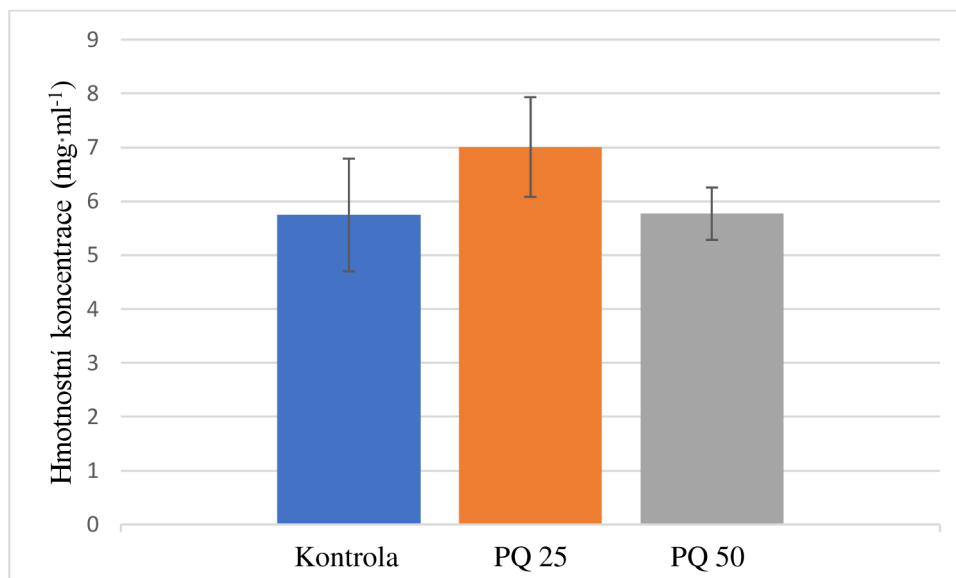


Obr. 11: Průměrná koncentrace proteinů ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu PQ ve stravě (25 a 50 mmol·l⁻¹ v 50% sacharose) podávané po dobu 2 hod. n = 3; chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.



Obr. 12: Průměrná koncentrace proteinů ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu PQ ve stravě (25 a 50 mmol·l⁻¹ v 50% sacharose) podávané po dobu 4 hod. n = 3; chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.

Po nejdelším, tedy 8 hod. dlouhém krmení, byla hladina proteinů opět vyšší v případě skupiny PQ 25 oproti kontrole, u obou skupin však s velkými odchylkami, zatímco u skupiny PQ 50 byla srovnatelná s kontrolní skupinou (Obr. 13).



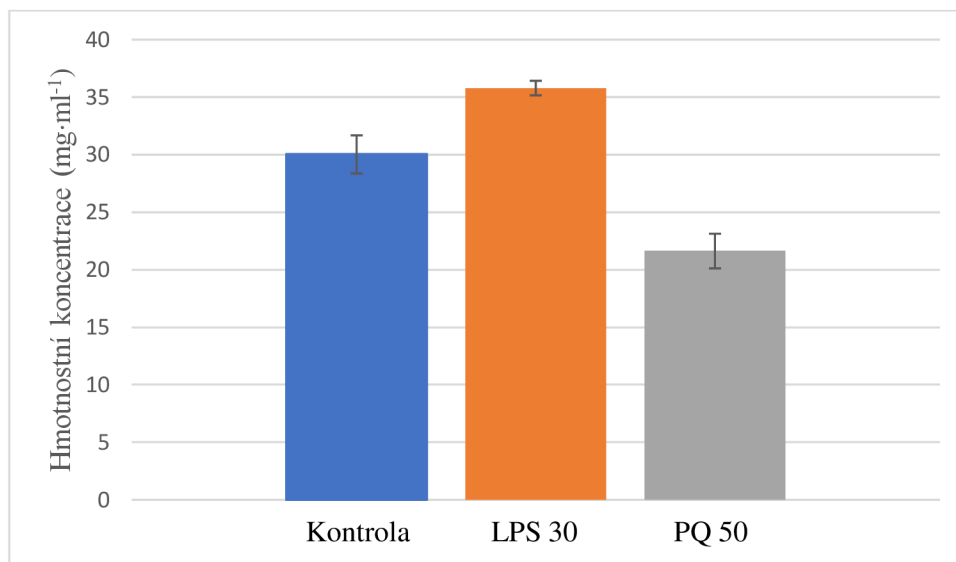
Obr. 13: Průměrná koncentrace proteinů ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu PQ ve stravě (25 a 50 mmol·l⁻¹ v 50% sacharose) podávané po dobu 8 hod. n = 3; chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.

4.1.4 Změny koncentrace proteinů po krmení lipopolysacharidy a paraquatem u zimních dělnic a matek

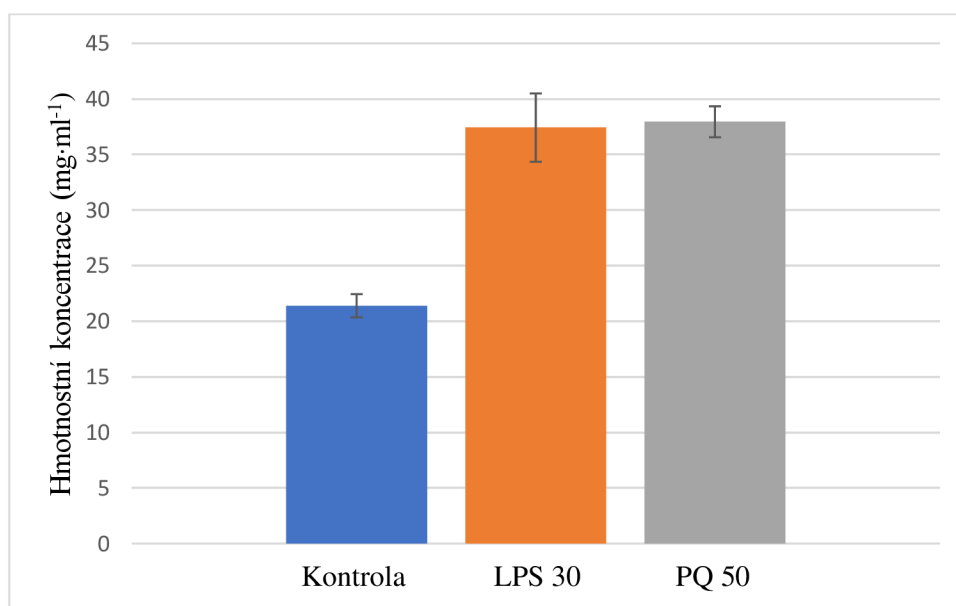
Koncentrace proteinů byla změřena ve vzorcích hemolymfy zimních dělnic a matek po krmení 50% sacharosou (kontrola), 30 μg·ml⁻¹ LPS v 50% sacharose (LPS 30) a 50 mmol·l⁻¹ PQ (PQ 50) po dobu 24 hod. Hodnoty koncentrace proteinů v hemolymfě po krmení LPS nebo PQ byly srovnávány vůči kontrolám.

Hladina proteinů v hemolymfě dělnic zimní generace krmených po dobu 24 hod. byla vyšší u skupiny LPS 30 oproti kontrole, zatímco u skupiny PQ 50 došlo k výraznému poklesu (Obr. 14).

Koncentrace proteinů v hemolymfě matek krmených ve stravě LPS a PQ po dobu 24 hod. byla srovnatelně značně zvýšena u skupin LPS 30 a PQ 50 oproti kontrole (Obr. 15).



Obr. 14: Průměrná koncentrace proteinů ve vzorcích hemolymfy dělnic zimní generace při zkoumání vlivu LPS a PQ ve stravě ($30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS a $50 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose) podávané po dobu 24 hod. $n = 3$; chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.



Obr. 15: Průměrná koncentrace proteinů ve vzorcích hemolymfy včelích matek při zkoumání vlivu LPS a PQ ve stravě ($30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS a $50 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose) podávané po dobu 24 hod. $n = 3$; chybová úsečka označuje směrodatnou odchylku.

4.2 Vyhodnocení imunochemické detekce vitellogeninu

Proteiny vzorků hemolymfy (viz kapitoly 4.2.1; 4.2.2; 4.2.3) byly separovány metodou SDS-PAGE a poté byly pomocí metody Western blot přenášeny na nitrocelulosovou membránu s póry o velikosti $0,45 \mu\text{m}$. Membrána byla následně inkubována v blokačním roztoku BSA a inkubována v roztoku králičích primárních protilátek proti vitellogeninu.

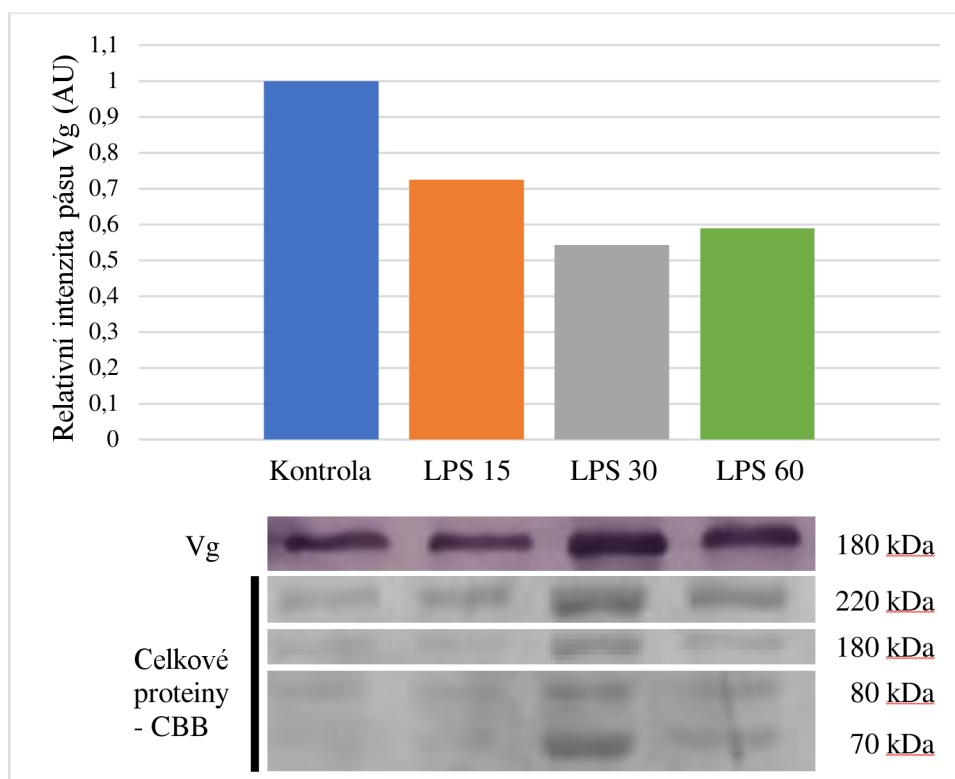
Následovala inkubace v roztoku kozích anti-králičích sekundárních protilátek konjugovaných s alkalickou fosfatase, klíčových pro imunochemické detekování, které bylo provedeno přidáním roztoku NBT-BCIP. Výsledná intenzita pásu vitellogeninu byla normalizována k intenzitě pásů celkových proteinů v SDS-PAGE gelu po barvení CBB.

4.2.1 Imunochemická detekce vitellogeninu po krmení lipopolysacharidy

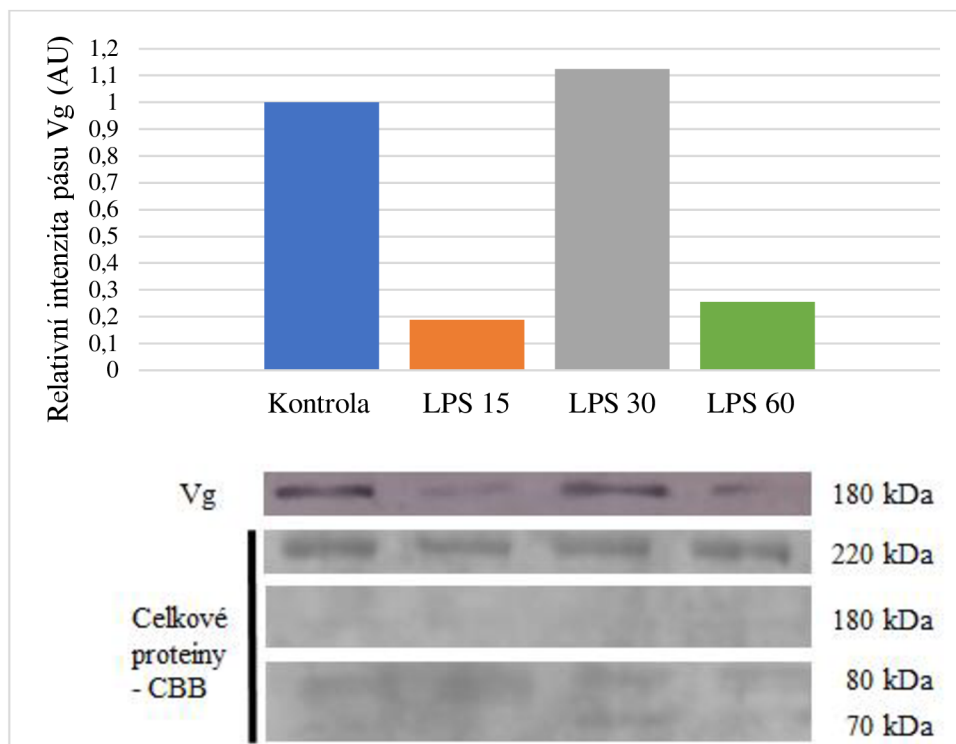
Vitellogenin byl detekován ve vzorcích hemolymfy letních dělnic starých 1-2 a 2-3 dny po krmení 50% sacharosou (kontrola), 15 (LPS 15), 30 (LPS 30) a 60 (LPS 60) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose po dobu 24 a 48 hod.

Ve vzorku letních 1-2 dny starých dělnic, krmených po dobu 24 hod., byla pozorována o cca 30 % nižší relativní intenzita pásu vitellogeninu u skupiny LPS 15 oproti kontrole (Obr. 16). Ve skupině LPS 30 byla intenzita pásu Vg ještě nižší, tedy skoro poloviční oproti kontrole. Podobné snížení intenzity bylo zaznamenáno i u skupiny LPS 60.

Ve vzorku letních 2-3 dny starých, krmených po dobu 24 hod., byla zjištěna o více než 80 % snížená relativní intenzita pásu Vg u skupiny LPS 15 oproti kontrolní skupině (Obr. 17). Naopak u skupiny LPS 30 byl pozorován nárůst o cca 10 %, avšak u skupiny LPS 60 opět došlo k výraznému poklesu intenzity o více než 70 %.



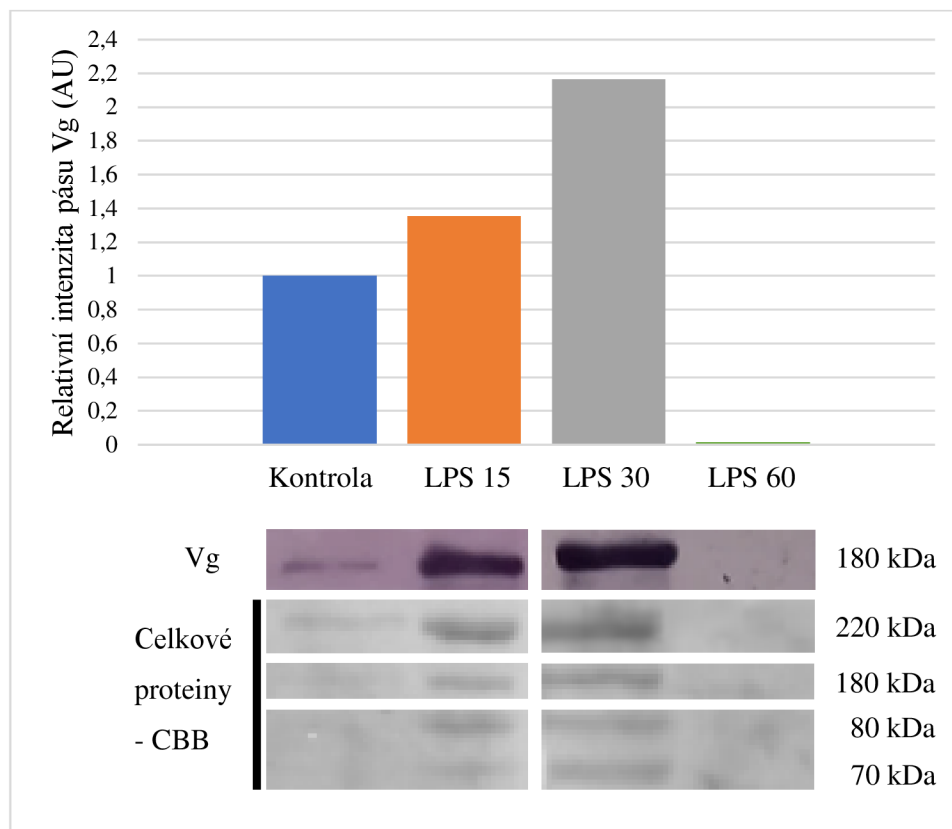
Obr. 16: Relativní kvantifikace Vg metodou Western blot ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu rozdílných koncentrací LPS ve stravě (15, 30 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 50% sacharose) podávané po dobu 24 hod. Normalizováno na intenzitu pásů celkových proteinů v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímek membrány pořízen mobilním telefonem.



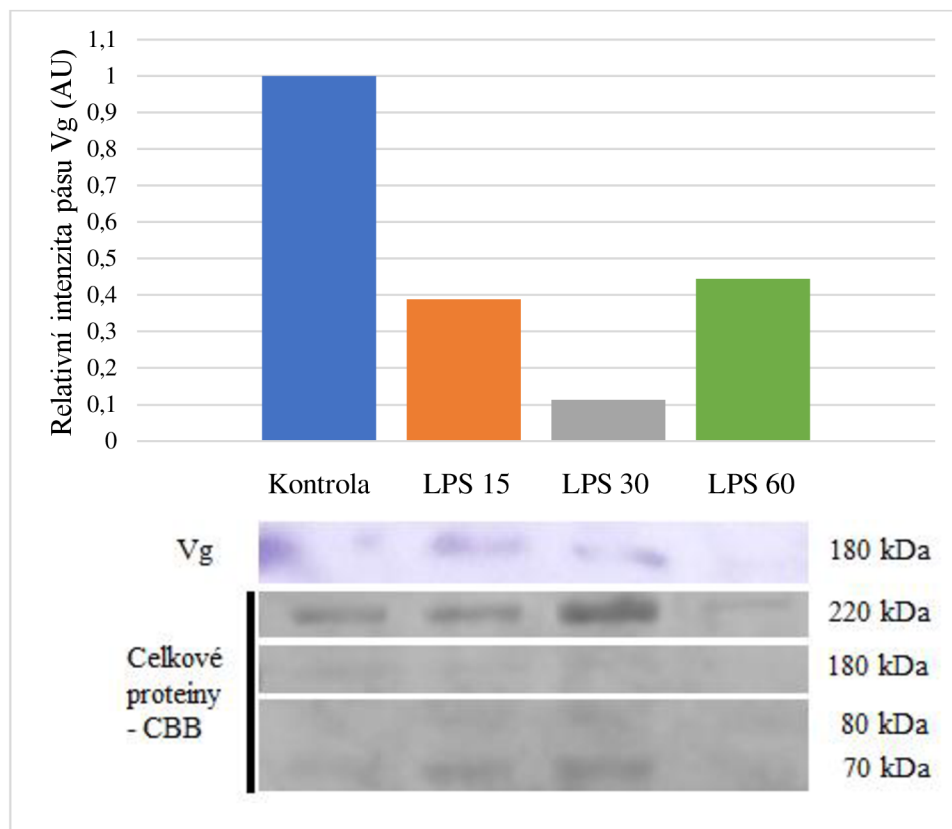
Obr. 17: Relativní kvantifikace Vg metodou Western blot ve vzorcích hemolymfy 2-3 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu rozdílných koncentrací LPS ve stravě (15, 30 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 50% sacharose) podávané po dobu 24 hod. Normalizováno na intenzitu pásů celkových proteinů v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímek membrány pořízen mobilním telefonem.

