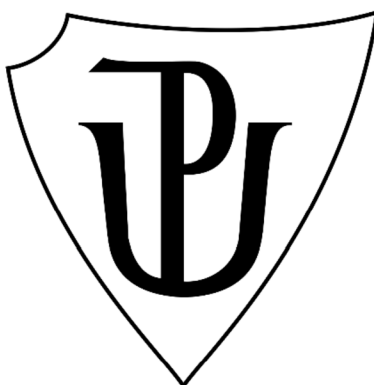


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Studium proteinového profilu hemolymfy včely
medonosné (*Apis mellifera*)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Anna Marie Tvarůžková**
Studijní program: B0512A130008 Biochemie
Studijní obor: Biochemie
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Mgr. Silvie Dostálková, Ph.D.**
Rok: 2024

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

V Olomouci dne 6. 5. 2024

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat moji vedoucí bakalářské práce Mgr. Silvii Dostálkové, Ph.D., za ochotu, trpělivost, cenné připomínky a odborné vedení při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych chtěla velmi poděkovat panu profesorovi Mgr. Markovi Šebelovi, Dr., za ochotu a provedení analýzy MALDI-TOF. Zároveň bych chtěla poděkovat veškerým zaměstnancům Katedry biochemie za ochotu při vypracovávání experimentální části práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Anna Marie Tvarůžková
Název práce	Proteinový profil včely medonosné <i>Apis mellifera</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Silvie Dostálková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	<p>Tato bakalářská práce se zabývá studiem proteinového profilu hemolymfy včely medonosné (<i>Apis Mellifera</i>), konkrétně kvalitativní i kvantitativní analýzou hemolymfy včel starých 0–12 dní. Proteiny v hemolymfě zajišťují mnoho funkcí pro organismus, jejich koncentrace se v hemolymfě včel se liší na základě stáří, kasty, ročním období, stresových a dalších faktorů. Teoretická část práce představuje ucelenou literární rešerši o hemolymfě hmyzu se zaměřením na čtyři hlavní včelí proteiny hemolymfy, kterými jsou: Hexamerin, Vitellogenin, Apolipophoriny a Transferin. Teoretická část se zaměřuje na strukturu, funkce a zastoupení těchto proteinů. V experimentální části byla stanovena koncentrace celkových proteinů v hemolymfě včely medonosné, dále byla provedena separace proteinů pomocí SDS-PAGE elektroforézy, jak na gelu připravovaném v laboratoři, tak na komerčním gradientovém gelu. K nejlepší separaci proteinů došlo právě na komerčním gradientovém gelu, který byl následně podroben analýze MALDI-TOF. V hemolymfě včely medonosné byly prokázány všechny hlavní včelí proteiny společně s ostatními proteiny. Celkem bylo pomocí metody SDS-PAGE stanoveno 15 proteinů a na MALDI-TOF bylo identifikováno 20 proteinů. Pomocí softwaru Image J</p>

bylo stanoveno relativní zastoupení proteinů v jednotlivých vzorcích a změny v jejich zastoupení v souvislosti se stářím včel.

Klíčová slova

včela medonosná, hemolymfa, proteiny, Hexamerin, Vitellogenin, Apolipophoriny, Transferin

Počet stran

56

Počet příloh

0

Jazyk

Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Anna Marie Tvarůžková
Title	Analysis of the protein profile of honey bee (<i>Apis mellifera</i>) hemolymph
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Silvie Dostálková, Ph.D.
The year of presentation	2024
Abstract	<p>This bachelor thesis investigates protein profile of the hemolymph in the honeybee (<i>Apis mellifera</i>), specifically qualitative and quantitative analyses of hemolymph of bees aged 0–12 days. The proteins in the hemolymph perform numerous functions in the organism, and their concentrations vary based on factors such as age, caste, season, and stress. The theoretical part of the thesis presents a comprehensive literature review on insect hemolymph, specifically focusing on four major bee hemolymph proteins: Hexamerin, Vitellogenin, Apolipophorins, and Transferin. It discusses the structure, functions, and prevalence of these proteins. In the experimental part of the work, the concentration of total proteins in the honeybee hemolymph was estimated. Protein separation was then conducted by using SDS-PAGE electrophoresis, both on a gel prepared in the laboratory and on a commercial gradient gel. The best protein separation was achieved on the commercial gradient gel, which was subsequently analyzed by MALDI-TOF analysis. All major bee proteins, along with other proteins, were detected in the hemolymph. 15 proteins were detected by</p>

SDS-PAGE and 20 proteins were identified by MALDI-TOF. The quantity of proteins in each sample and relative abundance of proteins in bees of different age were determined by using Image J software.

Keywords	honeybee, hemolymph, proteins, Hexamerin, Vitellogenin, Apolipophorins, Transferrin
Number of pages	56
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1. Hemolymfa hmyzu	2
2.1.1. Funkce hemolymfy	2
2.1.2. Hemocyty	2
2.1.2.1. Prohemocyty	3
2.1.2.2. Plazmocyty	4
2.1.2.3. Granulocyty	4
2.1.2.4. Koagulocyty	4
2.1.2.5. Sferulocyty	4
2.1.2.6. Adipohemocyty	5
2.1.2.7. Oenocyty	5
2.1.3. Sacharidy v hemolymfě hmyzu	5
2.1.4. Proteiny hemolymfy hmyzu	6
2.1.4.1. Zásobní proteiny	6
2.1.4.2. Lipophoriny	7
2.1.4.3. Vitellogeniny	7
2.2. Proteiny hemolymfy včely medonosné	8
2.2.1. Hexameriny	9
2.2.2. Vitellogenin	11
2.2.3. Lipophorinový systém a Apolipophoriny včel	14
2.2.4. Transferin	16
2.2.5. Ostatní proteiny	17
2.3. Proteinové zastoupení napříč vývojovými stádii včely medonosné	19
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
3.1. Materiál	22
3.1.1. Chemikálie	22
3.1.2. Roztoky	22
3.1.3. Biologický materiál	23
3.1.4. Přístroje a pomůcky	24
3.2. Metody	25
3.2.1. Stanovení koncentrace proteinů v hemolymfě Bradfordovou metodou	25

3.2.2.	Zastoupení proteinů v hemolymfě včely medonosné	26
3.2.3.	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)	26
3.2.3.1.	Příprava vzorků	26
3.2.3.2.	Postup přípravy gelů a průběh elektroforézy	26
3.2.4.	Software Image J	28
4.	VÝSLEDKY A DISKUSE	30
4.1.	Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou	30
4.2.	Zastoupení proteinů v hemolymfě včely medonosné.....	33
4.3.	Separace proteinů v hemolymfě včely medonosné metodou SDS-PAGE	34
4.4.	Separace proteinů v hemolymfě včely medonosné na komerčním gradientovém gelu....	36
4.5.	Analýza bandů pomocí softwaru Image J a MALDI analýza	39
5.	ZÁVĚR.....	46
6.	LITERATURA	48
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	56

CÍLE PRÁCE

Cíle práce jsou v teoretické části zaměřeny na vypracování literární rešerše o hemolymfě hmyzu, jejím složení se zaměřením na proteiny. Dále také na proteiny vyskytující se u včely medonosné a jejich zastoupení v hemolymfě a jiných tkáních. V experimentální části práce bylo cílem provést analýzu proteinového profilu hemolymfy včely medonosné u dělnic různého stáří pomocí metody SDS-PAGE.

1. ÚVOD

Včela medonosná (*Apis mellifera*) se řadí mezi eusociální hmyz, což je společenské uspořádání, kde pozorujeme tzv. kasty. U včely medonosné jsou to dělnice (sterilní samice), trubci (samci) a matka (plodná samice). Každá kasta má ve včelstvu jiné funkce, tím pádem má i rozdílné energetické a metabolické nároky a liší se v náchylnosti k patogenům (Chan et al., 2006). V mírném pásmu na Zemi se mohou vyvinout dělnice jako krátkověké letní včely s délkou života 4-6 týdnů nebo dlouhověké zimní včely s délkou života 22-24 týdnů. U letních dělnic dochází k rychlému stárnutí na rozdíl od zimních včel, kde je stárnutí téměř zanedbatelné (Münch et al., 2008).

Hemolymfa je tekutina cirkulující v těle hmyzu. Skládá se z tekuté plazmy a suspendovaných buněk – hemocytů (Chapman et al., 2013). Funkcí hemolymfy, je především: transport, zásoba, mechanická opora a obrana (Nation, 2016). Hemolymfa obsahuje anorganické i organické látky včetně proteinů. Právě koncentrace proteinů se v hemolymfě včel liší na základě stáří, kasty, ročním období, stresových a dalších faktorů.

Mezi nejvíce zastoupené proteiny v hemolymfě včely medonosné patří: Hexameriny, Vitellogenin, Apolipophoriny a Transferin.

Pouze několik chorob včelstva lze diagnostikovat přímo, z toho důvodu se vyšetření a hodnocení včelstev běžně spojuje s laboratorní analýzou. V současné době ale chybí metody pro přesné hodnocení zdravotního stavu zdravotního stavu a výživy pomocí biomarkerů. Právě v humánní medicíně jsou sérové proteiny považovány za užitečné biomarkery pro hodnocení zdravotního a nutričního stavu organismu. Proteom hemolymfy včely medonosné by mohl sloužit jako zdroj biomarkerů. Jejich zastoupení a hladiny mohou dále odrážet zdravotní stav organismu včely medonosné.

Nejprve je třeba ale popsat stav hemolymfy normální včely medonosné, čímž se zabývá právě tato studie. Teoretická část bakalářské práce představuje ucelený přehled aktuálních informací o jednotlivých proteinech v hemolymfě včely medonosné se zaměřením na jejich strukturu, funkci a zastoupení. Hlavním cílem praktické části je analyzovat druhy proteinů, vyskytující se v hemolymfě a jejich kvantitativní zastoupení měnící se v určitém stáří včely.

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1. Hemolymfa hmyzu

S hemolymfou se setkáváme u veškerého hmyzu. Je to cirkulující tělní tekutina, která je analogem lidské krve. Hemolymfa u hmyzu koluje v otevřené cévní soustavě. Cirkuluje v dutině zvané hemocél a omývá všechny hmyzí orgány. Skládá se z tekuté plazmy, ve které jsou suspendovány buňky – hemocyty (Chapman et al., 2013). Od krve obratlovců se hemolymfa hmyzu liší dvěma hlavními znaky: absencí erytrocytů a vysokou koncentrací volných aminokyselin (20 až 30krát vyšší než u obratlovců) (Kodrík, 2000; Resh & Cardé, 2009).

2.1.1. Funkce hemolymfy

Cirkulace hemolymfy tělem hmyzu zajišťuje mnoho funkcí. Je jich celá řada a mezi nejvýznamnější patří: transportní funkce (přenos živin do buněk a tkání a odvádění odpadních produktů do exkrementních orgánů); zásobní funkce (rezervoár tekutin a živin); mechanická funkce (zachovávání tvaru těla a zajištění tlaku při líhnutí a svlékání); obranná funkce (ochrana před napadením bakteriemi, vajíčky parazitů a cizorodými látkami, zároveň zajišťuje vznik melaninové zátky, která ucpává vzniklou ránu) (Nation, 2016).

Velké množství funkcí zajišťuje hemolymfa díky rozličným skupinám chemických složek. Udržení fyziologické hodnoty pH zprostředkovávají sloučeniny jako hydrogenuhličitany, anorganické fosforečnany, karboxylové a aminoskupiny na aminokyselinách. Osmotický tlak hemolymfy regulují naopak anorganické ionty (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Cl^-) a malé organické molekuly (Chapman et al., 2013).

2.1.2. Hemocyty

Hemocyty jsou imunitní buňky hemolymfy, které zprostředkovávají buněčnou část imunitní odpovědi hmyzu, zejména fagocytózu, enkapsulaci a nodulaci. Dosud nebyly popsány všechny typy hemocytů, které se v říši hmyzu vyskytují, včetně jejich počtu u jednotlivých druhů. Je to dáno hlavně malou velikostí hmyzu a velkým počtem druhů hmyzu (Castillo et al., 2006). Klasifikace hmyzích hemocytů byla původně založena výhradně na morfologii buněk, pozorovaných pod světelným a elektronovým mikroskopem. Bylo rozpoznáno sedm základních typů hemocytů, které jsou nejběžnější: prohemocyty, plazmocyty, granulocyty, koagulocyty, sferulocyty, adipohemocyty

a oenocyty (Gupta, 2010). Většina hmyzu však všech sedm typů nemá. Například u mouchy a komára byly popsány pouze tři typy hemocytů. Navíc i u hmyzu s mnoha typy hemocytů se předpokládá, že pouze některé typy hrají hlavní roli v buněčné imunitě (Cho & Cho, 2019).

Dle (Rosales & Uribe-Querol, 2017) je fagocytóza základní imunitní proces, přičemž u jednobuněčných organismů je důležitým procesem pro výživu, zatímco u mnohobuněčných organismů spočívá v rozpoznání a pohlcení částic větších než 0,5 μm pomocí fagocytů. Částice jsou pohlcovány do vezikulu odvozeného od plazmatické membrány, známého jako fagosom. Fagocyty pohlcují mikrobiální patogeny, ale také apoptické buňky. Fagocytóza je tedy zásadní nejen pro likvidaci mikrobů, ale také pro homeostázu tkání.

Enkapsulace je charakterizována jako tvorba buněčných obalů, které svým uzavřením oddělí cizorodé částice od vnitřního prostředí. Uplatňuje se převážně u větších částic a parazitů, které nemohou být pohlceny fagocytózou. Enkapsulaci rozlišujeme na prostou a melatonickou. U prosté není tvorba kapsule doprovázena následnou melanizací, což je rozdílem oproti melatonické enkapsulaci, kdy je částice uvnitř kapsule nejen uzavřena, ale zároveň vystavena působením dalších složek (např. reaktivním metabolitům kyslíku nebo dusíku), zároveň nemá přístup k živinám (Hyršl, 2018).

Nodulace představuje zachycení invazivních mikroorganismů shlukováním hemocytů kolem nich. To vede k jejich uvěznění v buněčném prostředí a následnému odstranění. Tento proces spočívá v rozpoznání patogenu, čímž se aktivují granulocyty a ty patogen obklopí. Na vrstvu přiléhá další vrstva nyní plazmatocytů a dochází k formování nodule. V takto uzavřeném materiálu dojde k vyhladovění patogenu nebo k produkci reaktivních forem kyslíku (Satyavathi et al., 2014).

2.1.2.1. Prohemocyty

Prohemocyty jsou charakterizovány jako malé, kulaté nebo oválné hemocyty, u kterých je velké jádro, které vyplňuje téměř celou buňku a je zde tedy vysoký poměr jádro/cytoplazma. V cytoplazmě prohemocytů jsou roztroušeny částice drsného endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu (Khosravi et al., 2016).

Bylo objasněno, že více než 60 % prohemocytů se diferencuje v další hemocyty, některé se rozdělují na nové prohemocyty. Prohemocyty jsou tedy považovány za kmenové buňky, které dávají vznik dalším specifickým hemocytům (např. plasmatocyty, granulocyty) (Nation, 2016).

2.1.2.2. Plazmocyty

Tyto hemocyty jsou útvary různého tvaru a velikosti s velkým množstvím cytoplazmy kolem jádra. Plazmocyty a prohemocyty jsou si velice podobné a lze je rozlišit právě díky poměru jádro/cytoplazma. V cytoplazmě byly pozorovány mitochondrie, velké množství drsného endoplazmatického retikula, několik vezikul a vakuol (Khosravi et al., 2016).

Plazmocyty jsou pohyblivé buňky schopné fagocytózy. Nachází se tedy v první linii obrany proti patogenům, a jsou velmi důležitou celulární složkou imunitního systému. Vypouštějí substance, které způsobují degranulaci granulocytů při konečné fázi enkapsulace, a také mohou pomoci svých specifických granul přivést granulocyty do apoptózy (Gupta, 2010).

2.1.2.3. Granulocyty

Granulocyty jsou popsány jako středně velké, protáhlé hemocyty s jádrem ve středu buňky. Cytoplazma granulocytů obsahuje lysozomy, pouze pár mitochondrií a bohatou síť drsného endoplazmatického retikula (Berger & Slavičková, 2008).

Granulocyty jsou silně adhezivní, ulpívají tedy na cizorodých molekulách a patogenech, podílejí se na fagocytóze a enkapsulaci (Lundgren & Jurat-Fuentes, 2012).

2.1.2.4. Koagulocyty

Dalším typem hemocytů jsou koagulocyty (také nazvány jako hyalinní hemocyty), drobné, hyalinní a nestálé buňky, které obsahují jedno malé, excentricky uložené jádro (Gupta, 2010).

Koagulocyty při poranění nebo po odebrání vzorku hemolymfy ihned praskají a tím iniciují proces srážení. Ne všechny druhy hmyzu ale obsahují hemolymfu, která se sráží (například hemolymfa larev včely medonosné) (Nation, 2016).

2.1.2.5. Sferulocyty

Sferulocyty byly popsány jako ovoidní buňky, obvykle větší než prohemocyty. Jejich cytoplazma obsahuje četné inkluze, což způsobuje, že buňka nabývá nepravidelného tvaru. Sferulocyty se mohou diferenciovat z prohemocytů, zcela se ale liší od granulocytů a jsou to velmi málo zastoupené hemocyty ve srovnání s ostatními typy. Jejich funkce je zcela neznámá (Yamashita & Iwabuchi, 2001; Ribeiro & Brehélin, 2006).

2.1.2.6. Adipohemocyty

Adipohemocyty jsou hemocyty o různé velikosti s vejčítým tvarem a pozorovatelnými výběžky na obou koncích. Obsahují lipidové a granulární složky v cytoplazmě s přítomností drsného endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu (Gupta, 2010).

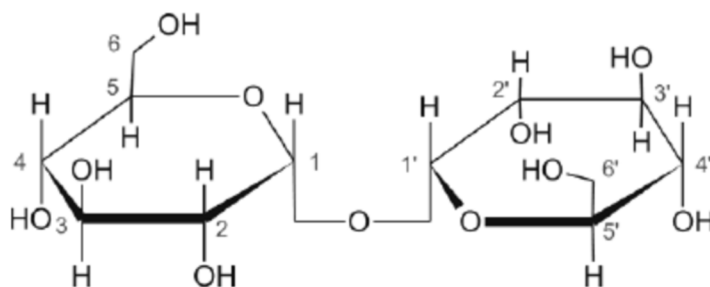
2.1.2.7. Oenocyty

Oenocyty jsou popisovány jako velké buňky s drobným jádrem a hustou cytoplazmou s několika inkluzemi. V cytoplazmě se kromě inkluzí nachází mitochondrie a hladké endoplazmatické retikulum (Khosravi et al., 2016).