V případě letních včel starých 1-2 dny a krmených 48 hod. byla zaznamenána o více než 30 % vyšší relativní intenzita pásu Vg u skupiny LPS 15 ve srovnání s kontrolou (Obr. 18). U skupiny LPS 30 byl nárůst vyšší dokonce o 110 %. Zatímco u skupiny LPS 60 došlo k velmi výraznému poklesu.

Ve vzorku letních dělnic starých 2-3 dny, krmených po dobu 48 hod., byl zjištěn výrazný pokles relativní intenzity pásu Vg o více než 60 % u skupiny LPS 15 oproti kontrole (Obr. 19). V případě skupiny LPS 30 došlo k ještě většímu snížení o necelých 90 % a u skupiny LPS 60 byla pozorována nižší intenzita o více než polovinu.



Obr. 18: Relativní kvantifikace Vg metodou Western blot ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu rozdílných koncentrací LPS ve stravě ($15, 30$ a $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 50% sacharose) podávané po dobu 48 hod. Normalizováno na intenzitu pásů celkových proteinů v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímky membrány pořízeny mobilním telefonem.

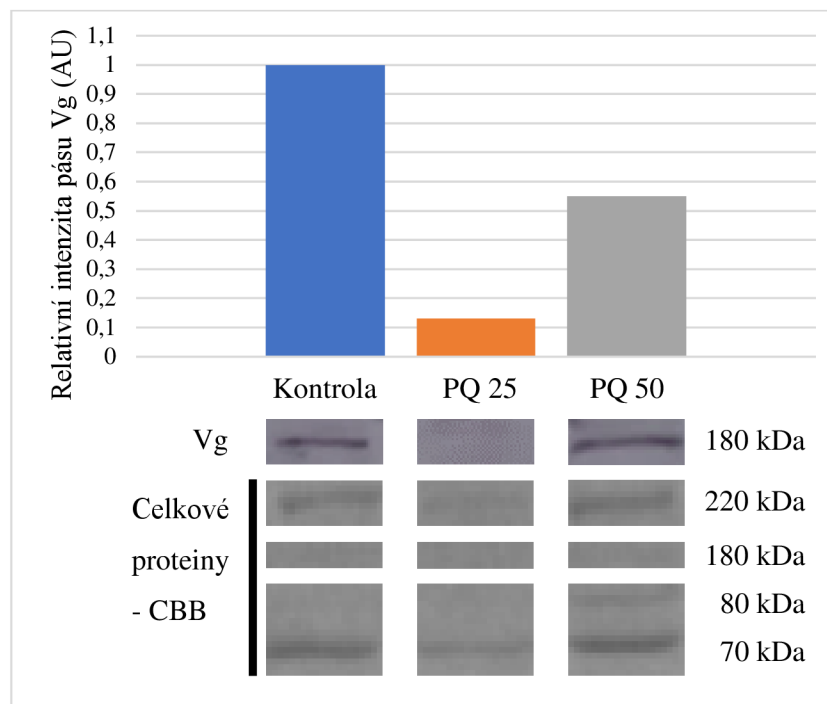


Obr. 19: Relativní kvantifikace Vg metodou Western blot ve vzorcích hemolymfy 2-3 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu rozdílných koncentrací LPS ve stravě (15, 30 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v 50% sacharose) podávané po dobu 48 hod. Normalizováno na intenzitu pásů celkových proteinů v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímek membrány pořízen mobilním telefonem.

4.2.2 Imunochemická detekce vitellogeninu po krmení paraquatem

Vitellogenin byl detekován ve vzorcích hemolymfy letních dělnic po krmení 50% sacharou (kontrola), 25 (PQ 25) a 50 (PQ 50) $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose po dobu 2, 4 a 8 hod.

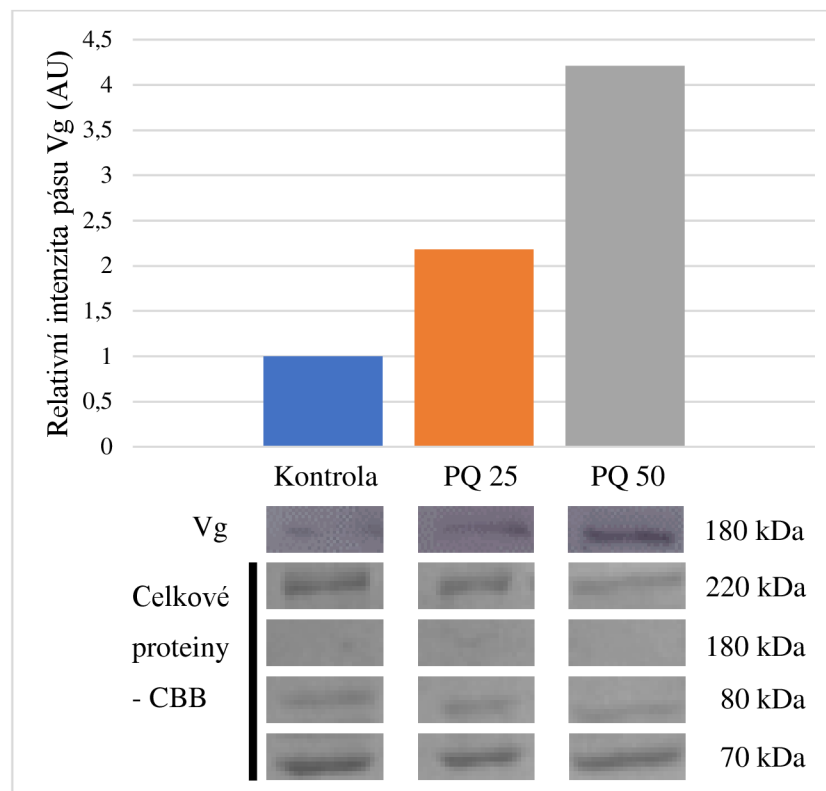
V případě 1-2 dny starých letních dělnic, krmených roztokem PQ po dobu 2 hod., byl zaznamenán razantní pokles relativní intenzity pásu Vg o více 80 % ve skupině PQ 25 při srovnání s kontrolou. U skupiny PQ 50 byla intenzita nižší o více než 40 % (Obr. 20).



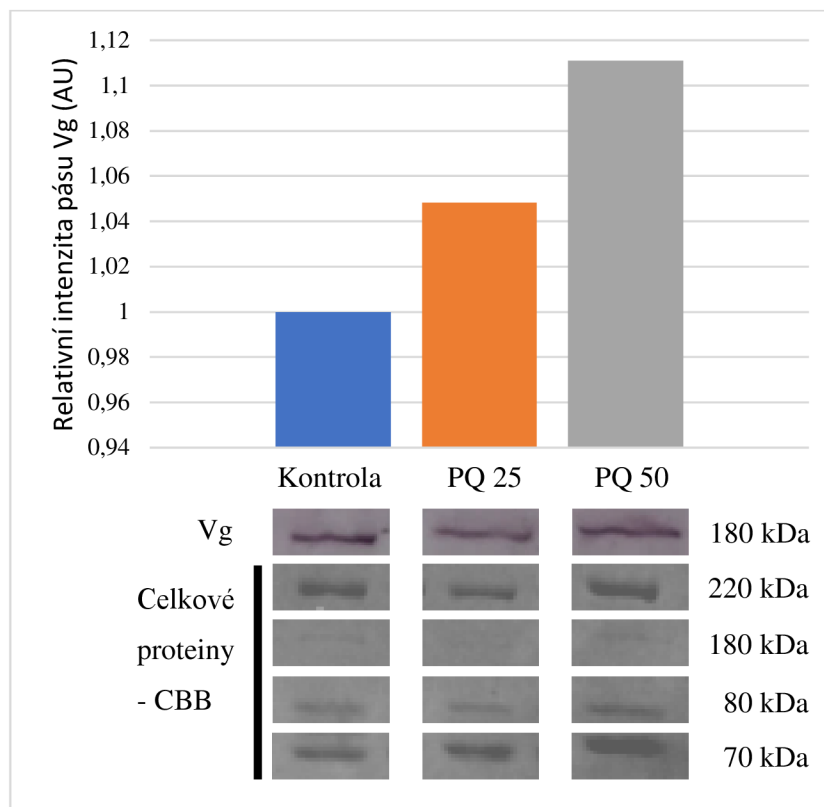
Obr. 20: Relativní kvantifikace Vg metodou Western blot ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu PQ ve stravě (25 a 50 mmol·l⁻¹ v 50% sacharose) podávané po dobu 2 hod. Normalizováno na intenzitu pásů celkových proteinů v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímky membrány pořízeny mobilním telefonem.

U stejně starých včel, krmených po dobu 4 hod., byl pozorován výrazný nárůst relativní intenzity pásu Vg o více než 100 % u skupiny PQ 25 ve srovnání s kontrolní skupinou. Ještě vyšší byla intenzita u skupiny PQ 50, a to o více než 300 % (Obr. 21).

V případě stejně starých včel, krmených po dobu 8 hod., byl pozorován nepatrný nárůst relativní intenzity pásu Vg u skupiny PQ 25 a u skupiny PQ 50 byla intenzita vyšší o více než 10 % (Obr. 22).



Obr. 21: Relativní kvantifikace Vg metodou Western blot ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu PQ ve stravě (25 a 50 mmol·l⁻¹ v 50% sacharose) podávané po dobu 4 hod. Normalizováno na intenzitu pásů celkových proteinů v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímky membrány pořízeny mobilním telefonem.



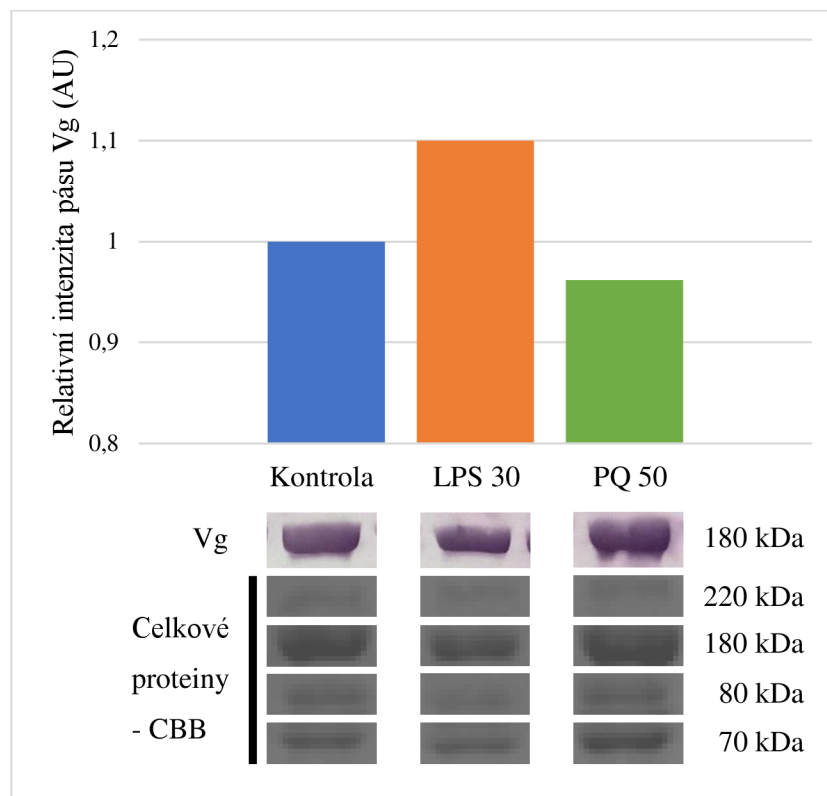
Obr. 22: Relativní kvantifikace Vg metodou Western blot ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic při zkoumání vlivu PQ ve stravě (25 a 50 mmol·l⁻¹ v 50% sacharose) podávané po dobu 8 hod. Normalizováno na intenzitu pásů celkových proteinů v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímky membrány pořízeny mobilním telefonem.

4.2.3 Imunochemická detekce vitellogeninu po krmení lipopolysacharidy a paraquatem u zimních dělnic a matek

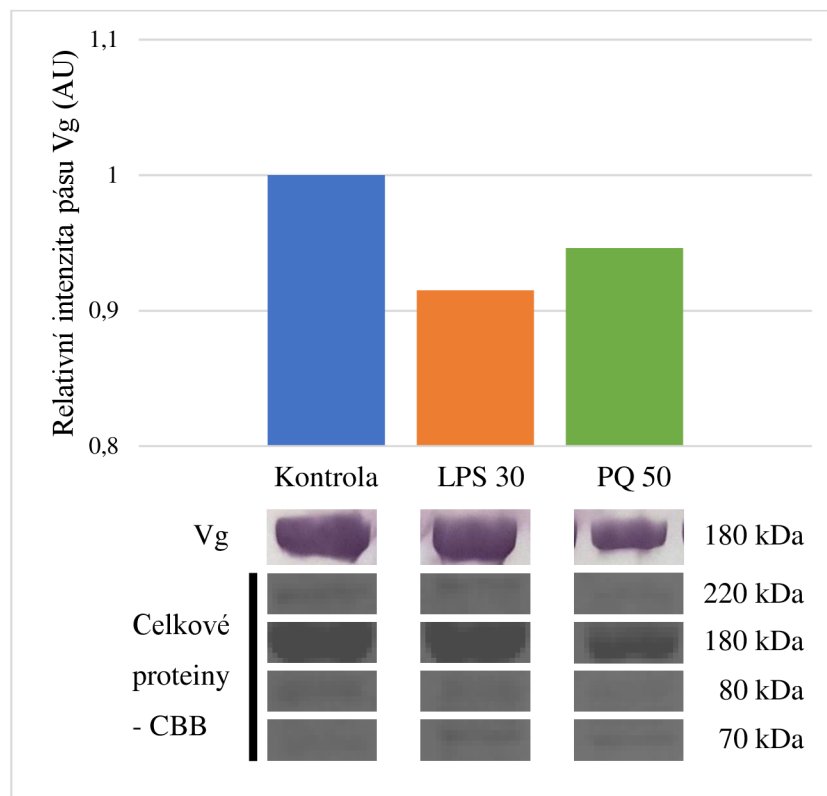
Vitellogenin byl detekován ve vzorcích hemolymfy zimních dělnic a matek po krmení 50% sacharosou (kontrola), 30 µg·ml⁻¹ LPS v 50% sacharose (LPS 30) a 50 mmol·l⁻¹ PQ v 50% sacharose (PQ 50) po dobu 24 hod.

Ve vzorcích hemolymfy zimní generace dělnic krmených roztoky LPS a PQ po dobu 24 hod., byla zjištěna o 10 % vyšší relativní intenzita pásu Vg v případě skupiny LPS 30 oproti kontrole, zatímco u skupiny PQ 50 došlo k nepatrnému poklesu (Obr. 23).

Ve vzorcích včelích matek, krmených stejnými roztoky po stejně dlouhou dobu, byl pozorován pokles relativní intenzity pásu Vg u skupiny LPS 30 o necelých 10 % oproti kontrole a ve skupině PQ 50 byla naměřena hodnota intenzity nižší o více než 5 % (Obr. 24).



Obr. 23: Relativní kvantifikace Vg metodou Western blot ve vzorcích hemolymfy zimní generace dělnic při zkoumání vlivu LPS a PQ ve stravě ($30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS a $50 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose) podávané po dobu 24 hod. Normalizováno na intenzitu páسů celkových proteinů v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímky membrány pořízeny mobilním telefonem.

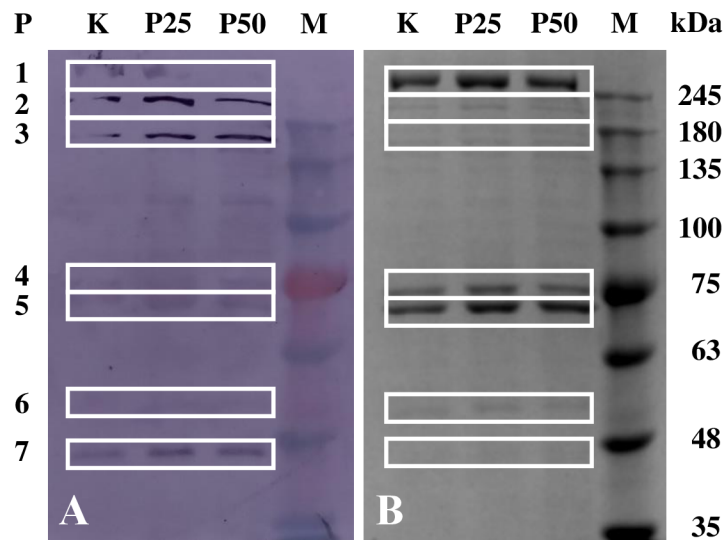


Obr. 24: Relativní kvantifikace Vg metodou Western blot ve vzorcích hemolymfy včelích matek při zkoumání vlivu LPS a PQ ve stravě ($30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS a $50 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose) podávané po dobu 24 hod. Normalizováno na intenzitu pásů celkových proteinů v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímky membrány pořízeny mobilním telefonem.

4.2.4 MALDI analýza proteinů

Sedm pásů proteinů, které byly detekovány na nitrocelulosové membráně metodou Western Blot, bylo analyzováno pomocí metody MALDI z SDS-PAGE gelu (Obr. 25A a B). Do něj byly předtím naneseny vzorky hemolymfy letních dělnic, krmených 25 a 50 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ ve stravě po dobu 8 h.

První pás o velikosti více než 245 kDa obsahoval apolipoforiny. Dále bylo zjištěno, že vitellogenin je spolu s apolipoforiny součástí druhého nebo třetího zkoumaného pásu o velikosti mezi 135 a 245 kDa. Jelikož se nepodařilo nařezat při přípravě gelu tyto dva pásy odděleně, není možné rozlišit, kterému z nich vitellogenin odpovídá, nicméně vitellogenin má velikost 180 kDa, tudíž by se pravděpodobně mělo jednat o třetí pás, který je této hodnotě blíže. Ve čtvrtém pásu o velikosti cca 75 kDa byly identifikovány opět apolipoforiny, také hexamerin a transferin. Pás č. 5 o velikosti mezi 63 a 75 kDa obsahoval opět hexamerin a pás o velikosti mezi 48 a 63 kDa odpovídal proteinu podobnému chitinase Idfg4. Pás o velikosti mezi 35 a 48 kDa byl identifikován jako aktin.