Oenocyty byly původně popsány jako buňky produkující vosk, jelikož histologická barvení a organické extrakce naznačovaly, že obsahují voskové částice nebo jiné lipidy. Tyto buňky ale obsahují hladké endoplazmatické retikulum, které se podílí na syntéze lipidů, fosfolipidů, steroidů a metabolismu sacharidů. Kromě toho obsahují oenocyty peroxisomy, které se podílejí mimo jiné na metabolismu reaktivních volných radikálů. Jak hladké endoplazmatické retikulum, tak peroxisomy jsou přítomny v savčích hepatocytech, což naznačuje funkční podobnost mezi jaterními buňkami a oenocyty (Huang et al., 2022).

2.1.3. Sacharidy v hemolymfě hmyzu

Mezi nejvíce zastoupené sacharidy v hemolymfě patří: glukosa, sacharosa, fruktosa, galaktosa a ribosa (Resh & Cardé, 2009). Nejvýznamnějším sacharidem je ale trehalosa, což je neredukující disacharid, tvořený dvěma glukosovými jednotkami spojenými α, α -1,1-glykosidickou vazbou (Obr. 1). Trehalosa je u hmyzu přítomna jak v hemolymfě, tak v larvách či kuklách. U dospělého hmyzu hladina trehalosy rychle klesá během energeticky náročných činností, jako je let. To potvrzuje roli tohoto disacharidu jako zdroje glukosy (Elbein, 2003).



Obr. 1: Chemická struktura trehalosy. Dvě molekuly glukosy spojené α, α -1,1-glykosidickou vazbou (Tarpan et al., 2011).

2.1.4. Proteiny hemolymfy hmyzu

Volné aminokyseliny v hemolymfě slouží kromě udržování stálé hodnoty pH jako substrát pro syntézu proteinů, přičemž zastoupení a množství všech 20 proteinogenních aminokyselin se u různých skupin hmyzu a v závislosti na vývojovém stadiu značně liší. Zvláště zajímavou aminokyselinou je tyrosin, který je špatně rozpustný a v hemolymfě se vyskytuje ve formě rozpustnějšího glykosidu. Těsně před líhnutím hmyzu se volný ve velkém množství uvolňuje a podílí se na hnědnutí a melanizaci. Následně jeho množství prudce klesá (Chapman et al., 2013).

V hemolymfě hmyzu je zastoupeno velké množství proteinů s rozličnou funkcí, které se mění s věkem, stresem, pohlavím ročním období a na základě dalších faktorů (Nation, 2016).

Dle (Hyršl, 2006) lze proteiny v hemolymfě rozdělit do několika skupin – zásobní (hexameriny), lipophoriny, vitellogeniny. Další skupinu pak tvoří enzymy a proteiny s imunitní funkcí např. antimikrobiální peptidy. Tyto proteiny a jejich funkce jsou podrobně rozepsány v následujících kapitolách.

2.1.4.1. Zásobní proteiny

Zásobní proteiny jsou u hmyzu syntetizovány hlavně v tukovém tělísku (tkáň, která má analogii s játry obratlovců), vylučovány do hemolymfy během larválního vývoje a částečně zpětně absorbovány krátce před zakuklením. V tukovém tělísku kukly jsou tyto proteiny nejprve uloženy v proteinových zrnech, které jsou později proteolyticky rozštěpeny tak, aby poskytly aminokyseliny nezbytné pro dokončení vývoje dospělého (Haunerland, 1996; Takeda & Tufail, 2012).

Zásobní proteiny jsou velkou skupinou různých proteinů o molekulové hmotnosti zpravidla okolo 500 kDa (Kodrík, 2000). Nejhojnější skupinou jsou hexameriny, které patří do skupiny hexamerů, jelikož se skládají ze šesti podjednotek. Kromě hexamerinů nalezneme například u kovolesské cizokrajného (*Trichoplusiani*) proteiny vázající biliverdin, které se od hexamerinů liší zejména strukturou. Jedná se o tetramery s vysokým obsahem lipidů – až 10 % (Takeda & Tufail, 2012).

Zásobní proteiny plní v organismu řadu funkcí. Za prvé, jak už z názvu vyplývá, slouží jako zásobárna volných aminokyselin, na které se rozkládají. Ty jsou dále využívány k syntéze dalších proteinů, potřebných v dospělosti (Resh & Cardé, 2009). Dále se zásobní proteiny podílejí na transportu ligandů a také jsou zdrojem komponentů pro syntézu nové kutikuly hmyzu (Kodrík, 2000).

2.1.4.2. Lipophoriny

Termínem lipophorin označujeme hmyzí lipoprotein. Dříve byl doslova nazván „lipoprotein přenášející diacylglyceroly“. Studie o funkci lipophorinu ukazují, že skutečně hraje roli jako transportér širokého spektra látek (zejména lipidů) mezi orgány a funguje jako takzvaný kyvadlový přenašeč diacylglycerolů, cholesterolu a uhlovodíků (Chino & Downer, 1982).

Funkce kyvadlového přenašeče je hlavním rozdílem mezi fungováním hmyzích lipophorinů a analogických savčích lipoproteinů. Lipophoriny totiž na rozdíl od savčích lipoproteinů nevstupují přímo do buněk a diacylglyceroly si předávají pouze v hemolymfě (Kodrík, 2000). I přesto ale lipophoriny musejí v době, kdy molekulu diacylglyceroly přebírají z tukového tělesa nebo ji předávají do svalů, interagovat s buněčným povrchem, což je zajištěno pomocí lipophorinového receptoru jak v tukovém tělese, tak ve svalech. Díky těmto receptorům je zajištěno obousměrné (člunkové) předávání diacylglycerolu (Kodrík, 2000).

Lipophorin se strukturně skládá z jednoho apoproteinu o molekulové hmotnosti ~ 240 kDa (ApoLp-I) a druhého o molekulové hmotnosti ~ 80 kDa (ApoLp-II). U některých druhů se vyskytuje ještě třetí apoprotein o molekulové hmotnosti ~ 18 kDa (ApoLp-III) (Takeda & Tufail, 2012).

2.1.4.3. Vitellogeniny

U dospělých samic hmyzu se některé proteiny syntetizované tukovým tělískem a vylučované do hemolymfy dostávají do vaječníku, kde jsou přijímány vyvíjejícím se oocytem a slouží jako živiny pro embrya. Nejrozšířenější z nich se nazývá vitellogenin. Jakmile se vitellogenin stane součástí vaječného žloutku, nazývá se Vitellin (Resh & Cardé, 2009; Chapman et al., 2013). Vitellogeniny jsou obvykle velké fosforylované glykolipoproteiny o molekulové hmotnosti ~ 400-600 kDa, které jsou typicky přítomny u dospělých samic (Chapman et al., 2013).

2.2. Proteiny hemolymfy včely medonosné

Koncentrace proteinů v hemolymfě včel se liší na základě stáří, kasty, ročním období, stresových a dalších faktorů.

Chan et al. (2006) ve své studii srovnávají rozdíly v hemolymfě u různých kast včely medonosné (*Apis mellifera*). Včela medonosná se totiž řadí mezi eusociální hmyz, což je společenské uspořádání, kde pozorujeme tzv. kasty. U včely medonosné jsou to dělnice (sterilní samice), trubci (samci) a matka (plodná samice). Každá kasta má ve včelstvu jiné funkce, tím pádem má i rozdílné energetické a metabolické nároky a liší se v náchylnosti k patogenům. Jelikož včela patří mezi holometabolní hmyz, můžeme rozdíly ve složení hemolymfy pozorovat u každé kasty ještě mezi stádii vývoje dospělce (larva, kukla, dospělec) (Chan et al., 2006).

V mírném pásmu na Zemi se mohou vyvinout dělnice jako krátkověké letní včely s délkou života 4-6 týdnů nebo dlouhověké zimní včely s délkou života 22-24 týdnů. Generace letních včel se líhne začátkem jara (březen) přičemž na konci léta (srpen) dochází k jejich úbytku a začíná se líhnout zimní generace včel. Ta je vyvinuta tak, aby včely přečkaly zimu. U letních dělnic dochází k rychlému stárnutí na rozdíl od zimních včel, kde je stárnutí téměř zanedbatelné. Je to způsobeno tím, že se letní včely oproti zimním včelám účastní letových aktivit, během kterých hledají potravu, aby měly dostatek zásob na přežití nepříznivého období, kdy nejsou k dispozici zdroje potravy. To zahrnuje také zvýšený tlak parazitů (Münch et al., 2008; Aurori et al., 2014). Zimní včely jsou odchovány koncem léta a na podzim a jsou způsobilé přežít chladné období. Místo toho, aby se mladé zimní včely staly krmičkami, vstupují do stádia, kde je jejich úkolem vytápění a termoregulace úlu. U zimních včel byla prokázána vyšší odolnost vůči oxidativnímu stresu a také vyšší hladiny celkových proteinů (Fluri et al., 1982; Aurori et al., 2014; Kunc et al., 2019).

Jediným přirozeným zdrojem proteinů včely medonosné je pyl, kdy včelstva sbírají 10-26 kg pylu ročně. Pyl však není pouze zdrojem proteinů, ale i lipidů, sterolů a vitamínů (Stanley & Linskens, 1974). Včely míchají pyl s nektarem, medem a žlázovým sekretem, čímž vyrábějí včelí chléb (pergu) a v této podobě jej pak ukládají do zásob včelstva. Včelí chléb má na rozdíl od čerstvě nasbíraného pylu nižší pH a nižší obsah škrobu (Wille et al., 1985; Ellis & Hayes, 2015). Obsah proteinů a volných aminokyselin v pylu se liší v závislosti na druhu a oblasti výskytu rostlin. Včela medonosná potřebuje přijímat esenciální aminokyseliny, což jsou: methionin, lysin, threonin, histidin, leucin,

isoulecín, valín, fenylalanín a tryptofán (de Groot, 1952; Komosinska-Vassev et al., 2015). Dle Isani et al. (2023) bylo stanoveno pomocí hmotnostní spektrometrie 12 různých proteinů v hemolymfě dělnice včely medonosné s rozličnou funkcí. Nejvíce zastoupené skupiny proteinů popsané v hemolymfě včely medonosné jsou detailněji popsány níže.

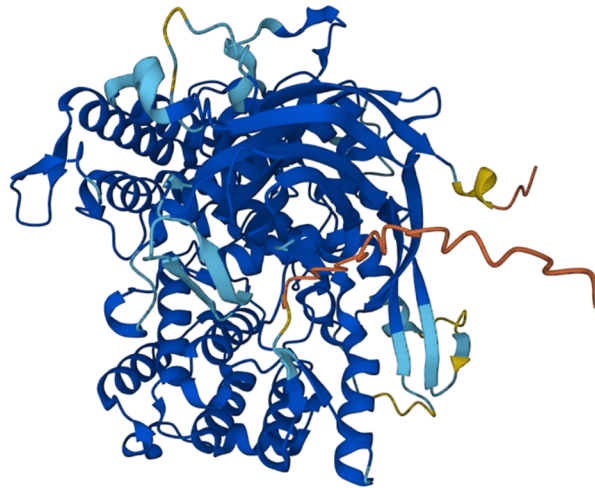
2.2.1. Hexameriny

Hexameriny – zásobní proteiny hmyzu jsou evolučně odvozené od hemocyaninu – krevního barviva měkkýšů a klepítkačů. Poukazuje na to (Beintema et al., 1994), kteří navrhli, že hexameriny ztratily na rozdíl od ancestrální molekuly hemocyaninu schopnost vázat měďnaté ionty pro přenos kyslíku.

Funkcí hexamerinů je sloužit jako zdroj aminokyselin především během stádia kukly, ale také během života dospělé včely například při přechodu od dělnice kojičky ke krmičce. Dle (Martins et al., 2010) hladiny a vzorce transkriptů v tukovém tělese a gonádách naznačují, že kromě své primární úlohy v dodávání aminokyselin pro metamorfózu slouží hexameriny jako zásobní proteiny pro vývoj gonád, produkci vajíček a podporu potravní aktivity. Jeho koncentrace ale v těle dospělé v závislosti na věku klesá (Isani et al., 2023).

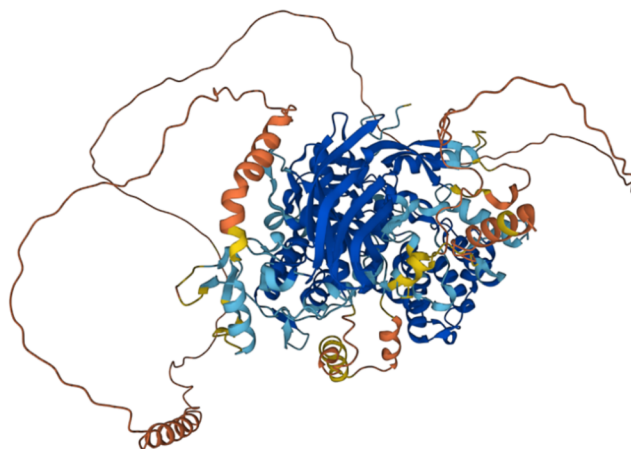
Martins et al. (2010) popsali u včely medonosné čtyři geny hexamerinů: *hex 70 a*, *hex 70 b*, *hex 70c* a *hex 110*. Jednotlivé hexameriny se značně strukturně odlišují, celková aminokyselinová identita mezi jejich odvozenými proteinovými podjednotkami se pohybuje od 30 do 42 %. Tyto čtyři geny jsou vysoce transkribovány tukovým tělískem larvy, ale pouze geny *hex 70 a* a *hex 110* byly detekovány v těle dospělců. Transkripty pro *hex 70 a*, *hex 110* a *hex 70 b* byly zjištěny ve vyvíjejících se vaječnicích a varlatech. *Hex 110* byl zároveň vysoce transkribován ve vaječnicích matek kladoucích vajíčka (Martins et al., 2010).

Hexamerin 70 a (80 kDa) lze snadno identifikovat, jelikož je v hemolymfě včely medonosné hojně zastoupen. Hex 70 a obsahuje tři hemocyaninové domény, které jsou pro všechny hexameriny typické. Predikovaná struktura Hexamerinu 70a je znázorněna níže (Obr. 2). Dále obsahuje vysoký podíl aromatických aminokyselin (18,2 %) (Martins et al., 2011).



Obr. 2: Predikovaná struktura včelího Hexamerinu 70a. Struktura vytvořená pomocí AlphaFold <https://alphafold.ebi.ac.uk/enhjtry/A5YVK7> (1.4.2024).

Hexamerin 110 (110 kDa, Obr. 3) byl identifikován ve všech vývojových fázích včely medonosné. Největší množství bylo identifikováno ve fázi larvy během krmení. V larvální fázi odpovídá množství Hex 110 v hemolymfě vysoké hladině příslušného transkriptu. Jakmile krmení larev ustává, množství Hex 110 se výrazně snižuje a nízká hladina přetrvává během celého stádia kukly a dospělé. U dospělých dělnic došlo k zvýšení transkriptu (hladina srovnatelná s hladinou u larev), ale množství příslušného Hex 110 v hemolymfě zůstalo nízké. Toto naznačuje, že dospělé včely medonosné sice mohou obnovit biosyntézu podjednotek Hex 110 v tukových tělískách buněk, ale bez následného uvolňování a hromadění v hemolymfě (Bitondi et al., 2006).



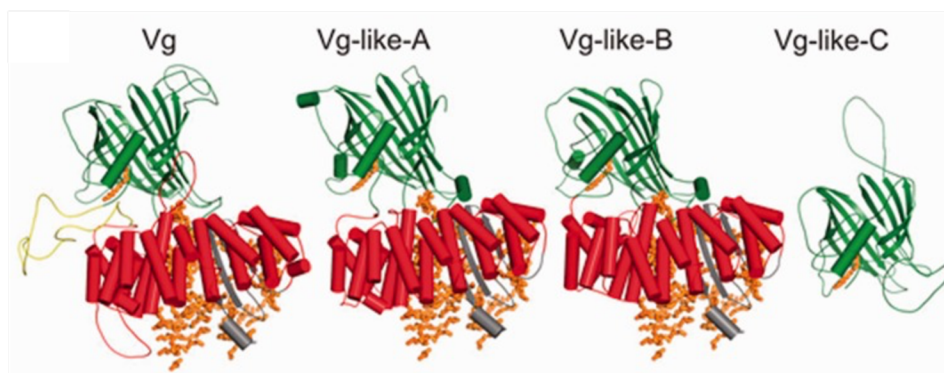
Obr. 3: Predikovaná struktura včelího hexamerinu 110. Struktura vytvořená pomocí AlphaFold. <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/A7XZB1> (8. 4. 2024).

2.2.2. Vitellogenin

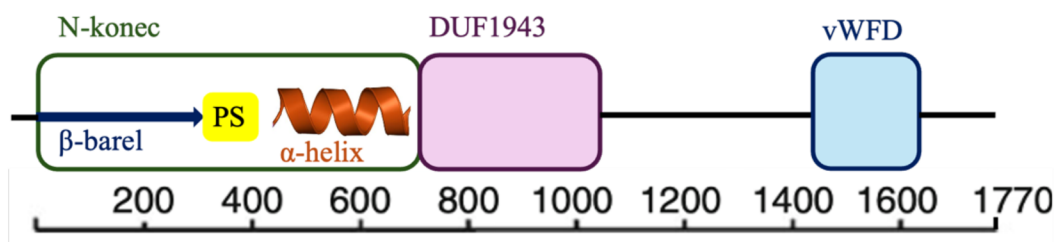
Vitellogenin (Vg) je charakterizován jako komplexní monomerní fosfolipoglykoprotein o velikosti 180 kDa s klíčovou funkcí lipidového transportéru a předpokládaným proteinovým zdrojem pro tvorbu mateří kašičky. Do hemolymfy se uvolňuje z tukového tělíska (místo produkce a skladování). Z hemolymfy přechází vitellogenin do hypofaryngeálních žláz, které jsou zodpovědné za sekreci mateří kašičky (Amdam et al., 2003; Takeda & Tufail, 2012).