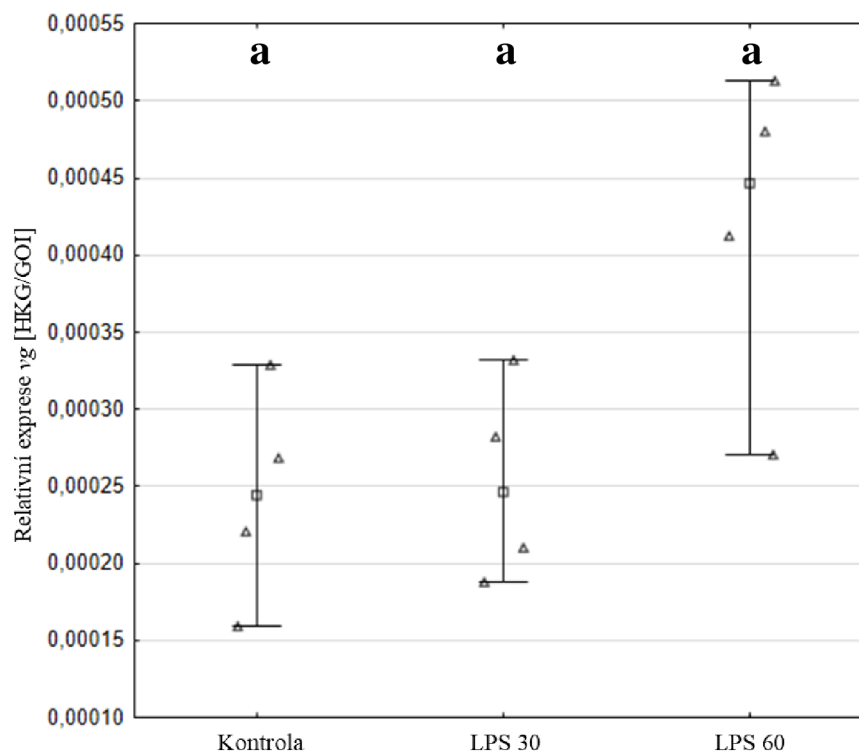


Obr. 25: Pásy proteinů hemolymfy letních dělnic po krmení 25 (P25) a 50 (P50) mmol.l⁻¹ PQ v 50% sacharose po dobu 8 hod. A: Pásy (P) proteinů na nitrocelulosové membráně po provedení metody Western blot. B: Pásy proteinů na SDS-PAGE gelu po barvení CBB analyzovaného metodou MALDI. K – hemolymfa kontrolní skupiny (krmené 50% sacharosou), M – marker molekulových hmotností. Snímek membrány pořízen mobilním telefonem. Snímek gelu pořízen pomocí Gel Doc EZ Imager.

4.3 Stanovení relativní genové exprese *vg* a *vg-like-B* metodou qPCR

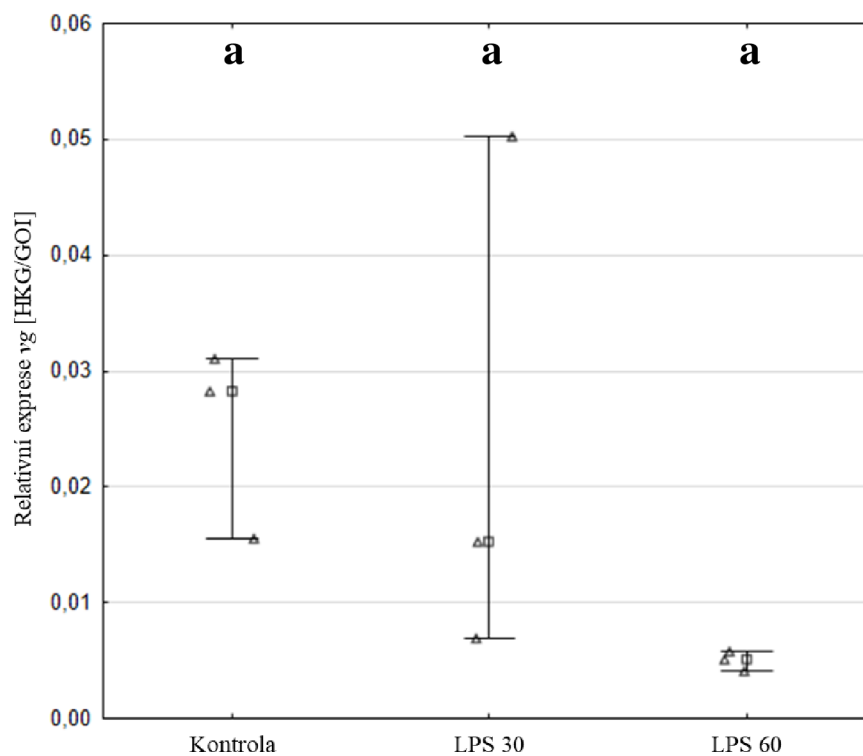
Metodou qPCR byla měřena relativní genová exprese *vitellogeninu* a *vg-like-B* ve vzorcích celých těl 1-2 a 2-3 dny starých letních dělnic rozdělených do skupin, které byly krmeny 50% sacharosou (kontrolní skupina), 30 (LPS 30) a 60 (LPS 60) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose po dobu 48 hod., a zimních dělnic, krmených 50% sacharosou (kontrola) a 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose po stejnou dobu. Pro měření exprese byly použity dva sety primerů pro provozní („housekeeping“) geny EF1 a RPS5 a tři sety primerů pro *vg*, jeden pro *vg* umístěný na chromosomu LG2, druhý pro *vg* na chromosomu LG4 a třetí nasedající na *vg* na obou zmíněných chromosomech pro zjištění celkové exprese *vg*. Jeden set primerů byl určen pro měření relativní exprese *vg-like-B*. Získaná data o cyklech prahu (Ct) byla použita pro výpočet relativní exprese genů zájmu podle Pfaffl (2001) a tyto hodnoty byly následně zaneseny do grafů v programu Statistica, přičemž byly pro mediány hodnot jednotlivých vzorky zjišťovány statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) pomocí Kruskal-Wallisova testu, protože hodnoty neměly normální rozdělení. V grafech byly použity konfidenční intervaly s kvantily o koeficientu 5, odpovídající hladině spolehlivosti 5 %.

V případě relativní exprese genu *vg* na chromosomu LG2 byly u 1-2 dny starých dělnic naměřen podobný medián hodnot u skupiny LPS 30 ve srovnání s kontrolou ($p = 1,000$) a vyšší medián hodnot u skupiny LPS 60, který však nebyl statisticky významný ($p = 0,118$) (Obr. 26).



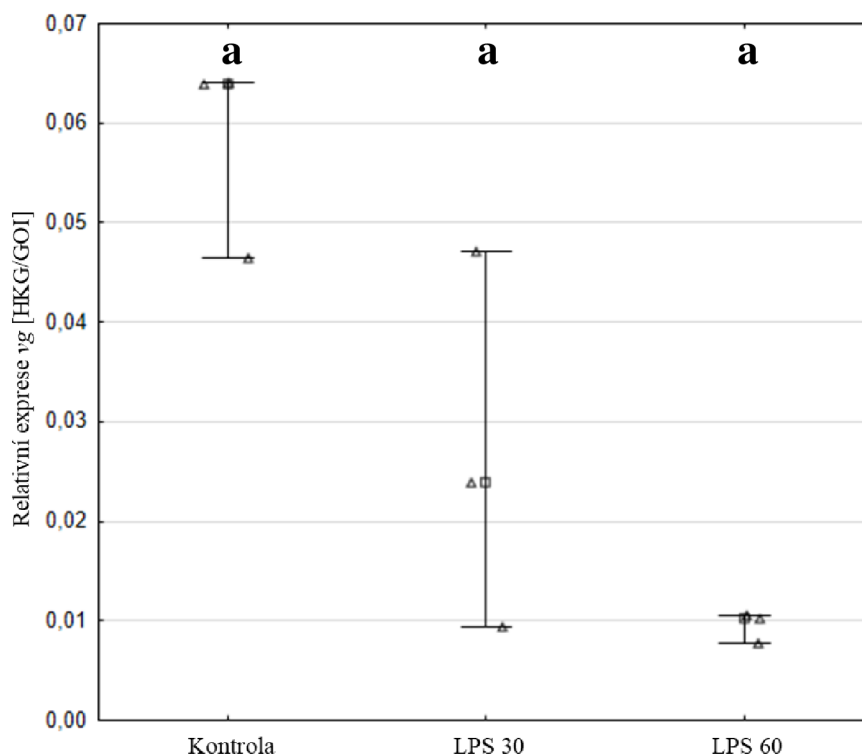
Obr. 26: Relativní exprese *vg* na chromosomu LG2 ve vzorcích 1-2 dny starých letních dělnic ($n = 4$; 3 včely na vzorek) rozdělených do skupin, které byly krmeny 50% sacharosou (kontrola), 30 (LPS 30) a 60 (LPS 60) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose po dobu 48 hod. Konfidenční intervaly s kvantily o koeficientu 5. Čtverec – medián, trojúhelník – naměřená hodnota. Rozdílnými písmeny vyznačen případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) určený Kruskal-Wallisovým testem.

Při stejném stáří dělnic byl zaznamenán pro gen *vg* na chromosomu LG4 nižší medián hodnot relativní exprese u skupiny LPS 30 oproti kontrole, v případě skupiny LPS 60 byl ještě nižší, ale ani u první ($p = 1,000$) ani u druhé ($p = 0,076$) skupiny nebyly tyto rozdíly významné (Obr. 27).



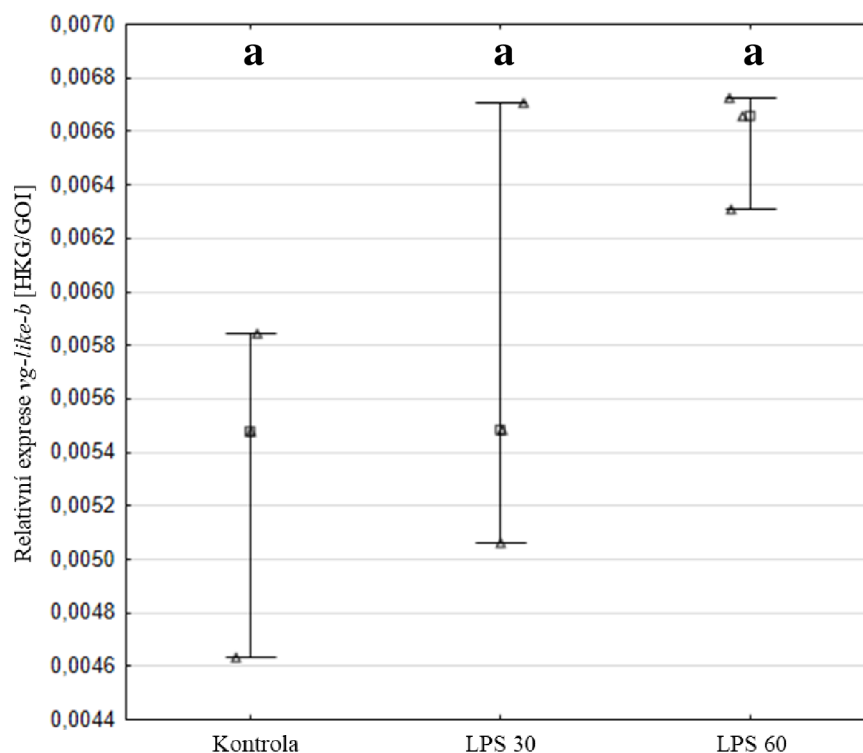
Obr. 27: Relativní exprese *vg* na chromosomu LG4 ve vzorcích 1-2 dny starých letních dělnic ($n = 3$; 3 včely na vzorek) rozdělených do skupin, které byly krmeny 50% sacharosou (kontrola), 30 (LPS 30) a 60 (LPS 60) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose po dobu 48 hod. Konfidenční intervaly s kvantily o koeficientu 5. Čtverec – medián, trojúhelník – naměřená hodnota. Rozdílnými písmeny vyznačen případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) určený Kruskal-Wallisovým testem.

U stejně starých dělnic byl medián hodnot celkové relativní exprese genu *vg* na obou chromosomech LG2 a LG4 opět nižší u skupiny LPS 30 a ještě více se snížil u skupiny LPS 60, ale ani v prvním ($p = 0,539$) ani v druhém ($p = 0,076$) případě se nejednalo o statisticky významný rozdíl (Obr. 28).



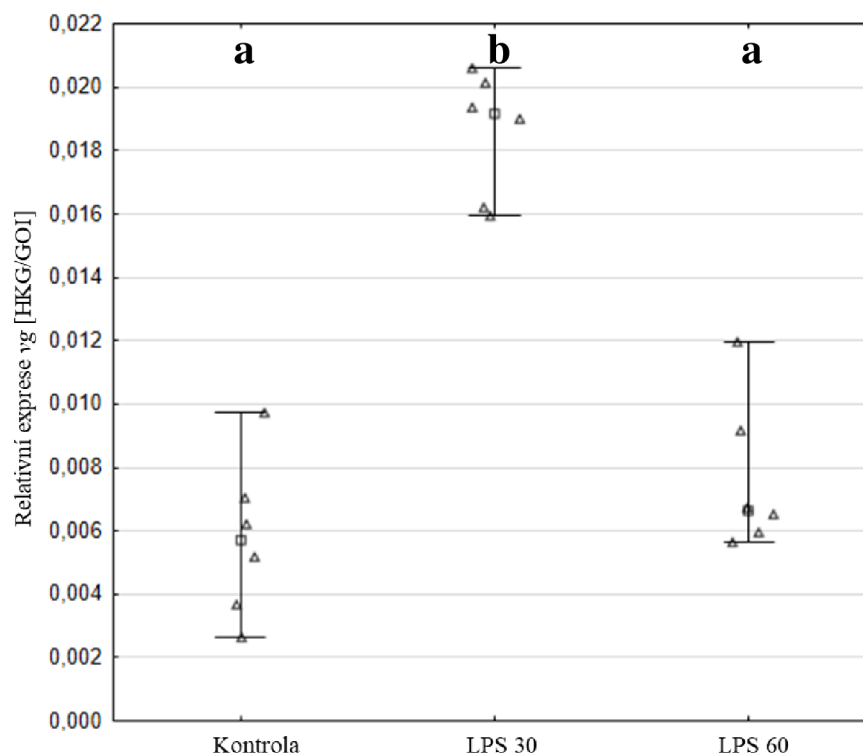
Obr. 28: Relativní exprese *vg* na chromosomech LG2 a LG4 ve vzorcích 1-2 dny starých letních dělnic ($n = 3$; 3 včely na vzorek) rozdělených do skupin, které byly krmeny 50% sacharosou (kontrola), 30 (LPS 30) a 60 (LPS 60) $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose po dobu 48 hod. Konfidenční intervaly s kvantily o koeficientu 5. Čtverec – medián, trojúhelník – naměřená hodnota. Rozdílnými písmeny vyznačen případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) určený Kruskal-Wallisovým testem.

Stejně staré dělnice měly v případě exprese genu *vg-like-B* u skupiny LPS 30 velmi podobný medián hodnot exprese v porovnání s kontrolou ($p = 1,000$) a u skupiny LPS 60 došlo mírnému ale nevýznamnému nárůstu ($p = 0,158$) (Obr. 29).



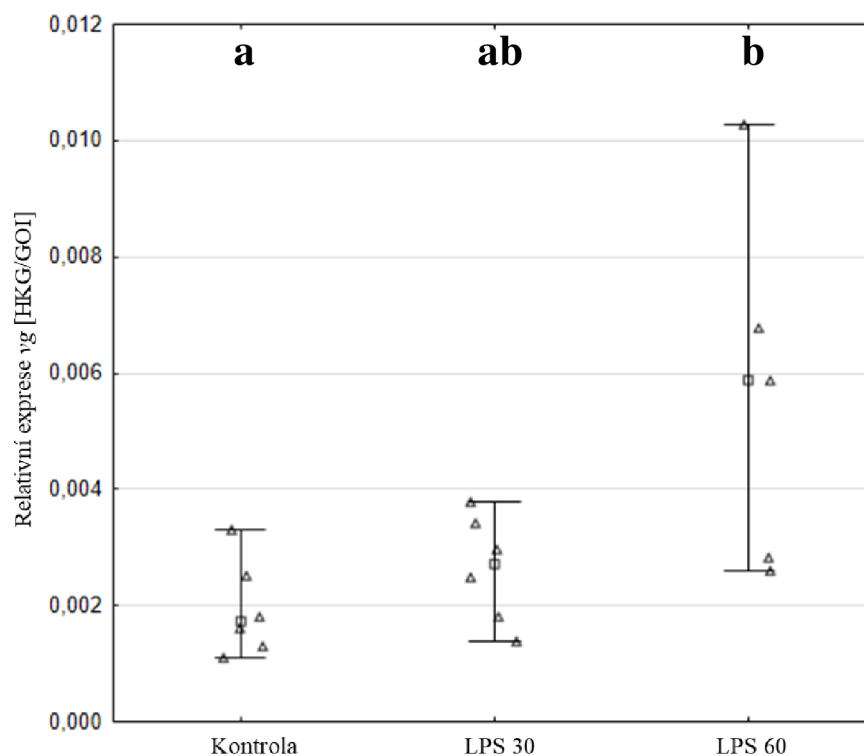
Obr. 29: Relativní exprese *vg-like-B* ve vzorcích 1-2 dny letních starých dělnic ($n = 3$; 3 včely na vzorek) rozdělených do skupin, které byly krmeny 50% sacharosou (kontrola), 30 (LPS 30) a 60 (LPS 60) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose po dobu 48 hod. Konfidenční intervaly s kvantily o koeficientu 5. Čtverec – medián, trojúhelník – naměřená hodnota. Rozdílnými písmeny vyznačen případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) určený Kruskal-Wallisovým testem.

U dělnic starých 2-3 dny byla naměřena významně vyšší ($p = 0,003$) exprese *vg* na chromosomu LG2 u skupiny LPS 30 oproti kontrole i ve srovnání ($p = 0,033$) se skupinou LPS 60, u níž nebyly naměřeny významné rozdíly ($p = 1,000$) oproti kontrolní skupině (Obr. 30).



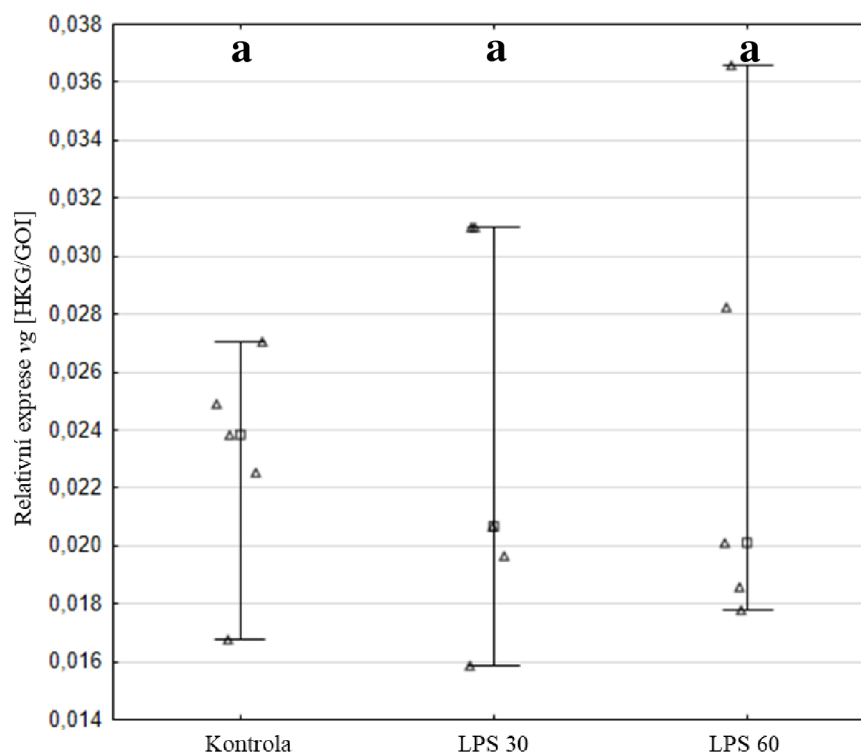
Obr. 30: Relativní exprese *vg* na chromosomu LG2 ve vzorcích 2-3 dny letních starých dělnic ($n = 6$; 3 včely na vzorek) rozdělených do skupin, které byly kmeny 50% sacharosu (kontrola), 30 (LPS 30) a 60 (LPS 60) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose po dobu 48 hod. Konfidenční intervaly s kvantily o koeficientu 5. Čtverec – medián, trojúhelník – naměřená hodnota. Rozdílnými písmeny vyznačen případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) určený Kruskal-Wallisovým testem.