Gen pro vitellogenin včely medonosné má délku 5 440 bp a kóduje polypeptid o 1770 aminokyselinách. Gen *Vg* prodělal v minulosti evoluční vývoj zejména v oblasti aminokyselinového složení. Z původního proteinu se dále v rámci evolučního vývoje a adaptace diferenciovaly vitellogeninu podobné proteiny (*vg-like*): *vg-like-a*, *vg-like-b* a *vg-like-c* (Obr. 4). *Vg-like* proteiny jsou kódovány *Vg-like* geny, ty se liší od *Vg* genu lokalizací na chromozomu. *Vg* se nachází na chromozomu LG4, *Vg-like-A* na chromozomu LG13 a *Vg-like-B* společně s *Vg-like-C* na chromozomu LG2. Přestože se *Vg-like-B* a *Vg-like-C* nacházejí na stejném chromozomu, nejbližšími homology jsou právě *Vg-like-A* a *Vg-like-b*. *Vg-like-a* je strukturou a funkcí nejpříbuznější *Vg* (Salmela et al., 2016).

U struktury vitellogeninu včely medonosné se jsou predikovány 3 základní části: N-terminální domény (ND), domény neznámé funkce (DUF1943) a von Willebrandova faktoru typu D (vWF) (Obr. 5). U včely medonosné se dále ND dělí na subdomény: β -barel a α -helix, které jsou propojeny polyserinovou spojkou (Leipart et al., 2022).



Obr. 4: Porovnání struktury *Vg* a *Vg-like* proteinů. Zobrazeny jsou struktury β -barel, α -helix, vWFD a polyserinové spojka. Upraveno dle (Salmela et al., 2016).



Obr. 5: Predikovaná struktura včelího vitellogeninu (1770 bp): N-konec se subdoménami β -barelu a α -helix, které jsou spojeny štěpitelnou polyserinovou spojkou; domény neznámé funkce (DUF1943); von Willebrandův faktor typu D. Upraveno dle (Leipart et al., 2022).

U vitellogeninu dochází během posttranslačních modifikací k rozdělení na dva či více fragmentů (Takeda & Tufail, 2012). Štěpení na dva fragmenty se většinou odehrává v okolí polyserinové spojky, kde se nachází štěpicí místo RXXR (R = arginin, X = jakákoliv jiná kyselina). Nerozštěpený vitellogenin má velikost 180 kDa, jeho fragmenty mají 40 kDa (N-list) a 150 kDa (zbytek molekuly s obsahem α -helixu). Bylo zjištěno, že celkový protein i jeho fragmenty jsou fosforylovány (Havukainen et al., 2011). (Havukainen et al., 2011) dále naznačuje, že se vitellogenin u včelího tukového tělíska na rozdíl od vitellogeninu v hemolymfě štěpí, což může naznačovat jeho tkáňově specifickou roli.

(Nelson et al., 2007) navrhuje pleiotropní efekt vitellogeninu včely medonosné, který naznačuje, že gen pro vitellogenin je ústředním prvkem v regulaci životní dráhy tohoto sociálního hmyzu. Pro pochopení funkce vitellogeninu ve vývoji dělnic je třeba znát jejich přirozený vývoj. Dělnice zastávají v úle nejdříve roli čističek a následně krmiček (stáří 4 dny – v tomto období mají vysoký podíl vitellogeninu v hemolymfě). Kolem 15. dne začínají u krmiček změny jak v chování, tak z hlediska fyziologie. Dochází k růstu hladiny juvenilního hormonu, funkce slinných a hypofaryngeálních žláz ustává. V tomto období se z krmiček stávají létavky, které začínají sbírat pyl, nektar a vodu (Piulachs et al., 2003). U krmiček je hladina Vg vysoká a u létavek nižší. Při uměle navozené snížené expresi genu *vitellogeninu* dochází také k snížení hladiny vg a přechod z krmiček na létavky nastává dříve. Vyšší hladiny vg tento přechod zpomalují, čímž se potvrzuje funkce tohoto proteinu jako ústředním faktorem v regulaci životní dráhy (Nelson et al., 2007).

(Seehuus et al., 2006) prokázali, že aktivita vitellogeninu chrání včelí dělnice před oxidačním stresem a zároveň je preferovaným cílem oxidační karbonylace ve srovnání s hexameriny a Apolipoproteinem I. Úlohu vitellogeninu srovnávali s funkcemi sérových

albuminů. Albumin je charakterizován jako protein vázající kovy, který může působit jako zachytávač volných radikálů a snižovat hladiny oxidačních markerů.

(Harwood et al., 2019) popisují, že vitellogenin může usnadňovat transgenerační imunitní priming. To je proces, se kterým se setkáváme u bezobratlých živočichů, kdy rodiče připravují své potomky na obranu proti patogenů, se kterými se setkali (Freitak et al., 2014). Vitellogenin v tomto procesu figuruje tak, že přenáší živiny a imunitní elicitory do vyvíjejících se vajíček. Imunitní elicitory používané k zahájení transgeneračního imunitního primingu mohou pocházet z enviromentálních patogenů se kterými se samice setkala a které pozřela. Je ale známo, že včelí matky jsou patogenům vystaveny jen omezeně, protože pobývají výhradně v úle s výjimkou snubního letu. Aby byl transgenerační imunitní priming u včely medonosné účinný, musí matka své potomstvo připravit proti patogenům, se kterými se setkávají její dělnice. To je zajišťováno prostřednictvím konzumace kontaminované potravy dělnicemi, jelikož matky se živí výhradně mateří kašičkou produkovanou dělnicemi (Harwood et al., 2019; Salmela et al., 2015).

Dle (Cabbri et al., 2018) tvoří vitellogenin cenný nástroj pro hodnocení nutričního stavu včely medonosné vzhledem k jeho vztahu ke kvalitě a množství proteinů v potravě.

Dlouhou dobu bylo předpokládáno, že je vitellogenin proteinem výhradně samic. (Trenczek et al., 1989) stanovovali časové změny obsahu proteinů v hemolymfě trubců, které ukázali maximální koncentraci během prvního týdne po vylíhnutí. Během tohoto týdne bylo zjištěno, že vitellogenin představuje přibližně 5 % z celkového množství rozpustných proteinů hemolymfy. Stopovací experimenty poukázaly na fakt, že maximální produkce vitellogeninu tvoří přibližně 10 % celkové syntézy sérových proteinů do 8. dne a poté rychle klesá. U trubců starších dvou týdnů bylo v hemolymfě možné detekovat pouze stopy vitellogeninu a syntéza vitellogeninu ustala.

Během prvních 7 dnů života dospělé dělnice, kdy se stává ošetřovatelkou a plní úkoly spojené s chovem včelstva se koncentrace vitellogeninu zvyšuje a může tvořit až 40 % celkových proteinů hemolymfy (Piulachs et al., 2003). Dle (Amdam et al., 2009) využívají dělnice vitellogenin převážně při produkci mateří kašičky (včely staré zhruba 3-10 dní). Následně koncentrace vitellogeninu klesá, což souvisí s fyziologickými i sociálními vlastnosti dělnic.

Velký rozdíl ale vidíme u včelích matek, které syntetizují vitellogenin po celou dobu dospělosti. U včelích matek je *vitellogenin* exprimován zhruba 20x více než u dělnic. Když je matka v období bez produkce vajíček (před rojením nebo během zimy)

koncentrace vitellogeninu klesá, ale ani během tohoto období není koncentrace vitellogeninu nižší než 40 % (Chan et al., 2006; Trenczek et al., 1989).

Kunc et al. (2019) prokázali, že hladina všech proteinů v hemolymfě včel byla výrazně zvýšena v období od října do března – tedy u zimních včel, přičemž hodnoty přesahovaly 50 mg·ml⁻¹. Je to rozdíl oproti letním včelám, kdy se hodnota pohybovala okolo 30 mg·ml⁻¹. Oproti letním včelám dochází u zimních včel k tomu, že se hladina proteinů s věkem zvyšuje, a tedy i hladina vitellogeninu, který plní funkci zásobní a antioxidační. Zimní včely si musejí zásobní živiny nejdříve vytvořit a nadále je udržovat.

2.2.3. Lipophorinový systém a Apolipophoriny včel

Lipophoriny lze popsat jako nekovalentní sestavu lipidů a proteinů, z velké části uspořádanou jako sférickou částici. Jádro obsahuje hydrofobní molekuly lipidů, jako jsou diacylglyceroly, uhlovodíky a karotenoidy (Van der Horst & Ryan, 2017). Diacylglyceroly slouží jako zdroj energie pro různé tkáně. Uhlovodíky se ukládají na kutikule, kde tvoří ochranu proti vysychání. Karotenoidy jsou pigmenty rostlinného původu, které jsou důležité jako prekurzory dalších pigmentů. Další důležitou lipidovou složkou lipophorinu jsou fosfolipidy (fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin) (Van der Horst & Ryan, 2017). Lipophorin se v hemolymfě včel vyskytuje povětšinou ve dvou formách, a to jako lipophorin s vysokou hustotou (HDLp) a lipophorin s nízkou hustotou (LDLp). LDLp se od HDLp liší hlavně tím, že obsahuje více lipidů (Kanost et al., 1990).

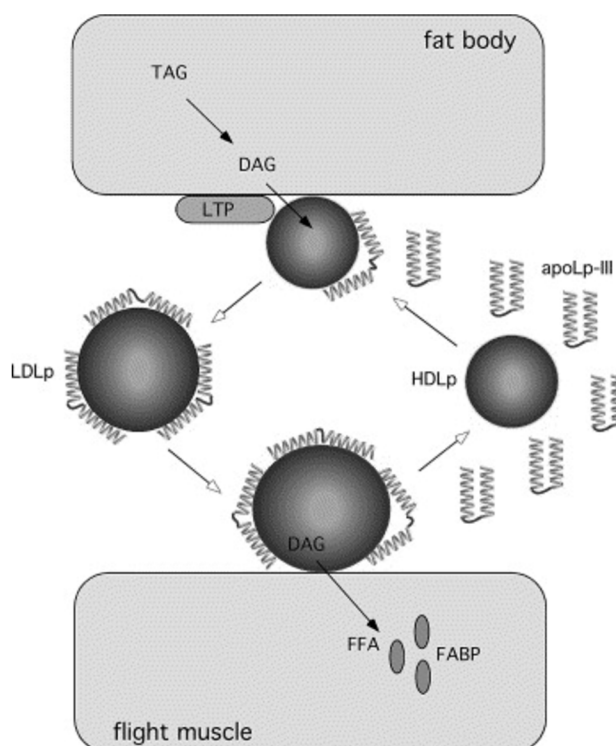
Lipophoriny včely medonosné obsahují dva integrované apolipophoriny (ApoLp-I a ApoLp-II) a mohou obsahovat výměnný protein (ApoLp-III) (Van der Horst & Rodenburg, 2010). Apolipophorin I a Apolipophorin II je možné jasně detekovat a kvantifikovat pomocí SDS-PAGE na základě rozdílné hmotnosti: ApoLp-I (240 kDa) a ApoLp-II (80 kDa) (Van der Horst & Rodenburg, 2010).

Je známo, že ApoLp-I a ApoLp-II jsou produktem stejného genu a že oba proteiny vznikají posttranslačním štěpením jejich prekurzorového proteinu. Na společném prekurzorovém proteinu jsou uspořádány tak, že sekvence ApoLp-II je na N-konci a ApoLp-I na C-konci (Van der Horst & Ryan, 2017).

Apolipophorin III (ApoLp-III) je nízkomolekulární vyměnitelný apolipoprotein, který existuje jak vázaný, tak volný. Vázaný na lipidy je v aktivní formě a dochází k němu, když se ApoLp-III spojí s lipophoriny obohacenými o lipidy. Nízká vnitřní stabilita ApoLp-III ve stavu bez lipidů pravděpodobně usnadňuje jeho interakci s lipidovými

povrchy. Interakci s lipidy podporuje také nízké pH prostředí, jelikož je zvýšena přítomnost hydrofobních povrchů na ApoLp-III (Weers & Ryan, 2003).

ApoLp-III hraje ústřední roli v přenosu neutrálních lipidů během letu hmyzu. Uvolňování adipokinetického hormonu (AKH) neurosekrečními buňkami srdečního tělíska spouští v tukové tkáni řadu intracelulárních signálních dějů, jejichž výsledkem je přeměna uloženého triacylglycerolu na diacylglycerol (DAG). DAG je přenášen lipidovou přenosovou částicí na HDLp. Obohacení HDLp o DAG vyvolává spojení s ApoLp-III, čímž vzniká LDLp, větší, méně hustá částice, která je obohacena o DAG a ApoLp-III. LDLp putuje hemolymfou do letových svalů, kde je DAG hydrolyzován na volnou mastnou kyselinu a glycerol. HDLp a ApoLp-III se obnovují v hemolymfě, kde mohou být znovu použity pro další cykly vychytávání DAG v tukovém tělese a dodávání do letového svalu (Obr. 6). Tento jedinečný lipoproteinový kyvadlový systém je zodpovědný za účinný transport lipidů z místa uložení do místa použití přes hemolymfu, čímž poskytuje tkáni letového svalu dostatek energie pro trvalou letovou aktivitu (Weers & Ryan, 2003).



Obr. 6: Schéma lipoproteinového kyvadlového přenašeče. Zásobní TAG jsou přeměněny na DAG působením AKH se ukládají na již existující částice HDLp v hemolymfě. Zvýšený obsah DAG v částicích lipoproteinu vyvolává vazbu ApoLp-III, čímž vzniká LDLp. Částice LDLp uvolňují svůj náklad DAG v letových svalech a vzniklé HDLp a ApoLp-III bez lipidů mohou být znovu použity pro další cykly vychytávání a dodávání DAG. DAG je hydrolyzován na volné mastné kyseliny (FFA) a intracelulární transport do mitochondrií usnadňuje protein vázající mastné kyseliny (FABP) (Weers & Ryan, 2003).

Na rozdíl od savčího lipoproteinů o nízké hustotě (LDL), který je do buněk přijímán endocytózou a je intracelulárně hydrolyzován, funguje ApoLp-III jako opakovatelně použitelný transportér, který přijímá a odevzdává lipidy, aniž by se apolipoproteiny dostaly do buňky nebo by byly zničeny (Kanost et al., 1990).

Kromě úlohy v transportu lipidů byla popsána také funkce ApoLp-III v imunitních reakcích hmyzu. ApoLp-III se váže na PAMPs, což jsou s patogeny asociované molekulární vzory (např. liposacharidy, kyselina lipoteichoová, houbový β -1,3-glukan) (Kim & Jin, 2015).

2.2.4. Transferin

Isani et al. (2023) pomocí SDS-PAGE vzorku hemolymfy včely medonosné separovali transferin (80 kDa), což je hlavní transportní protein železa u všech živočichů a jeden z nejdůležitějších proteinů podílejících se na udržování homeostázy tohoto nezbytného prvku. Primární místo exprese transferinu u včely medonosné je tukové tělísko, kdy se transferin podílí na transportu železa ze střeva právě do tukového tělíska (Rodríguez-García et al., 2021).

Železo hraje nepostradatelnou roli v metabolických procesech jako je dýchání, tvorba energie, regulace genů a biosyntéza DNA. U hmyzu se navíc železo podílí na tvorbě kutikuly, hnědnutí, melanizaci a hojení ran. Je ale také silným toxinem, jelikož má schopnost produkovat volné radikály v přítomnosti kyslíku, a proto je jeho nadbytek nežádoucí. Nadbytek železa může také napomoci šířit onemocnění zprostředkované virem, jelikož usnadňuje jejich replikaci. Právě toxický potenciál železa podnítil organismy k vývoji strategie, která umožňuje železo transportovat, ale zabraňuje jeho hromadění v citlivých tkáních (Geiser & Winzerling, 2012; Crichton et al., 2002).

Železo se také účastní Fentonovy reakce, při které vzniká velmi reaktivní hydroxylový radikál: $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{HO} + \text{OH}^-$. Regulace železa je tedy nezbytná, aby se tomuto a dalším škodlivým účinkům železa zabránilo (Kim et al., 2008; Park et al., 2021).

Většina hmyzu obsahuje transferiny se schopností vázat pouze jeden ion železa – stejně tak u včely medonosné. Výraznou výjimkou je *Blaberus discoidalis*, což je šváb pocházející ze Střední Ameriky, u kterého byly zjištěny dvě funkční místa pro vazbu železa (Kucharski & Maleszka, 2003).

U savců jsou transferiny produkovány v játrech a nejhojněji zastoupeny v krvi. Tvoří stěžejní roli v homeostáze železa a při buněčném transportu. Ke vstřebávání železa

dochází převážně ve střevních epitelálních buňkách dvanáctníku a tenkého střeva (Rodríguez-García et al., 2021).

Bylo pozorováno, že ztráta funkce transferinu vede ke zvýšené dostupnosti volného železa, což může podporovat oxidační stres (Martins et al., 2011) a vést k indukci během buněčné smrti (Kim et al., 2008). Transferin je schopen vázat železo s vysokou afinitou což umožňuje udržovat nízkou koncentraci volného železa v hemolymfě a tím je omezena dostupnost železa pro invazivní patogeny (Rodríguez-García et al., 2021).

2.2.5. Ostatní proteiny

Hemolymfa včely medonosné obsahuje kromě hlavních výše zmíněných proteinů mnohem více proteinů, jejichž počet nebyl přesně stanoven. Byly v ní identifikovány nejrůznější enzymy, zejména ty, co se podílejí na metabolismu sacharidů např. α -D-glukosidasa glukohydrolasa (α -glukosidasa, EC 3.2.1.20), (65 kDa). Dle předpokladu se α -glukosidasa vztahuje k metabolismu hlavního hemolymfatického sacharidu – trehalose (Erban et al., 2013). Významnými enzymy hemolymfy jsou také enzymy spadající do třídy fenoloxidas (PO, EC 1.14.18.1). V hemolymfě včely medonosné byla identifikována podjednotka fenoloxidasy A3 (80 kDa) (Erban et al., 2013). Fenoloxidas jsou charakterizovány jako enzymy obsahující měď, s klíčovou aktivitou v reakčním řetězci vedoucím k syntéze melaninu. Mimo to bylo prokázáno, že se PO podílejí především na obranných reakcích a hojení ran. PO je syntetizována volně cirkulujícími hemocyty. Je syntetizována jako neaktivní prekurzor profenoloxidasy (ProPO), která jsou aktivována v důsledku poranění nebo mikrobiální či parazitární invaze endogenním systémem zahrnující serinovou proteasu. Enzym se kromě hemolymfy nachází také v kutikule, která obsahuje kaskádu pro aktivaci ProPO (Zufelato et al., 2004). Glutathion-S-transferasa (GST, EC 2.5.1.18), (17 kDa) identifikovaná v hemolymfě včely medonosné vykazuje aktivitu detoxifikačního činidla a jako antioxidační ochrana proti oxidačnímu stresu. (Erban et al., 2013).