Stejně staré dělnice měly podobnou ($p = 0,759$) úroveň genové exprese *vg* na chromosomu LG4 u skupiny LPS 30 oproti kontrole (Obr. 31). Zatímco u skupiny LPS 60 byl zjištěn významně vyšší ($p = 0,029$) medián hodnot exprese ve srovnání s kontrolou.



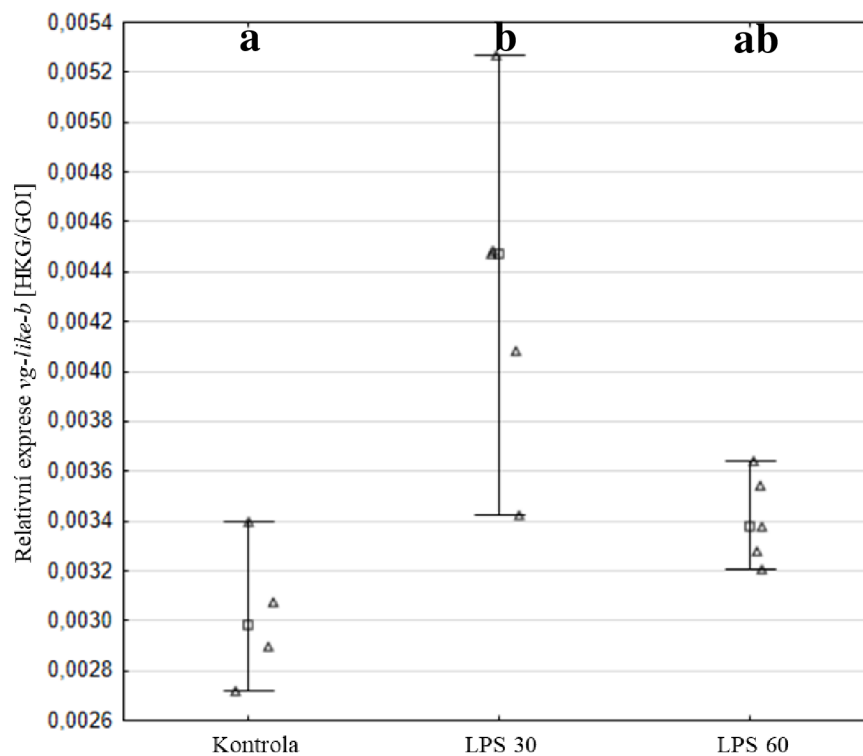
Obr. 31: Relativní exprese *vg* na chromosomu LG4 ve vzorcích 2-3 dny starých letních dělnic ($n = 5-6$; 3 včely na vzorek) rozdělených do skupin, které byly krmeny 50% sacharosou (kontrola), 30 (LPS 30) a 60 (LPS 60) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose po dobu 48 hod. Konfidenční intervaly s kvantily o koeficientu 5. Čtverec – medián, trojúhelník – naměřená hodnota. Rozdílnými písmeny vyznačen případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) určený Kruskal-Wallisovým testem.

U stejně starých dělnic nebyla zjištěna významně rozdílná celková exprese *vg* na obou chromosomech LG2 a LG4 u skupiny LPS 30 ($p = 1,000$) a ani u skupiny LPS 60 ($p = 1,000$) v porovnání s kontrolní skupinou (Obr. 32).



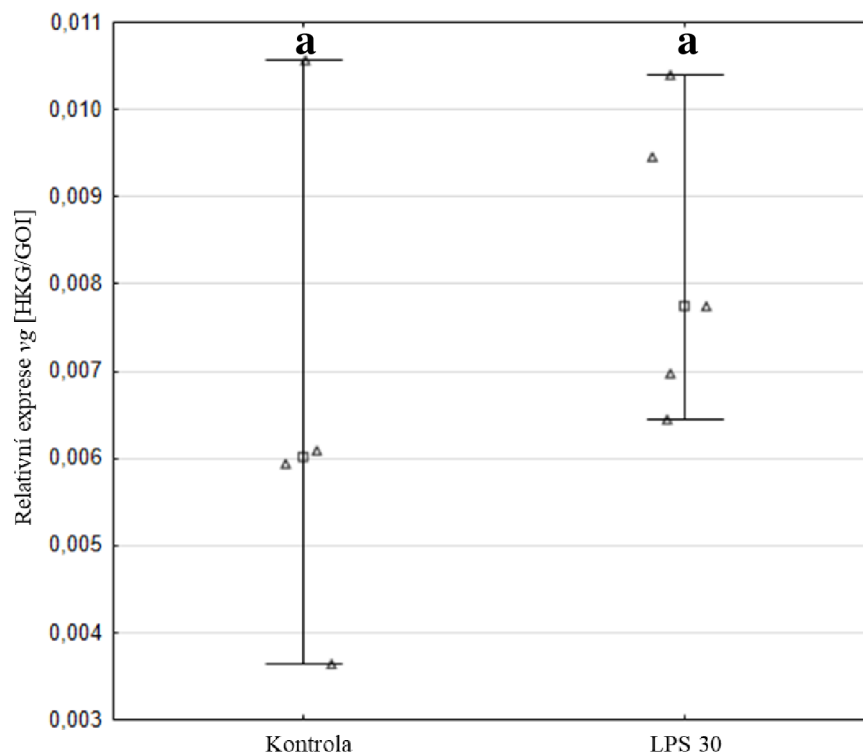
Obr. 32: Relativní exprese *vg* na chromosomech LG2 a LG4 ve vzorcích 2-3 dny starých letních dělnic ($n = 5$; 3 včely na vzorek) rozdělených do skupin, které byly krmeny 50% sacharosou (kontrola), 30 (LPS 30) a 60 (LPS 60) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose po dobu 48 hod. Konfidenční intervaly s kvantily o koeficientu 5. Čtverec – medián, trojúhelník – naměřená hodnota. Rozdílnými písmeny vyznačen případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) určený Kruskal-Wallisovým testem.

Relativní exprese *vg-like-B* byla u stejně starých dělnic významně vyšší ($p = 0,009$) v případě skupiny LPS 30 oproti kontrole (Obr. 33). U skupiny LPS 60 sice byl naměřen vyšší medián hodnot oproti kontrole, ale nikoliv statisticky významný ($p = 0,618$).



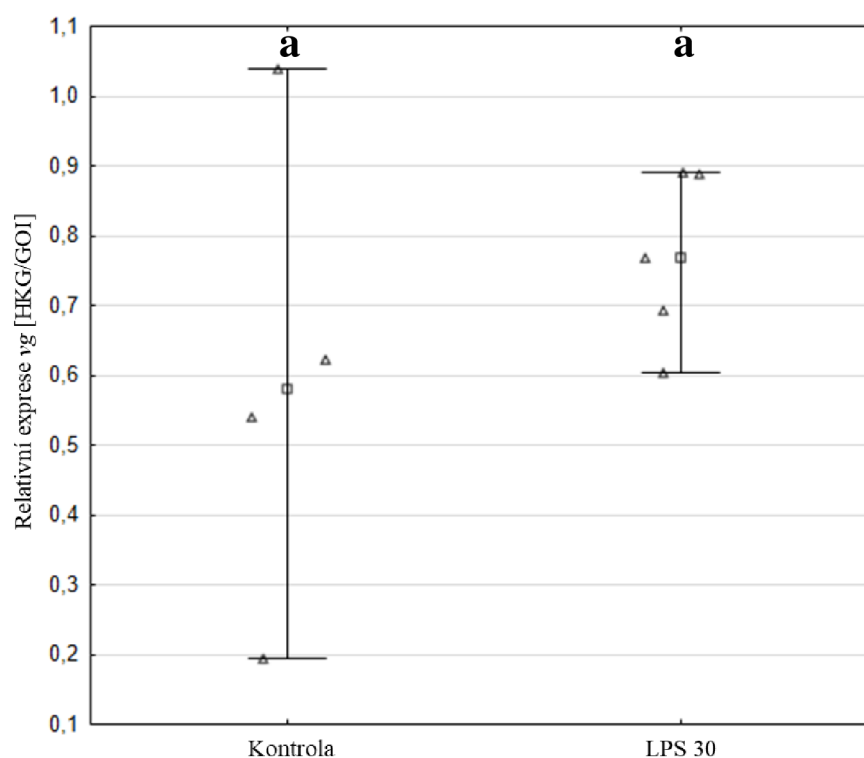
Obr. 33: Relativní exprese *vg-like-B* ve vzorcích 2-3 dny starých letních dělnic ($n = 4-5$; 3 včely na vzorek) rozdělených do skupin, které byly krmeny 50% sacharosou (kontrola), 30 (LPS 30) a 60 (LPS 60) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose po dobu 48 hod. Konfidenční intervaly s kvantily o koeficientu 5. Čtverec – medián, trojúhelník – naměřená hodnota. Rozdílnými písmeny vyznačen případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) určený Kruskal-Wallisovým testem.

U zimní generace dělnic byla zaznamenána statisticky nevýznamně zvýšená ($p = 0,221$) relativní exprese *vg* na chromosomu LG2 u skupiny LPS 30 v porovnání s kontrolou (Obr. 34).



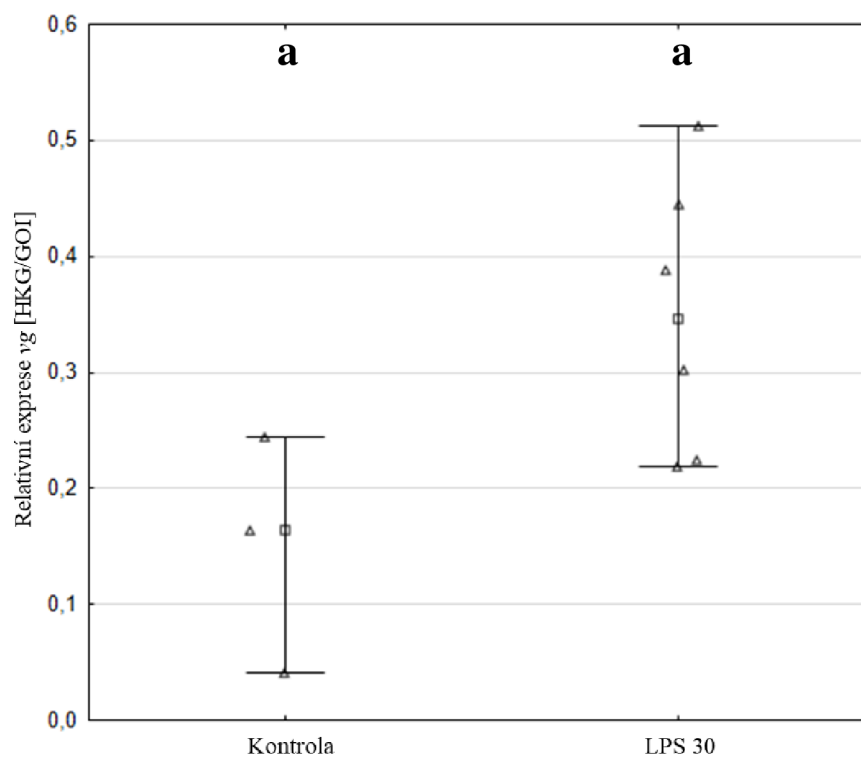
Obr. 34: Relativní exprese *vg* na chromosomu LG2 ve vzorcích zimních dělnic ($n = 4-5$; 3 včely na vzorek) rozdělených do skupin, které byly krmeny 50% sacharosou (kontrola) a $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose (LPS 30) po dobu 48 hod. Konfidenční intervaly s kvantily o koeficientu 5. Čtverec – medián, trojúhelník – naměřená hodnota. Rozdílnými písmeny vyznačen případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) určený Kruskal-Wallisovým testem.

V případě chromosomu LG4 byla exprese *vg* u skupiny LPS 30 opět nevýznamně vyšší ($p = 0,327$) než u kontroly (Obr. 35).



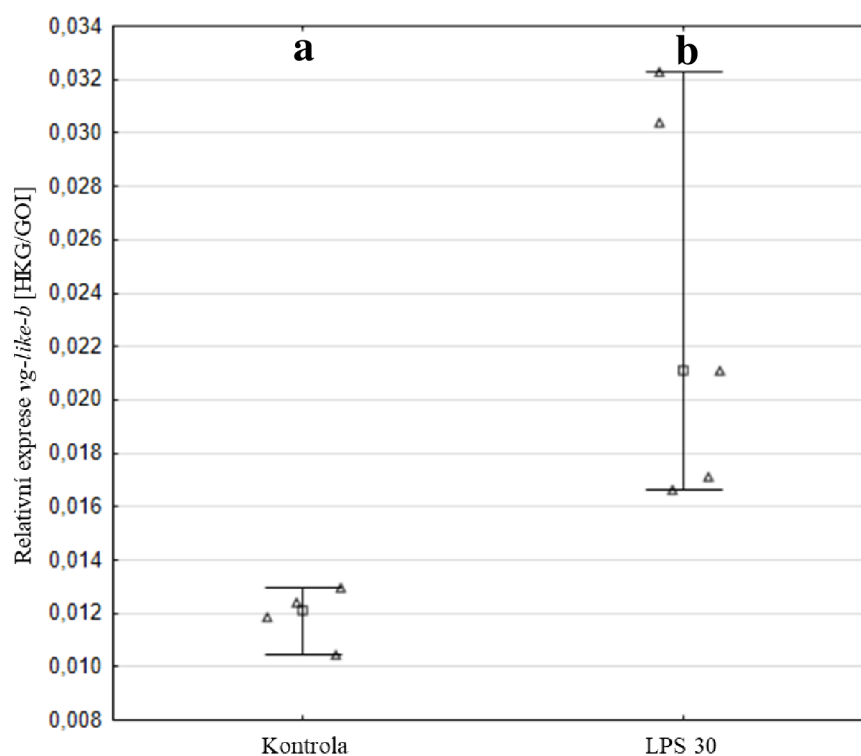
Obr. 35: Relativní exprese *vg* na chromosomu LG4 ve vzorcích zimních dělnic ($n = 4-5$; 3 včely na vzorek) rozdělených do skupin, které byly krmeny 50% sacharosou (kontrola) a $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose (LPS 30) po dobu 48 hod. Konfidenční intervaly s kvantily o koeficientu 5. Čtverec – medián, trojúhelník – naměřená hodnota. Rozdílnými písmeny vyznačen případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) určený Kruskal-Wallisovým testem.

Celková exprese *vg* na chromosomech LG2 a LG4 byla stejně jako u jednotlivých chromosomů vyšší u skupiny LPS 30 ve srovnání s kontrolou, ale opět bez statistické významnosti ($p = 0,071$) (Obr. 36).



Obr. 36: Relativní exprese *vg* na chromosomech LG2 a LG4 ve vzorcích zimních dělnic ($n = 3-6$; 3 včely na vzorek) rozdělených do skupin, které byly krmeny 50% sacharosou (kontrola) a $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose (LPS 30) po dobu 48 hod. Konfidenční intervaly s kvantily o koeficientu 5. Čtverec – medián, trojúhelník – naměřená hodnota. Rozdílnými písmeny vyznačen případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) určený Kruskal-Wallisovým testem.

V případě *vg-like-B* však došlo u skupiny LPS 30 k významnému nárůstu ($p = 0,014$) relativní exprese oproti kontrolní skupině (Obr. 37).

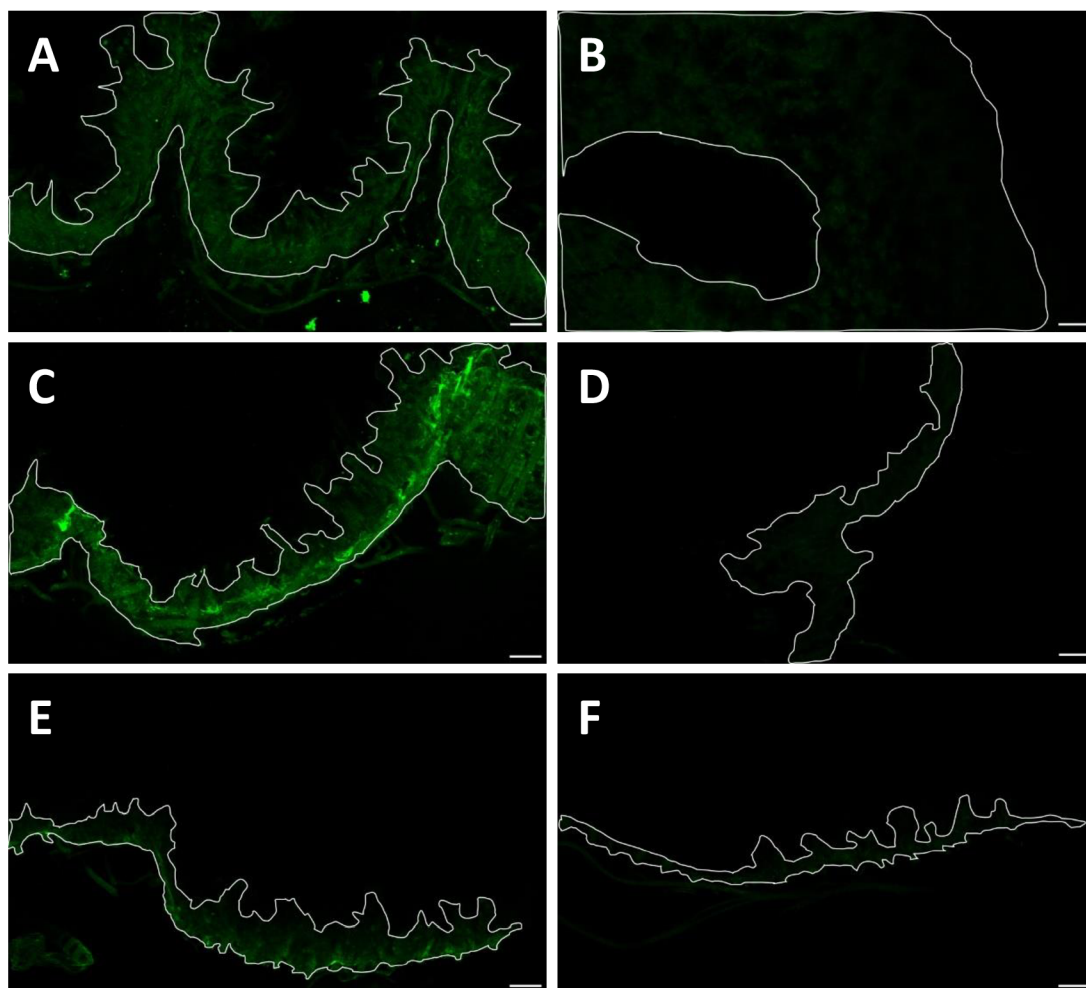


Obr. 37: Relativní exprese *vg-like-B* ve vzorcích zimních dělnic ($n = 4-5$; 3 včely na vzorek) rozdělených do skupin, které byly krmeny 50% sacharosou (kontrola) a $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose (LPS 30) po dobu 48 hod. Konfidenční intervaly s kvantily o koeficientu 5. Čtverec – medián, trojúhelník – naměřená hodnota. Rozdílnými písmeny vyznačen případný statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) určený Kruskal-Wallisovým testem.

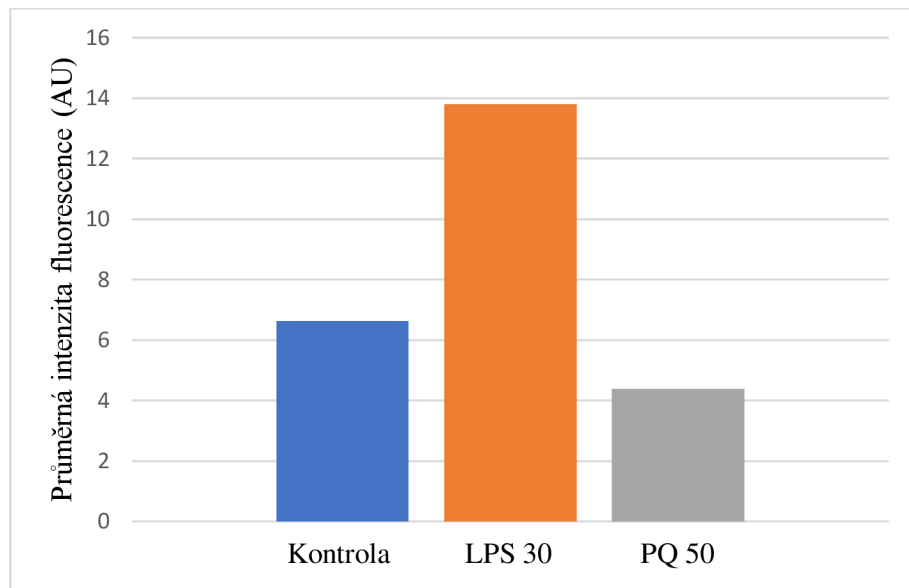
4.4 Imunohistochemická detekce vitellogeninu v žaludku včel

Metodou imunohistochemické detekce za použití primárních protilátek proti vitellogeninu a sekundárních protilátek s navázaným FITC byla zkoumána přítomnost vitellogeninu v řezech žaludků včelích matek a zimní generace dělnic. Včely byly krmeny 50% sacharosou (kontrola), $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose (LPS 30) a $50 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose (PQ 50), přičemž u matek trvalo krmení 24 hod, v případě dělnic trvalo 24 a 48 hod. pro skupinu LPS 30 a 24 hod. pro skupinu PQ 50. Pro zvýšení specifity signálu byly u každého vzorku připraveny tzv. negativní kontroly značení, které nebyly inkubovány s primární protilátkou proti vitellogeninu. Hodnoty signálu vitellogeninu u těchto negativních kontrol byly odečteny od hodnot u jednotlivých vzorků.

Bylo zjištěno, že po 24hod. krmení dělnic zimní generace došlo u skupiny LPS 30 k výraznému nárůstu signálu značení vitellogeninu v žaludku o více než 100 % oproti kontrolní skupině (Obr. 38-39). Naopak u skupiny PQ 50 byl pozorován pokles signálu o více než 30 %.

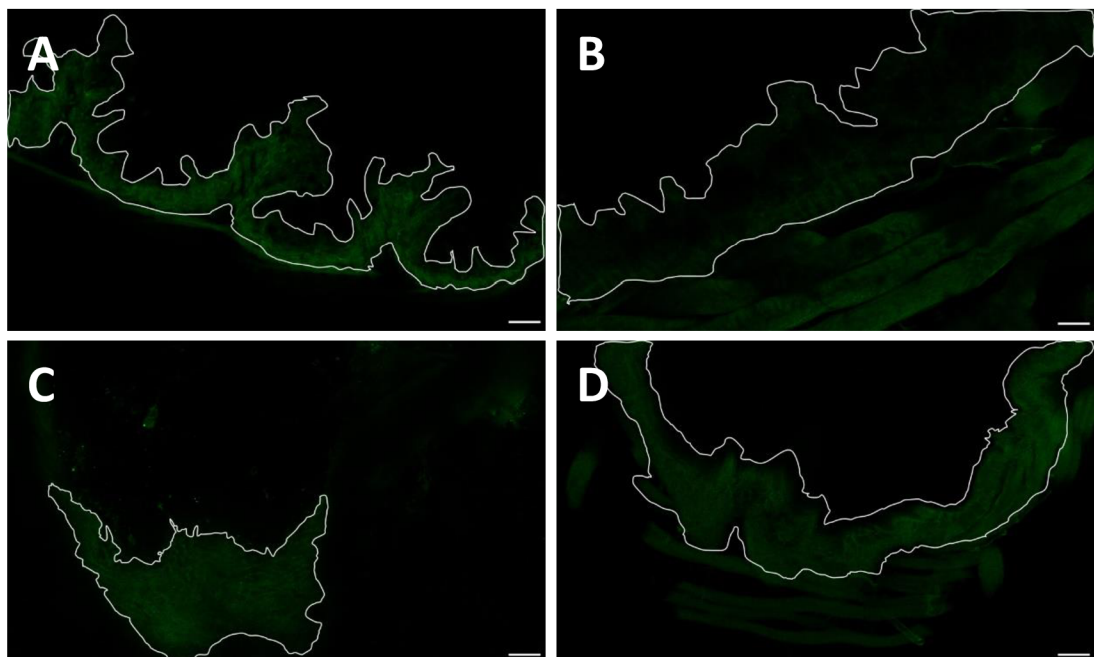


Obr. 38: Mikroskopické snímky imunohistochemické detekce vitellogeninu (zeleně) v žaludcích zimní generace dělnic při zkoumání vlivu roztoků $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose (LPS 30) a $50 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose (PQ 50) podávaných po dobu 24 hod. A: Kontrolní skupina. B: Negativní kontrola značení pro kontrolní skupinu. C: Skupina LPS 30. D: Negativní kontrola značení pro skupinu LPS 30. E: Skupina PQ 50. F: Negativní kontrola značení pro skupinu PQ 50. Bílá křivka vyznačuje oblast žaludku, ve které byla měřena průměrná intenzita fluorescence FITC. Měřítka = $50 \mu\text{m}$. Dutina žaludku je orientována směrem k horní hraně obrázků (kromě B, kde se nachází v prostřední části). Snímky pořízeny konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem. Při snímání použito zalévací médium.

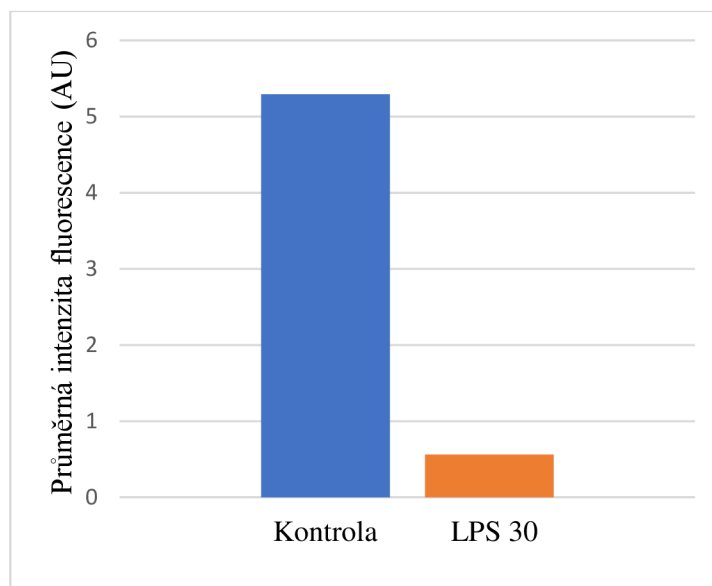


Obr. 39: Průměrná intenzita fluorescence FITC při imunohistochemické detekci vitellogeninu v žaludcích zimní generace dělnic při zkoumání vlivu roztoků $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose (LPS 30) a $50 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose (PQ 50) podávaných po dobu 24 hod.

Při 48 hod. trvajícím krmení zimních dělnic byl v případě skupiny LPS 30 pozorován o 90 % nižší signál značení vitellogeninu než u kontrolní skupiny (Obr. 40-41).

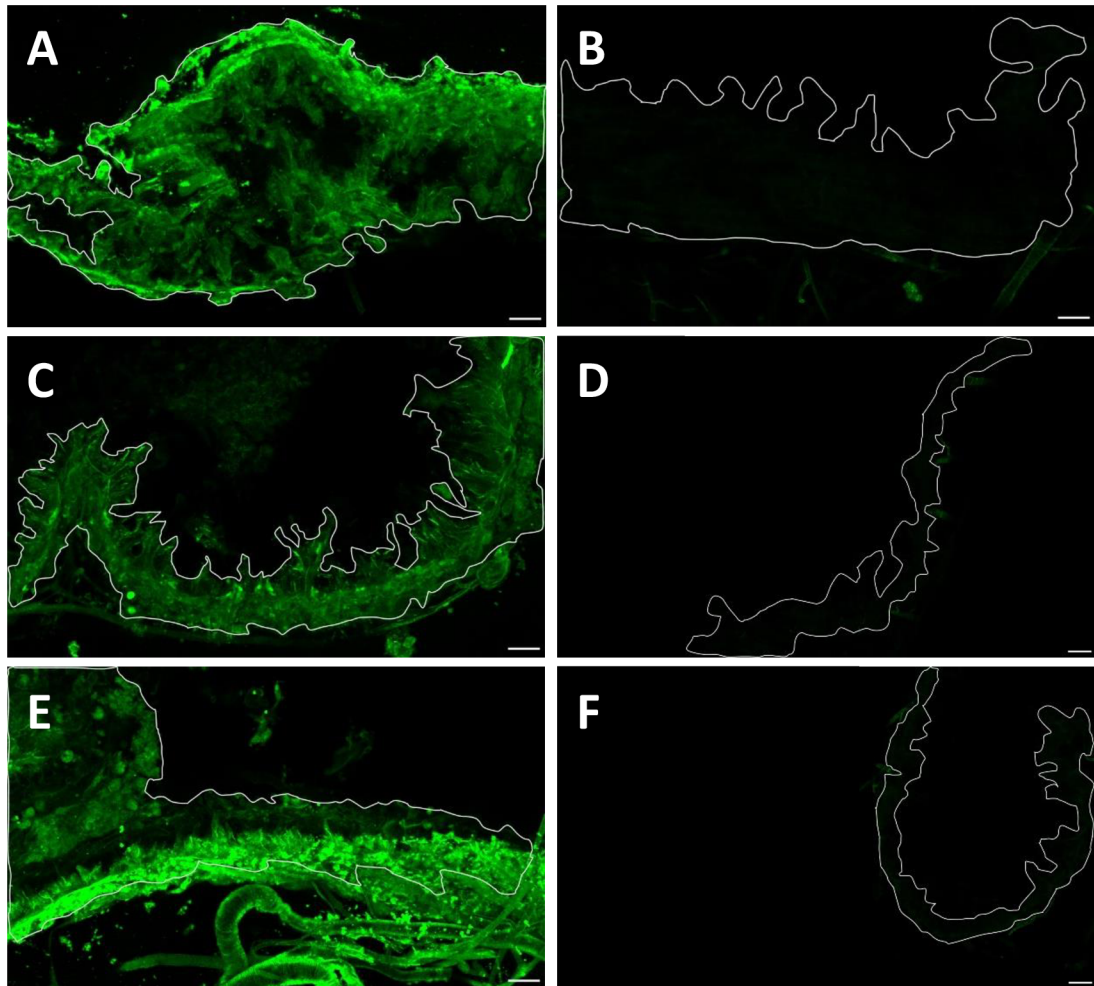


Obr. 40: Mikroskopické snímky imunohistochemické detekce vitellogeninu (zeleně) v žaludcích zimní generace dělnic při zkoumání vlivu roztoku $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose (LPS 30) podávaného po dobu 48 hod. A: Kontrolní skupina. B: Negativní kontrola značení pro kontrolní skupinu. C: Skupina LPS 30. D: Negativní kontrola pro skupinu LPS 30. Bílá křivka vyznačuje oblast žaludku, ve které byla měřena průměrná intenzita fluorescence FITC. Měřítka = $50 \mu\text{m}$. Dutina žaludku je orientována směrem k horní hraně obrázků. Snímky pořízeny konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem. Při snímání použito zalévací médium.

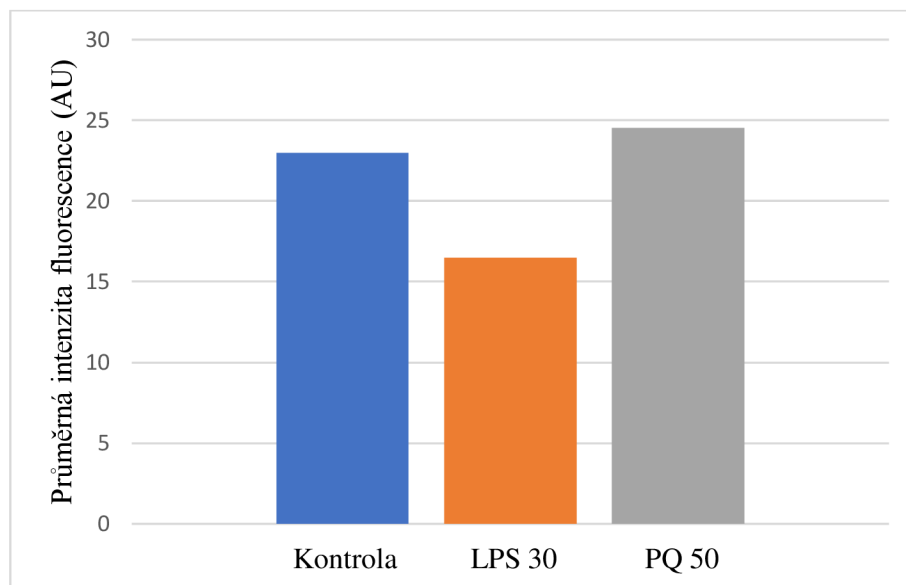


Obr. 41: Průměrná intenzita fluorescence FITC při imunohistochemické detekci vitellogeninu v žaludcích zimní generace dělnic při zkoumání vlivu roztoku $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose (LPS 30) podávaného po dobu 48 hod.

V případě 24 hod. trvajícího krmení včelích matek byl zaznamenán o necelých 30 % nižší signál značení vitellogeninu u skupiny LPS 30 při porovnání s kontrolní skupinou (Obr. 42-43). Kdežto u skupiny PQ 50 byl zjištěn zanedbatelný nárůst signálu o cca 6 %.



Obr. 42: Mikroskopické snímky imunohistochemické detekce vitellogeninu (zeleně) v žaludcích včelích matek při zkoumání vlivu roztoků $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose (LPS 30) a $50 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose (PQ 50) podávaných po dobu 24 hod. A: Kontrolní skupina. B: Negativní kontrola značení pro kontrolní skupinu. C: Skupina LPS 30. D: Negativní kontrola značení pro skupinu LPS 30. E: Skupina PQ 50. F: Negativní kontrola značení pro skupinu PQ 50. Bílá křivka vyznačuje oblast žaludku, ve které byla měřena průměrná intenzita fluorescence FITC. Měřítka = $50 \mu\text{m}$. Dutina žaludku je orientována směrem k horní hraně obrázků. Snímky pořízeny konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem. Při snímání použito zalévací médium.



Obr. 43: Průměrná intenzita fluorescence FITC při imunohistochemické detekci vitellogeninu v žaludcích včelích matek při zkoumání vlivu roztoků $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose (LPS 30) a $50 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose (PQ 50) podávaných po dobu 24 hod.

5 DISKUZE

Při měření hmotnostní koncentrace proteinů v hemolymfě letních dělnic byly pozorovány u kontrolních skupin v rámci experimentu s lipopolysacharidy z *E. coli* snižující se hladiny proteinů s rostoucím věkem včel, což odpovídá zjištění studie Cremonz *et al.* (1998), že během prvních šesti dnů dospělého života dělnic dochází při krmení 50% sacharosou k poklesu koncentrace proteinů v hemolymfě.

Z výsledků je patrné, že k nárůstu koncentrace proteinů dochází u skoro všech skupin LPS 30 oproti kontrole. U ostatních skupin letních dělnic nebyl pozorován jednotný trend růstu či poklesu koncentrace proteinů ve srovnání s kontrolou. V hemolymfě včelích matek byly také zjištěny výrazně vyšší hladiny proteinů u skupiny LPS 30 ve srovnání s kontrolou. U zimní generace dělnic byly naměřeny výrazně vyšší hladiny proteinů oproti letní generaci, což je potvrzením, že se opravdu jednalo o zimní včely, u kterých je typická vyšší koncentrace proteinů (Kunc *et al.*, 2019). Kromě toho byl zaznamenán mírný nárůst hladiny proteinů ve skupině LPS 30 oproti kontrole. Ve srovnání s tím Dostálková *et al.* (2021) sice naměřili v hemolymfě zimní generace dělnic zvýšené množství proteinů oproti letním dělnicím, nicméně ani u jedné skupiny neměl na hladinu proteinů vliv injekčního podání směsi *E. coli* a *P. larvae*. Toto srovnání však není úplně přesné vzhledem k tomu, že se jednalo o směs živých patogenů, navíc podaných jiným způsobem, což můžou být faktory ovlivňující koncentraci proteinů odlišně oproti podání ve stravě.

Při imunochemické detekci vitellogeninu v hemolymfě po krmení LPS byla překvapivě pozorována korelace s růstem koncentrací proteinů pouze u skupin LPS 30 v případě 2-3 dny starých letních dělnic (krmených 24 hod.), u skupin LPS 15 a 30 u 1-2 dny starých letních dělnic (krmených 48 hod.) a u skupiny LPS 30 v případě zimních dělnic, přestože se jedná o jeden z hlavních proteinů hemolymfy (Engels *et al.*, 1990; Hagedorn & Moeller, 2015). Nebyl ani zaznamenán jednotný trend v rámci stáří či délky krmení. Salmela *et al.*, (2015) zjistili, že se vitellogenin váže na LPS, na základě čehož by se dalo předpokládat, že bude v případě včel, které těmto molekulám byly vystaveny, detekován nižší signál vitellogeninu v hemolymfě. Důvodem by teoreticky mohlo být, že interakcí tohoto proteinu s LPS by mohlo dojít k překrytí epitopů, na které se poté při imunochemické detekci nemohou v plném rozsahu navázat primární protilátky. Přestože by vazba mezi vitellogeninem a LPS měla být rozrušena denaturací proteinů při SDS-PAGE metodě, tomuto teoretickému předpokladu odpovídají výsledky z experimentu,

kdy byly dělnice krmeny po dobu 24 hod. Docházelo k poklesu signálu detekovaného vitellogeninu u skoro všech skupin, které byly krmeny LPS, až na výjimku v podobě skupiny LPS 30 u 2-3 dny starých včel. Zatímco v případě krmení po dobu 48 hod. bylo pozorováno výrazné zvýšení i snížení v intenzitě pásů vitellogeninu ve skupinách krmených LPS v porovnání s kontrolou, avšak bez možnosti zobecnění v podobě jednotného trendu. Nicméně u matek byla detekována nepatrně snížená úroveň intenzity značení vitellogeninu. Zmíněný předpoklad však nebyl naplněn u zimní generace dělnic, kdy došlo naopak k detekci mírně zvýšené intenzity signálu po podání LPS. Hypoteticky by důvodem mohlo být, že by v případě delšího krmení dělnic probíhalo mírně odlišné zpracování potravy obsahující LPS, což by následně ovlivňovalo interakci těchto molekul s vitellogeninem.