Mezi ostatní proteiny můžeme zařadit také antimikrobiální peptidy (AMP), což jsou látky produkované nejen včelou medonosnou, ale také prakticky všemi druhy počínaje rostlinami a konče člověkem. AMP jsou produkovány jako obranný mechanismus proti napadení patogeny (bakterie, viry, houby a paraziti). Přispívají tedy k vrozené obraně hostitele tím, že likvidují cizorodé patogeny a zároveň modifikují imunitní funkce hostitele. Ačkoliv se AMP liší svojí sekvencí a strukturou, vyznačují se společnými rysy, jako jsou: délka aminokyselinového řetězce 12-100 AMK, jsou amfifilní, mají nejméně

dva kladné náboje (argininové nebo lysinové zbytky) a obsahují dvě nebo více disulfidických vazeb (Keitel et al., 2013). Kationtové AMP jsou přitahovány záporným nábojem mikrobiální membrány a po samotném spojení mohou membránu narušit nebo po průchodu membránou inhibovat intracelulární cíle (Keitel et al., 2013). U včely medonosné jsou nejvýznamnější AMP v hemolymfě Apidaeciny (~ 25 kDa), Defensiny (~ 5-10 kDa), Hymenoptacein (~ 10 kDa) a Abaecin (~ 4 kDa) (Daníhlík et al., 2016). Apidaeciny, které jsou 18-20 AMK dlouhé a bohaté na prolin se strukturně skládají ze dvou oblastí. První je konzervovaná (konstantní) oblast C-konce, která je zodpovědná za obecnou antimikrobiální funkci a druhá je N-koncová variabilní oblast, která nese odpovědnost za antibakteriální spektrum (Li et al., 2006). Defensiny jsou na rozdíl od apidaecinů bohaté na cystein a vyskytují se ve dvou peptidových formách – Defensin 1 je syntetizován ve slinných žlázách a Defensin 2, který je syntetizován buňkami tukového tělesa a hemocyty. Defensiny disponují širokým spektrem antimikrobiální aktivity (Ilyasov et al., 2012). Hymenoptacein byl identifikován jako 93 AMK dlouhý lineární peptid a zařazen mezi peptidy bohaté na glycin. Hladina tohoto antimikrobiálního peptidu se rychle zvyšuje v reakci na infekci u dospělců i u nejmladších jedinců. Mezi jeho účinek patří inhibice růstu G⁺ i G⁻ bakterií (Casteels et al., 1993; Chan et al., 2006). Abaecin je stejně jako Apideacin antimikrobiální peptid s vysokým obsahem prolinu, který vzniká ze svého prekurzoru štěpením, jež byl identifikován jak u dospělců, tak v hemolymfě včelího plodu. Exprese a množství Abeacinu se rychle zvyšuje v reakci na bakteriální infekci a peptid je účinný vůči G⁺ bakteriím (Casteels et al., 1990).

Dále byly také identifikovány hlavní proteiny mateří kašičky (MRJP) (~ 47-68 kDa), které jsou považovány za hlavní faktor při vývoji včelích matek. MRJP obsahují velké množství (82-90 %) aminokyselin nezbytných pro výživu. Celkově bylo identifikováno 9 MRJP (Ramanathan et al., 2018). Proteiny mateří kašičky jsou v této fázi klíčové pro podporu vývoje a imunitních schopností. Pokles regulace MRJP po 3. dni pravděpodobně souvisí s posunem v jejich potravním systému, kdy přecházejí od mateří kašičky k směsi v podobě roztoku medu, pylu a vody (Wolstedji et al., 2013).

2.3. Proteinové zastoupení napříč vývojovými stádii včely medonosné

Včela medonosná prochází před přechodem do stadia dospělé kompletní metamorfózou. Stádium kukly začíná převtělením z posledního larválního stadia, několik dní po uzavření plodové buňky. Délka vývoje každé kasty (dělnice, trubec, matka) se různí a je znázorněna na Obr. 7. Protože se složení proteinů hemolymfy včely medonosné v jednotlivých vývojových stádiích liší, lze je využít ke zkoumání vývojových změn a kastovních rozdílů (Erban et al., 2016).

VÝVOJOVÁ STÁDIA VČELÍHO PLODU																														
DEN	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.						
MATKA	[Color-coded development stages]																													
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	1.	1.	2.	3.	4.	5.														
DĚLNICE	[Color-coded development stages]																													
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.									
TRUBEC	[Color-coded development stages]																													
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.						

FÁZE OTEVŘENÉHO PLODU	vajíčko - embryonální vývoj		FÁZE ZAVÍČKOVANÉHO PLODU	vzpřímená larva - larva se zapřadá do kokonu	
	stočená larva - larvální vývoj			předkukla - začátek metamorfózy	
				kukla - průběh a konec metamorfózy	

bez znaku	fáze růstu a vývoje	X	fáze svlékání	Z	zakuklení	L	línutí
-----------	---------------------	---	---------------	---	-----------	---	--------

Obr. 7: Diagramové znázornění vývojových stádií včelího plodu napříč kastami. Převzato od (*Včely: Vývojová stádia včelího plodu*) <https://cit.vfu.cz/nz/NHZ/anatomie%20vcel.html> (28.11.2023).

Woltedji et al. (2013) měli jako hlavní cíl své studie analyzovat změny v proteomu hemolymfy dělnic včely medonosné, a to při jejím přechodu ze stadia larvy do kukly. Zjistili, že v porovnání s kuklami systému je v hemolymfě larvy silnější exprese proteinů, které slouží primárně pro podporu růstu larvy a pro posílení nezralého imunitního systému (např. zásobní proteiny, proteiny vázající mastné kyseliny). Popsané exprimované proteiny jsou pak zapojeny především do metabolismu sacharidů, skládání proteinů, vývoje a ukládání energie ve formě hexamerinů. V hemolymfě kukly je většina těchto proteinů snížena, ale některé nové rodiny proteinů se přidávají (např. proteiny související s metabolismem aminokyselin, nukleotidů a mastných kyselin), jelikož se včela připravuje na nekrmivou fázi kukly.

V několika stádiích včely medonosné byla v hemolymfě potvrzena přítomnost proteinů mateří kašičky (MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4, MRJP5) přičemž jejich specificky vysoký výskyt byl prokázán v hemolymfě mladých larev (mladší než 3 dny). Mateří kašička je hustá, mléčně bílá tekutina, kterou produkují a vyučují včelí dělnice

krmičky z hypofaryngeálních (hltanových) žláz. Mateří kašička je podávána po celý život včelí matce, která žije plodný život čtyři až pět let. Je tedy zřejmé, že má mateří kašička a potažmo její proteiny silný vliv na vývoj, zrání a dlouhověkost (Ramanathan et al., 2018; Kunc et al., 2019)

Erban et al. (2016) analyzovali proteiny v hemolymfě kukly (vývojové stadium kukly s červenými očima) a čerstvě vylíhlé dělnice. Analýza byla provedena pomocí dvojrozměrné elektroforézy a hmotnostní spektrometrie (MALDI TOF/TOF). Výsledky ukázaly kvalitativní změny i kvantitativní změny při vylíhnutí včely – v tento okamžik obsahuje hemolymfa nízký počet proteinů, které byly pravděpodobně využity během období líhnutí. Až první krmení čerstvě vylíhlého jedince indukuje syntézu nových proteinů například zásobních hexamerinů, které nebyly v čerstvě vylíhnutém jedinci identifikovány. V čerstvě vylíhnutém jedinci byla ale přítomna vysoká hladina některých proteinů jako je například glutathion-S-transferasa, což svědčí o přípravě jedince na nové podněty (stres z nového prostředí nebo patogenu) po opuštění zavíčkovaného plástu, který tvoří uzavřené prostředí.

Kunc et al. (2019) ve své studii měřili pomocí Bradfordovy metody celkovou koncentraci proteinů v hemolymfě včely medonosné napříč měsíci v jednom roce (konkrétně březen 2017-září 2018). Na začátku každého měsíce bylo ze včelstva odebráno náhodně přibližně 150 včel a byla jim odebrána hemolymfa. Dále se ve své studii zabývali konkrétně hladinou vitellogeninu, a to pomocí SDS PAGE a Western blotu. Výsledky ukázaly, že koncentrace veškerých proteinů v hemolymfě se v letních obdobích (krátkověká generace včel) pohybovala kolem $30 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. V zimním období (dlouhověká generace včel) se hladina proteinů výrazně zvýšila, a to na hodnotu $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. S těmito výsledky korelovala i hladina vitellogeninu, jehož hladina byla v zimních měsících zvýšena (okolo $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$), zatímco během letních měsíců byla snížena (okolo $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Isani et al. (2023) ve své studii týkající se kvantitativní analýzy proteinů hemolymfy včely medonosné odebírali vzorky v průběhu roku ze čtyř včelstev Itálie. Měřili hladinu celkových proteinů Bradfordovou metodou, kdy výsledky ukázaly, nejvyšší koncentraci proteinů ve všech včelstvech v listopadu (tedy u zimní generace včel, hladina nad $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Zajímavé bylo, že se u jednoho včelstva v květnu objevovala vyšší hladina celkových proteinů ($40 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, zbytek okolo $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Tento fakt byl nejspíše způsoben tím, že bylo okolní prostředí velmi bohaté na pyl. Dále ve své studii separovali a identifikovali proteiny pomocí SDS-PAGE a pomocí

hmotnostní spektrometrie (ESI-Q-TOF). Výsledky pomocí těchto metod ukázali dva nejhojnější proteiny – Apolipophorin (>200 kDa, 80 kDa a 21 kDa) a Vitellogenin (180 kDa a 150 kDa). Dále byli schopni identifikovat Transferin (70 kDa) Hexamerin 70 a (67 kDa), prekurzor Fenoloxidasy (58 kDa) a hlavní protein mateří kašičky (MRJP 1) (54 kDa).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. Materiál