V případě koncentrace proteinů v hemolymfě letních dělnic po krmení paraquatem, působícím na včely toxicky (Moffett *et al.*, 1972; Morton *et al.*, 1972), byly naměřeny mírně rozdílné hodnoty oproti kontrolním skupinám, nebyl však u nich pozorován jednotný trend růstu či poklesu, který by bylo možné vztáhnout na všechny tři experimenty o rozdílných délkách krmení (2, 4 a 8 hod.). Takový výsledek byl očekáván vzhledem k tomu, že Salmela *et al.* (2016) nepozorovali zvýšenou expresi vitellogeninu po podání paraquatu. Vzhledem k tomu, že vitellogenin může tvořit až 40 % všech proteinů hemolymfy dělnic (Barchuk *et al.*, 2002), bylo předpokládáno, že na úrovni proteinů nebude docházet k výraznějším změnám koncentrace. Nicméně v případě hladiny vitellogeninu v hemolymfě letních dělnic po podání paraquatu značné výkyvy pozorovány byly. V případě 2hod. krmení, by pokles signálu vitellogeninu mohl být teoreticky vysvětlen tím, že by prokázaná karbonylace tohoto proteinu (Seehuus *et al.*, 2006) mohla způsobovat změny ve struktuře polypeptidového řetězce, což je prozkoumaný jev u člověka (Gonos *et al.*, 2018), a následné zhoršení afinity primárních protilátek při detekci tohoto proteinu. Následný nárůst značení vitellogeninu při delším krmení by mohl být dán zvýšenou syntézou tohoto proteinu v reakci na déle působící oxidační stres, což úplně neodpovídá zmiňovanému zjištění autorů Salmela *et al.* (2016), kteří nepozorovali zvýšenou expresi *vitellogeninu*. Nicméně nezkoumali účinek, jak tento herbicid ovlivní imunochemickou detekci vitellogeninu v hemolymfě, jejíž výsledky by se od úrovně exprese mohly lišit vlivem posttranslačních modifikací (Havukainen *et al.*, 2011). V případě matek a zimní generace dělnic byl však při 24hod. krmení zaznamenán mírný pokles vitellogeninu. Tento jev bude potřeba tedy dále zkoumat.

Při analýze pásů proteinů, které byly značeny při imunochemické detekci, pomocí metody MALDI bylo zjištěno, že tyto pásy odpovídají kromě vitellogeninu i dalším proteinům, např. apolipoproteinům, hexamerinu, transferinu, aktinu, což jsou běžně se vyskytující proteiny ve včelí hemolymfě (Randolt *et al.*, 2008; Bogaerts *et al.*, 2009). Takový výsledek je pravděpodobně způsoben nižší specifitou primární protilátky proti vitellogeninu. Ta byla připravena v Biologickém centru AV ČR imunizací králíků domácích (*Oryctolagus cuniculus f. domesticus*) vzorky proteinů včelí hemolymfy, které byly separovány pomocí SDS elektroforézy. Nicméně se tedy zdá, že by pro zlepšení specifity protilátek měl být k imunizaci použit pouze vitellogenin ve více přečištěné podobě. Jeho purifikaci bude tedy ještě nutné optimalizovat.

Při měření relativní genové exprese *vg* po krmení LPS nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v případě 1-2 dny starých letních dělnic a také u zimních dělnic. To odpovídá práci (Byhrø *et al.*, 2019), kteří také nezaznamenali výrazně odlišné hodnoty exprese. Nicméně v případě jejich výzkumu byla exprese měřena po podání LPS z *E. coli* ve formě injekce, a tedy ji nelze brát za plně srovnatelnou. U včel starých 2-3 dny však byly pozorovány významně vyšší hodnoty exprese *vg* v případě skupiny LPS 30 pro expresi *vg* na chromosomu LG2 a u skupiny LPS 60, kdy se jednalo o expresi na LG4 chromosomu. Nicméně tomu úplně neodpovídal fakt, že celková exprese *vg* na obou chromosomech významně vyšší po podání LPS nebyla. Teoreticky by to mohlo být způsobeno rozdílnou efektivitou použitých setů primerů. Gen *vg-like-B* je strukturním homologem *vg*, a jeho významně zvýšená exprese u 2-3 dny starých a zimních dělnic, která by mohla naznačovat roli *vg-like-B* proteinu v imunitních reakcích, je překvapivým zjištěním. Úplně totiž neodpovídá práci Salmela *et al.* (2016), kteří pozorovali vyšší expresi *vg-like-B* v reakci na oxidační stres, ale nikoliv na zánět vyvolaný injekcí. Vzhledem k tomu, že se jedná o méně prozkoumaný protein, bude k definitivnímu určení jeho funkcí potřeba další výzkum.

Při imunohistochemické detekci vitellogeninu v žaludcích zimních dělnic byly pozorovány výrazné rozdíly zejména po krmení LPS. V případě včel krmených 24 hod. byl detekován značně silnější signál vitellogeninu v porovnání s kontrolou, nicméně po 48hod. došlo naopak k výraznému poklesu. Výrazně více vitellogeninu bylo zaznamenáno u kontrolních matek ve srovnání s kontrolními dělnicemi. V případě včel, krmených paraquatem nebyly detekovány přílišné změny, kdežto po jejich krmení LPS bylo pozorováno snížení signálu vitellogeninu. Sledované rozdíly mohou být teoreticky

dány lišícími se funkcemi vitellogeninu v žaludku u matek a dělnic. U dělnic se předpokládá, že ze žaludku přenáší fragmenty bakterií do hypofaryngeálních žláz, kdežto u matek, podobně jako u jiných hmyzích druhů, by je mohl přenášet do vajíček ve vaječnicích, obojí v rámci imunitní přípravy (Freitak *et al.*, 2009; Salmela *et al.*, 2015; Harwood *et al.*, 2019). Druhou možností je, že mírná exprese *vg* v žaludku, kterou pozorovali Harwood & Amdam (2021b), se teoreticky může mezi dělnicemi a matkami lišit a způsobovat mezi kastami změny v detekci vitellogeninu, přičemž imunitní elicitory v podobě LPS by mohly tyto rozdíly zvětšovat. Další výzkum by se tak na tuto problematiku mohl podrobněji zaměřit, kdy by mohla být měřena exprese *vg* v buňkách žaludku po podání LPS.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se aktuálních znalostí o funkci proteinu vitellogeninu včely medonosné v reprodukci, imunitních reakcích a při oxidačním stresu. Také byla popsána jeho tkáňová lokalizace a produkce během vývoje, ovlivnění jeho produkce pomocí metody RNAi či exprese v závislosti na potravě a prostředí. Představeny byly také *vg-like* proteiny a jejich funkce. V experimentální části bylo cílem optimalizovat metody kvantifikace genové exprese, hladiny proteinu a imunohistochemické lokalizace vitellogeninu ve střevech (žaludku) včel. Třetím cílem bylo sledování změn vitellogeninu při reakcích na lipopolysacharidy (LPS) a herbicid paraquat (PQ).

V této práci bylo dosaženo následujících výsledků:

1. Pomocí Bradfordovy metody byla určena celková koncentrace proteinů v hemolymfě letních a zimních dělnic a matek. Vyšší hladiny proteinů byly naměřeny zejména u dělnic po krmení 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose.
2. Využitím metody SDS-PAGE byly separovány proteiny ve vzorcích hemolymfy.
3. Pomocí protilátek byl detekován vitellogenin na nitrocelulosové membráně metodou Western blot. Porovnáním intenzity pásů vitellogeninu byl zjištěn u letních dělnic, krmených paraquatem po dobu 2 hod., pokles signálu, a naopak jeho nárůst při krmení trvajícím 4 hod. Po krmení lipopolysacharidy byl pozorován u letních dělnic pokles signálu vitellogeninu po krmení po dobu 24 hod.
4. Metodou qPCR byla změřena relativní exprese genu *vitellogeninu* na chromosomech LG2 a LG4 a jeho homologu *vg-like-B* ve vzorcích včel krmených lipopolysacharidy, u kterých byla detekována zvýšená exprese v případě 2-3 dny starých včel. U vzorků zimní generace dělnic byla po krmení LPS zaznamenána vyšší exprese *vg-like-B*.
5. Byla provedena imunohistochemická detekce vitellogeninu v žaludcích včel, přičemž byl pozorován silnější signál v případě matek oproti zimním dělnicím, u zimních dělnic byl zaznamenán nárůst signálu v případě krmení LPS po dobu 24 hod, a naopak pokles po krmení trvajícím 48 hod.

Další práce by se mohla zaměřit na detekci exprese genu *vitellogeninu* a *vg-like* genů *in situ* hybridizačními metodami a také by mohla být změřena exprese *vg* v buňkách žaludku po krmení včel lipopolysacharidy a paraquatem.

7 LITERATURA

- Abdelkader, F. B., Kairo, G., Bonnet, M., Barbouche, N., Belzunces, L. P., & Brunet, J. L. (2019). Effects of clothianidin on antioxidant enzyme activities and malondialdehyde level in honey bee drone semen. *Journal of Apicultural Research*, 58(5), 740-745. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1655182>
- Alatawy, M., Al-Attas, S. G., Al-Shehri, A., Assagaf, A. I., Alghamdi, K. M., & Bahieldin, A. (2020). Gut Microbial Communities of Adult Honey Bee Workers (*Apis mellifera*). *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 17(2), 353-362. <https://doi.org/10.13005/bbra/2838>
- Amdam, G. V. (2011). Social context, stress, and plasticity of aging. *Aging Cell*, 10(1), 18-27. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00647.x>
- Amdam, G. V., & Omholt, S. W. (2003a). 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., & Omholt, S. W. (2002). The Regulatory Anatomy of Honeybee Lifespan. *Journal of Theoretical Biology*, 216(2), 209-228. <https://doi.org/10.1006/jtbi.2002.2545>
- Amdam, G. V., Hartfelder, K., Norberg, K., Hagen, A., & Omholt, S. W. (2004a). Altered Physiology in Worker Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Infested with the Mite *Varroa destructor* (Acari). *Journal of Economic Entomology*, 97(3), 741-747. <https://doi.org/10.1093/jee/97.3.741>
- Amdam, G. V., Norberg, K., Fondrk, M. K., & Page, R. E. (2004b). Reproductive ground plan may mediate colony-level selection effects on individual foraging behavior in honey bees. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(31), 11350-11355. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403073101>
- 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>
- Amdam, G. V., Simões, Z. L. P., Guidugli, K. R., Norberg, K., & Omholt, S. W. (2003c). Disruption of vitellogenin gene function in adult honeybees by intra-abdominal injection of double-stranded RNA. *BMC Biotechnology*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/1472-6750-3-1>
- Amdam, G. V., Aase, A. L. T. O., Seehuus, S. -C., Kim Fondrk, M., Norberg, K., & Hartfelder, K. (2005a). Social reversal of immunosenescence in honey bee workers. *Experimental Gerontology*, 40(12), 939-947. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.08.004>
- Amdam, G. V., Ihle, K. E., & Page, R. E. (2009). Regulation of Honeybee Worker (*Apis mellifera*) Life Histories by Vitellogenin. In D. W. Pfaff, *Hormones, Brain and Behavior* (pp. 1003-1027). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008088783-8.00029-2>
- Amdam, G. V., Norberg, K., Hagen, A., & Omholt, S. W. (2003b). 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., Norberg, K., Omholt, S. W., Kryger, P., Lourenço, A. P., Bitondi, M. M. G., & Simões, Z. L. P. (2005b). Higher vitellogenin concentrations in honey bee workers may be an adaptation to life in temperate climates. *Insectes Sociaux*, 52(4), 316-319. <https://doi.org/10.1007/s00040-005-0812-2>
- Antúnez, K., Mendoza, Y., Santos, E., & Invernizzi, C. (2015). Differential expression of vitellogenin in honey bees (*Apis mellifera*) with different degrees of *Nosema ceranae* infection. *Journal of Apicultural Research*, 52(5), 227-234. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.5.09>
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 207-225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Atzmon, G., Gabriely, I., Greiner, W., Davidson, D., Schechter, C., & Barzilai, N. (2002). Plasma HDL Levels Highly Correlate With Cognitive Function in Exceptional Longevity. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 57(11), M712-M715. <https://doi.org/10.1093/gerona/57.11.M712>

- Balieira, K. V. B., Mazzo, M., Bizerra, P. F. V., Guimarães, A. R. de J. S., Nicodemo, D., & Mingatto, F. E. (2018). Imidacloprid-induced oxidative stress in honey bees and the antioxidant action of caffeine. *Apidologie*, *49*(5), 562-572. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0583-1>
- Barchuk, A. R., Bitondi, M. M. G., & Simões, Z. L. P. (2002). Effects of juvenile hormone and ecdysone on the timing of vitellogenin appearance in hemolymph of queen and worker pupae of *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, *2*(1), 1-8. <https://doi.org/10.1673/031.002.0101>
- Bitondi, M. M. G., & Simões, Z. L. P. (1996). The relationship between level of pollen in the diet, vitellogenin and juvenile hormone titres in Africanized *Apis mellifera* workers. *Journal of Apicultural Research*, *35*(1), 27-36. <https://doi.org/10.1080/00218839.1996.11100910>
- Blum, M. S., Novak, A. F., & Taber, S. (1959). 10-Hydroxy-delta 2 -Decenoic Acid, an Antibiotic Found in Royal Jelly. *Science*, *130*(3373), 452-453. <https://doi.org/10.1126/science.130.3373.452>
- Bogaerts, A., Baggerman, G., Vierstraete, E., Schoofs, L., & Verleyen, P. (2009). The hemolymph proteome of the honeybee: Gel-based or gel-free? *Proteomics*, *9*(11), 3201-3208. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800604>
- Boncrisiani, H., Underwood, R., Schwarz, R., Evans, J. D., Pettis, J., & vanEngelsdorp, D. (2012). Direct effect of acaricides on pathogen loads and gene expression levels in honey bees *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*, *58*(5), 613-620. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.12.011>
- Bradford, 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/10.1006/abio.1976.9999>
- Brandt, C. R., Adang, M. J., & Spence, K. D. (1978). The peritrophic membrane: Ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *Orgyia pseudotsugata*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *32*(1), 12-24. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(78\)90169-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(78)90169-6)
- Bucekova, M., Sojka, M., Valachova, I., Martinotti, S., Ranzato, E., Szep, Z., Majtan, V., Kludiny, J., & Majtan, J. (2017). Bee-derived antibacterial peptide, defensin-1, promotes wound re-epithelialisation in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, *7*(1), 7340. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07494-0>
- Buchon, N., Broderick, N. A., Poidevin, M., Pradervand, S., & Lemaitre, B. (2009). Drosophila Intestinal Response to Bacterial Infection: Activation of Host Defense and Stem Cell Proliferation. *Cell Host & Microbe*, *5*(2), 200-211. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.01.003>
- Byhrø, E. M. H., Salmela, H., Vitlic, A., Wang, Y., Münch, D., & Amdam, G. V. (2019). Different activation of immune-related genes in honey bee nurses and foragers (*Apis mellifera*). *Apidologie*, *50*(4), 463-471. <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00658-z>
- Callewaert, L., & Michiels, C. W. (2010). Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences*, *35*(1), 127-160. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0015-5>
- Capella, I. C. S., & Hartfelder, K. (1998). Juvenile hormone effect on DNA synthesis and apoptosis in caste-specific differentiation of the larval honey bee (*Apis mellifera* L.) ovary. *Journal of Insect Physiology*, *44*(5-6), 385-391. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(98\)00027-4](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(98)00027-4)
- 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*. <https://doi.org/10.1111/imb.12694>
- Corona, M., Hughes, K. A., Weaver, D. B., & Robinson, G. E. (2005). Gene expression patterns associated with queen honey bee longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*, *126*(11), 1230-1238. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2005.07.004>
- 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>
- Crailsheim, K. (1986). Dependence of protein metabolism on age and season in the honeybee (*Apis mellifica carnica* Pollm). *Journal of Insect Physiology*, *32*(7), 629-634. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(86\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(86)90092-2)
- Crailsheim, K. (1991). Interadult feeding of jelly in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Journal of Comparative Physiology B*, *161*(1), 55-60. <https://doi.org/10.1007/BF00258746>

- Cremer, S., Armitage, S. A. O., & Schmid-Hempel, P. (2007). Social Immunity. *Current Biology*, 17(16), R693-R702. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>
- Cremonz, T. M., De Jong, D., & Bitondi, M. M. G. (1998). Quantification of Hemolymph Proteins as a Fast Method for Testing Protein Diets for Honey Bees (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology*, 91(6), 1284-1289. <https://doi.org/10.1093/jee/91.6.1284>
- Dainat, B., Evans, J. D., Chen, Y. P., Gauthier, L., Neumann, P., & Aguilar, P. V. (2012). Predictive Markers of Honey Bee Colony Collapse. *PLoS ONE*, 7(2), e32151. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032151>
- Dalle-Donne, I., Aldini, G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2006). Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(2), 389-406. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00407.x>
- 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>
- Dostálková, S., Dobeš, P., Kunc, M., Hurychová, J., Škrabišová, M., Petřivalský, M., Titěra, D., Havlík, J., Hyršl, P., & Danihlík, J. (2021). Winter honeybee (*Apis mellifera*) populations show greater potential to induce immune response than summer ones after immune stimuli. *Journal of Experimental Biology*, 224(3), jeb232595. <https://doi.org/10.1242/jeb.232595>
- Dussaubat, C., Brunet, J. -L., Higes, M., Colbourne, J. K., Lopez, J., Choi, J. -H., Martín-Hernández, R., Botías, C., Cousin, M., McDonnell, C., *et al.* (2012). Gut Pathology and Responses to the Microsporidium *Nosema ceranae* in the Honey Bee *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 7(5), e37017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037017>
- Engels, W. (1973). Das zeitliche und räumliche Muster der Dottereinlagerung in die Oozyte von *Apis mellifica*. *Z. Zellforsch*, 142, 409-430.
- Engels, W., Kaatz, H., Zillikens, A., Simões, Z. L. P., Trube, A., Braun, R., Dittrich, F., Hoshi, M., & Yamashita, O. (1990). Honey bee reproduction: vitellogenin and caste-specific regulation of fertility. In *Advances in invertebrate reproduction 5* (pp. 495 - 502). Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division).
- Engels, W. (1974). Occurrence and Significance of Vitellogenins in Female Castes of Social Hymenoptera. *American Zoologist*, 14(4), 1229-1237. <https://doi.org/10.1093/icb/14.4.1229>
- Evans, J. D., Shearman, D. C. A., & Oldroyd, B. P. (2004). Molecular basis of sex determination in haplodiploids. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(1), 1-3. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2003.11.001>
- Fahrbach, S. E., & Robinson, G. E. (1996). Juvenile Hormone, Behavioral Maturation, and Brain Structure in the Honey Bee. *Developmental Neuroscience*, 18(1-2), 102-114. <https://doi.org/10.1159/000111474>
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Michaut, L., Lagueux, M., Broekaert, W. F., Hetru, C., & Hoffmann, J. A. (1994). Insect immunity. Septic injury of *Drosophila* induces the synthesis of a potent antifungal peptide with sequence homology to plant antifungal peptides. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 33159-33163. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)30111-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)30111-3)
- Fielding, K., Hepburn, H. R., & Chandler, H. D. (1980). On the development of flight competence in worker honeybees. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 65(1), 129-133. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(80\)90392-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(80)90392-8)
- Fischer, P., & Grozinger, C. M. (2008). Pheromonal regulation of starvation resistance in honey bee workers (*Apis mellifera*). *Naturwissenschaften*, 95(8), 723-729. <https://doi.org/10.1007/s00114-008-0378-8>
- Fleig, R., Gutzeit, H. O., & Engels, W. (1991). Structural organization of ovarian follicle cells in the cotton bug (*Dysdercus intermedius*) and the honeybee (*Apis mellifera*). *Cell & Tissue Research*, 265(2), 297-305. <https://doi.org/10.1007/BF00398077>
- Foley, E., O'Farrell, P. H., & Michael Levine. (2004). Functional Dissection of an Innate Immune Response by a Genome-Wide RNAi Screen. *PLoS Biology*, 2(8), e203. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020203>

- Fontana, R., Mendes, M. A., Souza, B. M. de, Konno, K., César, L. M. M., Malaspina, O., & Palma, M. S. (2004). Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*, 25(6), 919-928. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.03.016>
- Free, J. B. (1987). *Pheromones of social bees*. Chapman and Hall.
- Freitak, D., Heckel, D. G., & Vogel, H. (2009). Dietary-dependent trans-generational immune priming in an insect herbivore. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1667), 2617-2624. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0323>
- Freitak, D., Schmidtberg, H., Dickel, F., Lochnit, G., Vogel, H., & Vilcinskas, A. (2014). The maternal transfer of bacteria can mediate trans-generational immune priming in insects. *Virulence*, 5(4), 547-554. <https://doi.org/10.4161/viru.28367>
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., & Kobayashi, K. (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of Biological Chemistry*, 265(19), 11333-11337. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38596-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38596-5)
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 3(9), 710-720. <https://doi.org/10.1038/nri1180>
- Gasparovic, A. C., Jaganjac, M., Mihaljevic, B., Sunjic, S. B., & Zarkovic, N. (2013). Assays for the Measurement of Lipid Peroxidation. In L. Galluzzi, I. Vitale, O. Kepp, & G. Kroemer (Eds.), *Cell Senescence* (pp. 283-296). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-239-1_19
- Gomaa, S. A. S., Barakat, E. M. S., Salama, M. S., & El-Gohary, E. E. (2021). Effect of the Bacterium *Paenibacillus larvae* larvae on Vitellogenin Gene Expression of the Queen Honey Bee *Apis mellifera* L. *African Entomology*, 29(1), 96-103. <https://doi.org/10.4001/003.029.0096>
- Gonos, E. S., Kapetanou, M., Sereikaite, J., Bartosz, G., Naparło, K., Grzesik, M., & Sadowska-Bartos, I. (2018). Origin and pathophysiology of protein carbonylation, nitration and chlorination in age-related brain diseases and aging. *Aging*, 10(5), 868-901. <https://doi.org/10.18632/aging.101450>
- González-Santoyo, I., & Córdoba-Aguilar, A. (2012). Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 142(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x>
- Guidugli, K. R., Nascimento, A. M., Amdam, G. V., Barchuk, A. R., Omholt, S., Simões, Z. L. P., & Hartfelder, K. (2005b). Vitellogenin regulates hormonal dynamics in the worker caste of a eusocial insect. *FEBS Letters*, 579(22), 4961-4965. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.07.085>
- Guidugli, K. R., Piulachs, M. -D., Bellés, X., Lourenço, A. P., & Simões, Z. L. P. (2005a). Vitellogenin expression in queen ovaries and in larvae of both sexes of *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 59(4), 211-218. <https://doi.org/10.1002/arch.20061>
- Guidugli-Lazzarini, K. R., do Nascimento, A. M., Tanaka, E. 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>
- Ha, E. -M., Oh, C. -T., Bae, Y. S., & Lee, W. -J. (2005). A Direct Role for Dual Oxidase in *Drosophila* Gut Immunity. *Science*, 310(5749), 847-850. <https://doi.org/10.1126/science.1117311>
- Hagedorn, H. H., & Moeller, F. E. (2015). The Rate of Pollen Consumption by Newly Emerged Honeybees. *Journal of Apicultural Research*, 6(3), 159-162. <https://doi.org/10.1080/00218839.1967.11100176>
- Harman, D. (1956). Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. *Journal of Gerontology*, 11(3), 298-300. <https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298>
- Harrison, J. F., & Fewell, J. H. (2002). Environmental and genetic influences on flight metabolic rate in the honey bee, *Apis mellifera*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 133(2), 323-333. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00163-0](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00163-0)
- Hartfelder, K., Bitondi, M. M. G., Santana, W. C., & Simões, Z. L. P. (2002). Ecdysteroid titer and reproduction in queens and workers of the honey bee and of a stingless bee: loss of ecdysteroid function at increasing levels of sociality? *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 32(2), 211-216. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00100-X](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00100-X)

- Hartfelder, K., & Engels, W. (1998). Social Insect Polymorphism: Hormonal Regulation of Plasticity in Development and Reproduction in the Honeybee. *Current topics in developmental biology*, 40, 45-77. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60364-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60364-6)
- Hartfelder, K., & Steinbrück, G. (1997). Germ cell cluster formation and cell death are alternatives in caste-specific differentiation of the larval honey bee ovary. *Invertebrate Reproduction & Development*, 31(1-3), 237-250. <https://doi.org/10.1080/07924259.1997.9672582>
- Hartfelder, K., Tiberio, G. J., Lago, D. C., Dallacqua, R. P., & Bitondi, M. M. G. (2018). The ovary and its genes—developmental processes underlying the establishment and function of a highly divergent reproductive system in the female castes of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 49(1), 49-70. <https://doi.org/10.1007/s13592-017-0548-9>
- Harwood, G., & Amdam, G. (2021a). Vitellogenin in the honey bee midgut. *Apidologie*, 52(4), 837-847. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00869-3>
- Harwood, G., Amdam, G., & Freitak, D. (2019). The role of Vitellogenin in the transfer of immune elicitors from gut to hypopharyngeal glands in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 112, 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.12.006>
- Harwood, G., Salmela, H., Freitak, D., & Amdam, G. (2021b). Social immunity in honey bees: royal jelly as a vehicle in transferring bacterial pathogen fragments between nestmates. *Journal of Experimental Biology*, 224(7), jeb231076. <https://doi.org/10.1242/jeb.231076>
- Hausman, D. B., Fischer, J. G., & Johnson, M. A. (2012). Protein, lipid, and hematological biomarkers in centenarians: Definitions, interpretation and relationships with health. *Maturitas*, 71(3), 205-212. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.12.002>
- 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, O., 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, O. (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>
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., & Toprak, U. (2009). New Insights into Peritrophic Matrix Synthesis, Architecture, and Function. *Annual Review of Entomology*, 54(1), 285-302. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090559>
- Hernández López, J., Schuehly, W., Crailsheim, K., & Riessberger-Gallé, U. (2014). Trans-generational immune priming in honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1785), 20140454. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0454>
- Hoover, S. E. R., Keeling, C. I., Winston, M. L., & Slessor, K. N. (2003). The effect of queen pheromones on worker honey bee ovary development. *Naturwissenschaften*, 90(10), 477-480. <https://doi.org/10.1007/s00114-003-0462-z>
- Huang, Z. -Y., & Robinson, G. E. (1996). Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 39(3), 147-158. <https://doi.org/10.1007/s002650050276>
- Hunt, G. J., Page, R. E., Fondrk, M. K., & Dullum, C. J. (1995). Major quantitative trait loci affecting honey bee foraging behavior. *Genetics*, 141(4), 1537-1545. <https://doi.org/10.1093/genetics/141.4.1537>
- 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), e0184108. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184108>
- Chapman, R. F. (2012). *The Insects: Structure and Function* (1st ed.). Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511818202>

- Cho, N. -H., & Seong, S. -Y. (2009). Apolipoproteins inhibit the innate immunity activated by necrotic cells or bacterial endotoxin. *Immunology*, 128(1pt2), e479-e486. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2008.03002.x>
- Christen, V., Mittner, F., & Fent, K. (2016). Molecular Effects of Neonicotinoids in Honey Bees (*Apis mellifera*). *Environmental Science & Technology*, 50(7), 4071-4081. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00678>
- Christen, V., Vogel, M. S., Hettich, T., & Fent, K. (2019). A Vitellogenin Antibody in Honey Bees (*Apis mellifera*): Characterization and Application as Potential Biomarker for Insecticide Exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(5), 1074-1083. <https://doi.org/10.1002/etc.4383>
- Ihle, K. E. (2023). Genetic stock affects expression patterns of the multifunctional gene Vitellogenin in honey bee workers. *Journal of Apicultural Research*, 1-3. <https://doi.org/10.1080/00218839.2023.2166231>
- Jassim, O., Huang, Z. Y., & Robinson, G. E. (2000). Juvenile hormone profiles of worker honey bees, *Apis mellifera*, during normal and accelerated behavioural development. *Journal of Insect Physiology*, 46(3), 243-249. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00176-6](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00176-6)
- Jaycox, E. R., Skowronek, W., & Guynn, G. (1974). Behavioral Changes in Worker Honey Bees (*Apis mellifera*) Induced by Injections of a Juvenile Hormone Mimic1. *Annals of the Entomological Society of America*, 67(4), 529-534. <https://doi.org/10.1093/aesa/67.4.529>
- Kim, Y. -H., Kim, B. -Y., Kim, J. -M., Choi, Y. -S., Lee, M. -Y., Lee, K. -S., & Jin, B. -R. (2022). Differential Expression of Major Royal Jelly Proteins in the Hypopharyngeal Glands of the Honeybee *Apis mellifera* upon Bacterial Ingestion. *Insects*, 13(4), 334. <https://doi.org/10.3390/insects13040334>
- Klaudiny, J., Bachanová, K., Kohútová, L., Džúrová, M., Kopernický, J., & Majtán, J. (2012). Expression of larval jelly antimicrobial peptide defensin1 in *Apis mellifera* colonies. *Biologia*, 67(1), 200-211. <https://doi.org/10.2478/s11756-011-0153-8>
- Knorr, E., Schmidtberg, H., Arslan, D., Bingsohn, L., & Vilcinskis, A. (2015). Translocation of bacteria from the gut to the eggs triggers maternal transgenerational immune priming in *Tribolium castaneum*. *Biology Letters*, 11(12), 20150885. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0885>
- Koywiwattrakul, P., & Sittipraneed, S. (2009). Expression of Vitellogenin and Transferrin in Activated Ovaries of Worker Honey Bees, *Apis mellifera*. *Biochemical Genetics*, 47(1-2), 19-26. <https://doi.org/10.1007/s10528-008-9202-6>
- Kunc, M., Dobeš, P., Hurychová, J., Vojtek, L., Poiani, S. B., Danihlík, J., Havlík, J., Titěra, D., & Hyršl, P. (2019). The Year of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) with Respect to Its Physiology and Immunity: A Search for Biochemical Markers of Longevity. *Insects*, 10(8), 244. <https://doi.org/10.3390/insects10080244>
- Lee, K. M., Lee, K. Y., Choi, H. W., Cho, M. Y., Kwon, T. H., Kawabata, S. -ichiro, & Lee, B. L. (2000). Activated phenoloxidase from *Tenebrio molitor* larvae enhances the synthesis of melanin by using a vitellogenin-like protein in the presence of dopamine. *European Journal of Biochemistry*, 267(12), 3695-3703. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01402.x>
- Lehane, M. J. (1997). Peritrophic Matrix Structure and Function. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 525-550. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.525>
- Levine, B., & Deretic, V. (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 7(10), 767-777. <https://doi.org/10.1038/nri2161>
- Licastro, F., Candore, G., Lio, D., Porcellini, E., Colonna-Romano, G., Franceschi, C., & Caruso, C. (2005). Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immunity & Ageing*, 2(1), 8. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-2-8>
- Lin, H., & Winston, M. L. (1998). The role of nutrition and temperature in the ovarian development of the worker honey bee (*Apis mellifera*). *The Canadian Entomologist*, 130(6), 883-891. <https://doi.org/10.4039/Ent130883-6>
- Little, T. J., O'Connor, B., Colegrave, N., Watt, K., & Read, A. F. (2003). Maternal Transfer of Strain-Specific Immunity in an Invertebrate. *Current Biology*, 13(6), 489-492. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(03\)00163-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(03)00163-5)

- 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>
- Li, Z., Zhang, S., Liu, Q., & May, R. C. (2008). Vitellogenin Functions as a Multivalent Pattern Recognition Receptor with an Opsonic Activity. *PLoS ONE*, 3(4), e1940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001940>
- Li, Z., Zhang, S., Zhang, J., Liu, M., & Liu, Z. (2009). Vitellogenin is a cidal factor capable of killing bacteria via interaction with lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Molecular Immunology*, 46(16), 3232-3239. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.08.006>
- Lycett, G. J., McLaughlin, L. A., Ranson, H., Hemingway, J., Kafatos, F. C., Loukeris, T. G., & Paine, M. J. I. (2006). Anopheles gambiae P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. *Insect Molecular Biology*, 15(3), 321-327. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00647.x>
- Marco Antonio, D. S., Guidugli-Lazzarini, K. R., do Nascimento, A. M., Simões, Z. L. P., & Hartfelder, K. (2008). RNAi-mediated silencing of vitellogenin gene function turns honeybee (*Apis mellifera*) workers into extremely precocious foragers. *Naturwissenschaften*, 95(10), 953-961. <https://doi.org/10.1007/s00114-008-0413-9>
- Marmaras, V. J., & Lampropoulou, M. (2009). Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cellular Signalling*, 21(2), 186-195. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.08.014>
- Martinson, V. G., Moy, J., & Moran, N. A. (2012). Establishment of Characteristic Gut Bacteria during Development of the Honeybee Worker. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2830-2840. <https://doi.org/10.1128/AEM.07810-11>
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2004). Inflammation and the Degenerative Diseases of Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1035(1), 104-116. <https://doi.org/10.1196/annals.1332.007>
- McKay, G. J., Silvestri, G., Chakravarthy, U., Dasari, S., Fritsche, L. G., Weber, B. H., Keilhauer, C. N., Klein, M. L., Francis, P. J., Klaver, *et al.* (2011). Variations in Apolipoprotein E Frequency With Age in a Pooled Analysis of a Large Group of Older People. *American Journal of Epidemiology*, 173(12), 1357-1364. <https://doi.org/10.1093/aje/kwr015>
- Mocchegiani, E., Muzzioli, M., & Giacconi, R. (2000). Zinc and immunoresistance to infection in aging: new biological tools. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(6), 205-208. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01476-0](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01476-0)
- Moffett, J. O., Morton, H. L., & MacDonald, R. H. (1972). Toxicity of Some Herbicidal Sprays to Honey Bees. *Journal of Economic Entomology*, 65(1), 32-36. <https://doi.org/10.1093/jee/65.1.32>
- Morandín, C., Havukainen, H., Kulmuni, J., Dhaygude, K., Trontti, K., & Helanterä, H. (2014). Not Only for Egg Yolk—Functional and Evolutionary Insights from Expression, Selection, and Structural Analyses of Formica Ant Vitellogenins. *Molecular Biology and Evolution*, 31(8), 2181-2193. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu171>
- Moret, Y. (2006). ‘Trans-generational immune priming’: specific enhancement of the antimicrobial immune response in the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1592), 1399-1405. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3465>
- Morishima, I., Yamano, Y., Inoue, K., & Matsuo, N. (1997). Eicosanoids mediate induction of immune genes in the fat body of the silkworm, *Bombyx mori*. *FEBS Letters*, 419(1), 83-86. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01418-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01418-X)
- Morton, H. L., Moffett, J. O., & Macdonald, R. H. (1972). Toxicity of Herbicides to Newly Emerged Honey Bees. 1, 2, 3. *Environmental Entomology*, 1(1), 102-104. <https://doi.org/10.1093/ee/1.1.102>
- Münch, D., & Amdam, G. V. (2010). The curious case of aging plasticity in honey bees. *FEBS Letters*, 584(12), 2496-2503. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.007>
- 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>

- Nakajima, Y., van der Goes van Naters-Yasui, A., Taylor, D., & Yamakawa, M. (2002). Antibacterial peptide defensin is involved in midgut immunity of the soft tick, *Ornithodoros moubata*. *Insect Molecular Biology*, *11*(6), 611-618. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00372.x>
- 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), 673-677. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062>
- NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (31. 3. 2023). NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (31. 3. 2023).
- Okamoto, I., Taniguchi, Y., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., & Kurimoto, M. (2003). Major royal jelly protein 3 modulates immune responses in vitro and in vivo. *Life Sciences*, *73*(16), 2029-2045. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00562-9](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00562-9)
- Oldroyd, B. P., & Osborne, K. E. (1999). The evolution of worker sterility in honeybees: the genetic basis of failure of worker policing. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *266*(1426), 1335-1339. <https://doi.org/10.1098/rspb.1999.0784>
- Otto, C. R. V., Roth, C. L., Carlson, B. L., & Smart, M. D. (2016). Land-use change reduces habitat suitability for supporting managed honey bee colonies in the Northern Great Plains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(37), 10430-10435. <https://doi.org/10.1073/pnas.1603481113>
- Otto, C. R. V., Zheng, H., Gallant, A. L., Iovanna, R., Carlson, B. L., Smart, M. D., & Hyberg, S. (2018). Past role and future outlook of the Conservation Reserve Program for supporting honey bees in the Great Plains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(29), 7629-7634. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800057115>
- Page, R. E., & Erickson, E. H. (1988). Reproduction by worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *23*(2), 117-126. <https://doi.org/10.1007/BF00299895>
- Page, R. E., Fondrk, M. K., Hunt, G. J., Guzmán-Novoa, E., Humphries, M. A., Nguyen, K., & Greene, A. S. (2000). Genetic dissection of honeybee (*Apis mellifera* L.) foraging behavior. *Journal of Heredity*, *91*(6), 474-479. <https://doi.org/10.1093/jhered/91.6.474>
- Pankiw, T., & Page Jr, R. E. (2000). Response thresholds to sucrose predict foraging division of labor in honeybees. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *47*(4), 265-267. <https://doi.org/10.1007/s002650050664>
- Pankiw, T., & Page, R. E. (2003). Effect of pheromones, hormones, and handling on sucrose response thresholds of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Comparative Physiology A*, *189*(9), 675-684. <https://doi.org/10.1007/s00359-003-0442-y>
- 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>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), 45e-45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pinto, L. Z., Bitondi, M. M. G., & Simões, Z. L. P. (2000). Inhibition of vitellogenin synthesis in *Apis mellifera* workers by a juvenile hormone analogue, pyriproxyfen. *Journal of Insect Physiology*, *46*(2), 153-160. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(99\)00111-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(99)00111-0)
- Piulachs, M. D., Guidugli, K. R., Barchuk, A. R., Cruz, J., Simões, Z. L. P., & Bellés, X. (2003). The vitellogenin of the honey bee, *Apis mellifera*: structural analysis of the cDNA and expression studies. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *33*(4), 459-465. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00021-3)
- 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>
- Randolt, K., Gimple, O., Geissendörfer, J., Reinders, J., Prusko, C., Mueller, M. J., Albert, S., Tautz, J., & Beier, H. (2008). Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honey bee worker larvae and adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *69*(4), 155-167. <https://doi.org/10.1002/arch.20269>
- Rembold, H., & Dietz, A. (1966). Biologically Active Substances in Royal Jelly. In *Vitamins & Hormones* (pp. 359-382). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)60385-4](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)60385-4)

- Ricigliano, V. A., Ihle, K. E., & Williams, S. T. (2021). Nutrigenetic comparison of two Varroa-resistant honey bee stocks fed pollen and spirulina microalgae. *Apidologie*, *52*(4), 873-886. <https://doi.org/10.1007/s13592-021-00877-3>
- Ricigliano, V. A., Mott, B. M., Maes, P. W., Floyd, A. S., Fitz, W., Copeland, D. C., Meikle, W. G., & Anderson, K. E. (2019). Honey bee colony performance and health are enhanced by apiary proximity to US Conservation Reserve Program (CRP) lands. *Scientific Reports*, *9*(1), 4894. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41281-3>
- Ricigliano, V. A., Mott, B. M., Floyd, A. S., Copeland, D. C., Carroll, M. J., & Anderson, K. E. (2018). Honey bees overwintering in a southern climate: longitudinal effects of nutrition and queen age on colony-level molecular physiology and performance. *Scientific Reports*, *8*(1), 10475. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28732-z>
- Roberts, S. P., & Elekonich, M. M. (2005). Muscle biochemistry and the ontogeny of flight capacity during behavioral development in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, *208*(22), 4193-4198. <https://doi.org/10.1242/jeb.01862>
- Robinson, G. E., & Huang, Z. -Y. (1998). Colony integration in honey bees: genetic, endocrine and social control of division of labor. *Apidologie*, *29*(1-2), 159-170. <https://doi.org/10.1051/apido:19980109>
- Robinson, G. E., Page, R. E., & Fondrk, M. K. (1990). Intracolony behavioral variation in worker oviposition, oophagy, and larval care in queenless honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *26*(5), 315-323. <https://doi.org/10.1007/BF00171096>
- Roma, G. C., Bueno, O. C., & Camargo-Mathias, M. I. (2010). Morpho-physiological analysis of the insect fat body: A review. *Micron*, *41*(5), 395-401. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2009.12.007>
- Romanelli, A., Moggio, L., Montella, R. C., Campiglia, P., Iannaccone, M., Capuano, F., Pedone, C., & Capparelli, R. (2011). Peptides from Royal Jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins. *Journal of Peptide Science*, *17*(5), 348-352. <https://doi.org/10.1002/psc.1316>
- Ronai, I., Oldroyd, B. P., & Vergoz, V. (2016b). Queen pheromone regulates programmed cell death in the honey bee worker ovary. *Insect Molecular Biology*, *25*(5), 646-652. <https://doi.org/10.1111/imb.12250>
- Ronai, I., Vergoz, V., & Oldroyd, B. P. (2016a). The Mechanistic, Genetic, and Evolutionary Basis of Worker Sterility in the Social Hymenoptera. In *Advances in the Study of Behavior* (48 ed., pp. 251-317). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.asb.2016.03.002>
- 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>
- Roth, O., Sadd, B. M., Schmid-Hempel, P., & Kurtz, J. (2009). Strain-specific priming of resistance in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *276*(1654), 145-151. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1157>
- Sadd, B. M., Kleinlogel, Y., Schmid-Hempel, R., & Schmid-Hempel, P. (2005). Trans-generational immune priming in a social insect. *Biology Letters*, *1*(4), 386-388. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0369>
- Sadd, B. M., & Schmid-Hempel, P. (2006). Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. *Current Biology*, *16*(12), 1206-1210. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.047>
- Salmela, H., Amdam, G. V., Freitag, D., & Schneider, D. S. (2015). Transfer of Immunity from Mother to Offspring Is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin. *PLOS Pathogens*, *11*(7), e1005015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005015>
- Salmela, H., Harwood, G. P., Münch, D., Elsik, C. G., Herrero-Galán, E., Vartiainen, M. K., & Amdam, G. V. (2022). Nuclear translocation of vitellogenin in the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*, *53*(1), 13. <https://doi.org/10.1007/s13592-022-00914-9>
- Salmela, H., Stark, T., Stucki, D., Fuchs, S., Freitag, D., Dey, A., Kent, C. F., Zayed, A., Dhaygude, K., Hokkanen, H., & Sundström, L. (2016). Ancient Duplications Have Led to Functional Divergence of Vitellogenin-Like Genes Potentially Involved in Inflammation and Oxidative

- Stress in Honey Bees. *Genome Biology and Evolution*, 8(3), 495-506. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw014>
- Salmela, H., & Sundström, L. (2017). Vitellogenin in inflammation and immunity in social insects. *Inflammation and Cell Signaling*, 4, e1506. <https://doi.org/10.14800/ics.1506>
- Sánchez-Bayo, F., Goulson, D., Pennacchio, F., Nazzi, F., Goka, K., & Desneux, N. (2016). Are bee diseases linked to pesticides? — A brief review. *Environment International*, 89-90, 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.01.009>
- Seehuus, S. -C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T., & Amdam, G. V. (2006). Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(4), 962-967. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502681103>
- 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>
- Seong, S. -Y., & Matzinger, P. (2004). Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 4(6), 469-478. <https://doi.org/10.1038/nri1372>
- Shi, X., Zhang, S., & Pang, Q. (2006). Vitellogenin is a novel player in defense reactions. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(5), 769-772. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.09.005>
- Schippers, M. -P., Dukas, R., Smith, R. W., Wang, J., Smolen, K., & McClelland, G. B. (2006). Lifetime performance in foraging honeybees: behaviour and physiology. *Journal of Experimental Biology*, 209(19), 3828-3836. <https://doi.org/10.1242/jeb.02450>
- Smart, M., Pettis, J., Rice, N., Browning, Z., Spivak, M., & Guedes, R. N. C. (2016). Linking Measures of Colony and Individual Honey Bee Health to Survival among Apiaries Exposed to Varying Agricultural Land Use. *PLOS ONE*, 11(3), e0152685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152685>
- Smedal, B., Brynem, M., Kreibich, C. D., & Amdam, G. V. (2009). Brood pheromone suppresses physiology of extreme longevity in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Experimental Biology*, 212(23), 3795-3801. <https://doi.org/10.1242/jeb.035063>
- Strand, M. R. (2008). The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15(1), 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>
- Strand, M. R. (2008). The insect cellular immune response. *Insect Science*, 15(1), 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>
- Sugiyama, T., Takahashi, K., & Mori, H. (2012). Royal Jelly Acid, 10-Hydroxy-trans-2-Decenoic Acid, as a Modulator of the Innate Immune Responses. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets*, 12(4), 368-376. <https://doi.org/10.2174/187153012803832530>
- Tarek, H., Hamiduzzaman, M. M., Morfin, N., & Guzman-Novoa, E. (2018). Sub-lethal doses of neonicotinoid and carbamate insecticides reduce the lifespan and alter the expression of immune health and detoxification related genes of honey bees (*Apis mellifera*). *Genetics and Molecular Research*, 17(2), gmr16039908. <https://doi.org/10.4238/gmr16039908>
- Tarpy, D. R., & Nielsen, D. I. (2002). Sampling Error, Effective Paternity, and Estimating the Genetic Structure of Honey Bee Colonies (Hymenoptera: Apidae). *Annals of the Entomological Society of America*, 95(4), 513-528. [https://doi.org/10.1603/0013-8746\(2002\)095\[0513:SEEPAE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1603/0013-8746(2002)095[0513:SEEPAE]2.0.CO;2)
- Tidbury, H. J., Pedersen, A. B., & Boots, M. (2011). Within and transgenerational immune priming in an insect to a DNA virus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 278(1707), 871-876. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1517>
- Tong, Z., Li, L., Pawar, R., & Zhang, S. (2010). Vitellogenin is an acute phase protein with bacterial-binding and inhibiting activities. *Immunobiology*, 215(11), 898-902. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2009.10.001>
- Trenczek, T., Zillikens, A., & Engels, W. (1989). Developmental patterns of vitellogenin haemolymph titre and rate of synthesis in adult drone honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, 35(6), 475-481. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(89\)90054-1](https://doi.org/10.1016/0022-1910(89)90054-1)

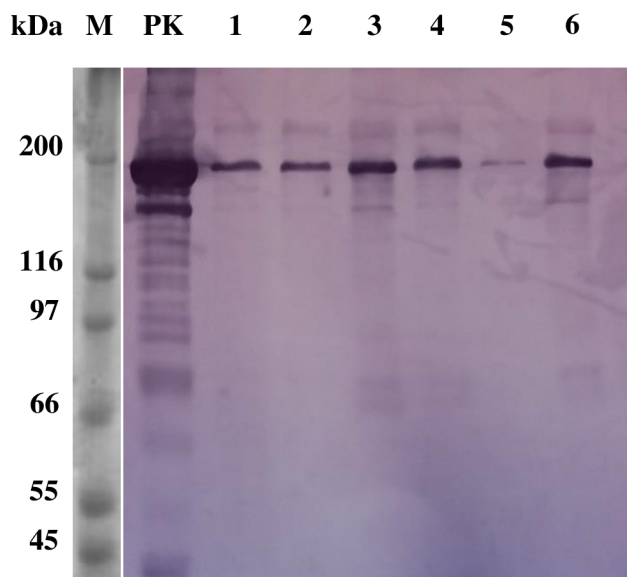
- Tufail, M., & Takeda, M. (2008). Molecular characteristics of insect vitellogenins. *Journal of Insect Physiology*, 54(12), 1447-1458. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.08.007>
- Visscher, P. K. (1989). A quantitative study of worker reproduction in honey bee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 25(4), 247-254. <https://doi.org/10.1007/BF00300050>
- Vucevic, D., Melliou, E., Vasilijic, S., Gasic, S., Ivanovski, P., Chinou, I., & Colic, M. (2007). Fatty acids isolated from royal jelly modulate dendritic cell-mediated immune response in vitro. *International Immunopharmacology*, 7(9), 1211-1220. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.05.005>
- Wang, H., Zhang, S. -W., Zeng, Z. -J., & Yan, W. -Y. (2014). Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie*, 45(5), 618-625. <https://doi.org/10.1007/s13592-014-0276-3>
- Wang, Y., Brent, C. S., Fennern, E., Amdam, G. V., & Rulifson, E. (2012). Gustatory Perception and Fat Body Energy Metabolism Are Jointly Affected by Vitellogenin and Juvenile Hormone in Honey Bees. *PLoS Genetics*, 8(6), e1002779. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002779>
- Weaver, N. (1966). Physiology of Caste Determination. *Annual Review of Entomology*, 11(1), 79-102. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.11.010166.000455>
- 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>
- Winston, M. L. (1987). *The biology of the honey bee*. Cambridge: Harvard University Press.
- Yang, W., Tian, Y., Han, M., & Miao, X. (2017). Longevity extension of worker honey bees (*Apis mellifera*) by royal jelly: optimal dose and active ingredient. *PeerJ*, 5. <https://doi.org/10.7717/peerj.3118>
- Zhang, S., Wang, S., Li, H., & Li, L. (2011). Vitellogenin, a multivalent sensor and an antimicrobial effector. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43(3), 303-305. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.11.003>
- Zhang, W., 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), 104643. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104643>
- Zor, T., & Selinger, Z. (1996). Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. *Analytical Biochemistry*, 236(2), 302-308. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0171>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

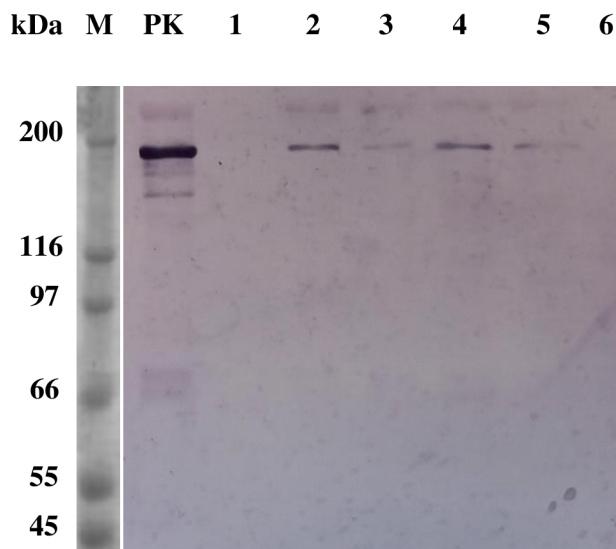
AA/BIS	akrylamid/N,N'-mehylenbisakrylamid
APS	peroxidisíran amonný
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
BSA	hovězí sérový albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
cDNA	komplementární DNA
Ct	cyklus prahu
CRP	„Conservation Reserve Program“
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dsRNA	dvouřetězcová RNA
DTT	dithiotreitol
EC	numerické klasifikační schéma pro enzymy
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
F	„forward“
FITC	fluorescein isothiokyanát
GFP	„green fluorescent protein“, zelený fluorescenční protein
GITC	guanidium thioisokyanát
HKG	provozní („housekeeping“) gen
hROS	vysoce reaktivní formy kyslíku
LPS	lipopolysacharidy
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
mRNA	mediátorová RNA
NBT	nitrotetrazoliová modř
PAMP	molekulární vzorce asociované s patogeny
PBS	fosfátem pufovaný solný roztok
PCR	polymerázová řetězová reakce
PQ	paraquat
QMP	mandibulární feromon matky
qPCR	kvantitativní PCR
R	„reverse“

RNA	ribonukleová kyselina
RNAi	RNA interference
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	solný roztok pufovaný Tris
TBS-T	roztok Tweenu v TBS
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin
usp	„ultraspiracle“, předpokládaný receptor juvenilního hormonu
Vg	vitellogenin
VgR	receptor vitellogeninu

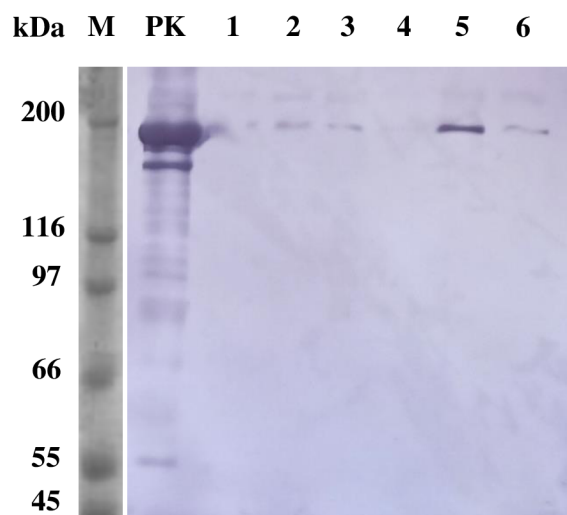
9 PŘÍLOHY



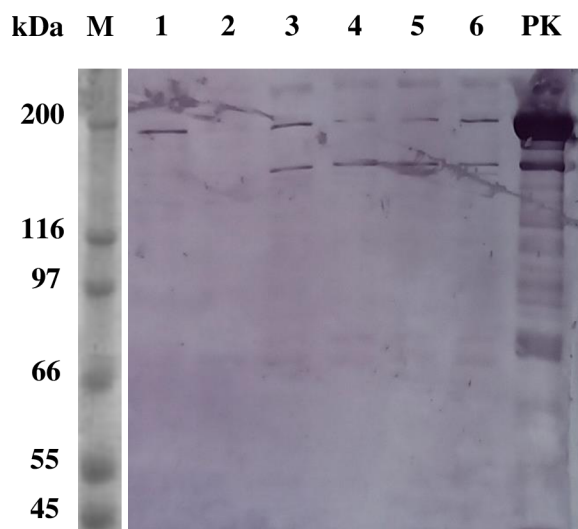
Obr. 44: Pásky proteinů po provedení metody Western blot ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic krmených 50 % sacharosou (1) a 15 (2), 30 (3) a 60 (4) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose podávané po dobu 24 hod, dále 50% sacharosou (5) a 15 (6) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose podávané po dobu 48 hod. PK: Pozitivní kontrola - včely krmeny 50% sacharosovým roztokem s *P. larvae* kmen CCM 4483 (2.4×10^4 CFU). M: Marker molekulových hmotností v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímky membrány pořízeny mobilním telefonem.



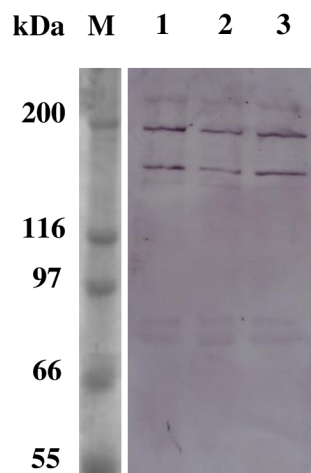
Obr. 45: Pásky proteinů po provedení metody Western blot ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic krmených 30 (1) a 60 (2) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose podávané po dobu 48 hod, dále 2-3 dny starých letních dělnic krmených 50% sacharosou (3), 15 (4), 30 (5) a 60 (6) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose podávané po dobu 24 hod. PK: Pozitivní kontrola - včely krmeny 50% sacharosovým roztokem s *P. larvae* kmen CCM 4483 (2.4×10^4 CFU). M: Marker molekulových hmotností v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímky membrány pořízeny mobilním telefonem.



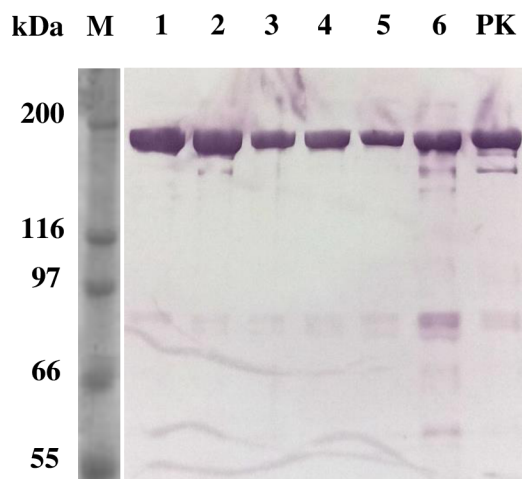
Obr. 46: Pásky proteinů po provedení metody Western blot ve vzorcích hemolymfy 2-3 dny starých letních dělnic krmených 50% sacharosou (1), 15 (2), 30 (3) a 60 (4) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose podávané po dobu 48 hod, dále 4-5 dnů starých letních dělnic krmených 50% sacharosou (5) (výsledky nepoužity), 30 (6) $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose podávané po dobu 24 hod. PK: Pozitivní kontrola - včely krmeny 50% sacharosovým roztokem s *P. larvae* kmen CCM 4483 (2.4×10^4 CFU). M: Marker molekulových hmotností v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímky membrány pořízeny mobilním telefonem.



Obr. 47: Pásky proteinů po provedení metody Western blot ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic krmených 50% sacharosou (1), 25 (2), 50 (3) $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose podávané po dobu 2 hod, dále krmených 50% sacharosou (4), 25 (5) a 50 (6) $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose podávané po dobu 4 hod. PK: Pozitivní kontrola - včely krmeny 50% sacharosovým roztokem s *P. larvae* kmen CCM 4483 (2.4×10^4 CFU). M: Marker molekulových hmotností v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímky membrány pořízeny mobilním telefonem.



Obr. 48: Pásky proteinů po provedení metody Western blot ve vzorcích hemolymfy 1-2 dny starých letních dělnic krmených 50% sacharosou (1), 25 (2), 50 (3) $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose podávané po dobu 8 hod. PK: Pozitivní kontrola - včely krmeny 50% sacharosovým roztokem s *P. larvae* kmen CCM 4483 (2.4×10^4 CFU). M: Marker molekulových hmotností v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímky membrány pořízeny mobilním telefonem.



Obr. 49: Pásky proteinů po provedení metody Western blot ve vzorcích hemolymfy matek krmených 50% sacharosou (1), $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose (2) a $50 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose (3) podávané po dobu 24 hod. a ve vzorcích hemolymfy zimních dělnic krmených 50% sacharosou (4), $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ LPS v 50% sacharose (5) a $50 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ PQ v 50% sacharose (6) podávané po dobu 24 hod. PK: Pozitivní kontrola - včely krmeny 50% sacharosovým roztokem s *P. larvae* kmen CCM 4483 (2.4×10^4 CFU). M: Marker molekulových hmotností v SDS-PAGE gelu po barvení CBB. Snímky gelu pořízeny pomocí Gel Doc EZ Imager. Snímky membrány pořízeny mobilním telefonem.