3.1.1. Chemikálie

- Akrylamid (AA) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Bromfenolová modř (Sigma-Aldrich, Německo)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bio-Rad, USA)
- Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad, USA)
- Dithiotreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Ethanol (Lach-Ner, Česká republika)
- 1-fenyl-2-thiomočovina (PTU) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, Německo)
- Glycin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Komerční gel Mini-PROTEAN TGX s gradientem 4-20% (Bio-Rad, USA)
- Kyselina fosforečná (Lach-ner, Česká republika)
- Kyselina octová (Sigma-Aldrich, Německo)
- Kyselina trifluoroctová (TFA) (odkud)
- Marker molekulové hmotnosti (SigmaMarker™ wide range 6500-200 000 Da) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Methanol (Lach-Ner, Česká republika)
- *n*-butanol (Sigma-Aldrich, Německo)
- N,N'-metylen-bisakrylamid (BIS) (Sigma-Aldrich, Německo)
- N,N'-tetramethylendiamin (TEMED) (Carl Roth, Německo)
- Persíran amonný (APS) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) (MP Biomedicals, Francie)

3.1.2. Roztoky

- Roztok kyseliny trifluoroctové (w/v) = 0,1 %
- Zásobní roztok Coomassie Blue: 100 mg Coomassie Blue G-250 v 50 ml methanolu a 100 ml 85% kyseliny fosforečné, doplněno ddH₂O na 200 ml

- Akrylamid-N,N'-methylbisakrylamid: 30% (w/v) akrylamid, 0,8% (w/v) bisakrylamid ve vodě
- Pufr do dělicího gelu: 1,5 M Tris/HCl; pH 8,8
- Pufr do zaostřovacího gelu: 0,5 M Tris/HCl; pH 6,8
- 10% (w/v) SDS
- 10% (w/v) APS
- Elektrodotový pufr: 0,025 M Tris; 0,192 M glycin; 0,1% (w/v) SDS; pH 8,3
- 2 x vzorkovací pufr dle Laemmliho: 0,125 M Tris/HCl; 4% (w/v) SDS; 20% (w/v) glycerol; 0,2 M DTT; 0,02% (w/v) bromfenolová modř; pH 6,8
- Fixační roztok: 10% (v/v) kyselina octová, 50% (v/v) methanol
- Barvicí roztok Coomassie Brilliant Blue (CBB): 0,1 % (w/v) CBB R-250 v 15 % (v/v) kyselině octové a 45% (v/v) methanolu
- Odbarvovací roztok pro barvení gelu CBB R-250: 10% (v/v) methanol, 2% kyselina fosforečná

3.1.3. Biologický materiál

Jako vstupní materiál pro experiment byla využita hemolymfa včely medonosné (*Apis mellifera*), která byla odebírána ze zimních včel v říjnu roku 2023. Včely byly chovány v laboratorních podmínkách tak, že byl do laboratoře přinesen rámeček se zavíčkováným plodem, který byl vložen do inkubátoru (34,5 °C, vlhkost 60-70 %). Čerstvě vylíhnuté včely byly odebrány do chovných klíček a poté ponechány v inkubátoru po dobu jednoho, dvou, tří, šesti, osmi, dvanácti dní a krmeny pylovou náhražkou UltraBee a roztokem 50% sacharosu. Po dosažení daného věku byly včely uspány pomocí CO₂ a byla jim odebrána hemolymfa.

Hemolymfa byla odebrána uchycením pomocí pinzety za hrudník a malými nůžkami byl uštěpen včele zadeček. Opatrným stlačením hrudníku byla vytlačena hemolymfa a odebrány 2 µl pomocí automatické pipety. Hemolymfa byla odebrána do zkumavky, která obsahovala zrnko fenylthiomocoviny (PTU) pro inhibici fenoloxidasové reakce hemolyfy. Do označených 0,5 ml mikrozkuvek bylo přidáno co nejmenší množství (zrnko) PTU v pevném stavu a následně 2 µl odebrané hemolymfy. Vzorky byly umístěny ihned na led a potom uchovávány v mrazáku při -80 °C.

Seznam odebraných vzorků pro analýzu je popsán v Tab. 1.

Tab. 1: Seznam odebraných vzorků pro analýzu včetně data odběru a stáří včel.

Označení vzorku	Stáří včely v den odběru	Datum odběru
Vzorek 1	0 den	02/10/23
Vzorek 2	1 dní	03/10/23
Vzorek 3	2 dny	05/10/23
Vzorek 4	3 dny	06/10/23
Vzorek 5	6 dní	09/10/23
Vzorek 6	8 dní	12/10/23
Vzorek 7	12 dní	16/10/23

3.1.4. Přístroje a pomůcky

- Analytické váhy Denver Summit (Denver Instrument, USA)
- Aparatura pro SDS-PAGE (Bio-Rad, USA)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Centrifuga 5418 R (Eppendorf, Německo)
- Dokumentační systém pro gely Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, USA)
- Magnetická míchačka Big Squid (IKA, Německo)
- Mikrodestička TPP (96 jamek) (Sigma-Aldrich, Německo)
- Mikrodestičkový spektrofotometr PowerWave XS (BioTek Instruments, USA)
- Mikrozkuřavky (Eppendorf, Německo)
- Podložka pro zobrazení gelů White Tray (Bio-Rad, USA)
- Předvážky (Ranwag, Česká republika)
- Třepačka (BioSan, Lotyšsko)
- Vortex V-1 plus (BioSan, Lotyšsko)
- Zdroj elektrického napětí pro elektroforézu PowerPac Basic (Bio-Rad, USA)

3.2. Metody

3.2.1. Stanovení koncentrace proteinů v hemolymfě Bradfordovou metodou

Koncentrace celkových proteinů ve vzorcích hemolymfy včely medonosné byla stanovena Bradfordovou metodou. Principem metody je určení neznámé koncentrace proteinů ve vzorku na základě rovnice lineární regrese, která vyplývá z kalibrační přímky. Kalibrační přímka je dána poměrem absorbancí A_{590}/A_{450} a známých koncentrací proteinových standardů (BSA). V této metodě se využívá vazba barviva Coomassie brilliant blue G-250 na protein. Po přidání CBB G-250 je koncentrace standardu přímo úměrná intenzitě modrého zbarvení roztoku. Absorpční maximum tohoto roztoku (komplex CBB G-250 a protein) je při 595 nm. Při měření poměru absorbancí A_{590}/A_{450} jde o linearizaci metody, díky které je stanovení koncentrace přesnější (Bradford, 1976; Zor & Selinger, 1996).

Nejprve byl připraven pracovní roztok Bradfordova činidla a zásobní roztok BSA. Pro roztok Bradfordova činidla byl naředěn zásobní roztok Coomassie Blue pomocí ddH₂O v poměru 1:4. Zásobní roztok BSA o koncentraci 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 1 mg BSA v 1 ml ddH₂O. Z tohoto roztoku byly připravené standardy kalibrační řady BSA o koncentracích 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 a 800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Do jamek v 96 jamkové mikrotitrační destičce bylo postupně napipetováno 45 μl ddH₂O, 5 μl standardu kalibrační křivky nebo 20x naředěného vzorku hemolymfy a 200 μl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Vše bylo pipetováno po řádcích v triplikátu. Jako blank bylo použito 50 μl ddH₂O a 200 μl pracovního roztoku Bradfordova činidla.

Před vlastním měřením byla destička přikrytá víčkem a nechala se 5 minut inkubovat kvůli vyvinutí zbarvení. Absorbance byla změřena na spektrofotometrickém readeru Synergy H1 při vlnové délce 450 a 590 nm. Data byla zobrazena v programu Gene5 3.06 (Biotek, USA).

Jelikož měření každého vzorku probíhalo v triplikátu, z hodnot absorbance byla vypočítána průměrná hodnota. Ta byla dosazena do grafu kalibrační závislosti a použita pro výpočet celkových proteinů ve vzorku hemolymfy. Absorbance byla stanovena jako poměr vlnových délek A_{590}/A_{450} .

3.2.2. Zastoupení proteinů v hemolymfě včely medonosné

Pro získání ucelených informací týkajících se proteinů v hemolymfě včely medonosné, byly nejprve zjištěny a názvy konkrétních proteinů (Isani et al., 2023; Erban et al., 2013; Takeda & Tufail, 2012). Názvy byly zadány do vyhledávače UniProt databáze dostupné na odkaze: <https://www.uniprot.org> (6. 4. 2024). Výsledky byly filtrovány pro organismus včely medonosné (*Apis mellifera*). Z databáze bylo zjištěno tzv. UniProt číslo, které bylo zadáno do webového zdroje Expasy, konkrétně do řádku pro určení teoretické molekulové hmotnosti a izoelektrického bodu, dostupné na odkaze: https://web.expasy.org/compute_pi/ (6. 4. 2024).

3.2.3. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE)

Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti detergentu dodecylsírany sodného je metoda, která slouží k separaci, identifikaci polypeptidových řetězců a zjištění zdánlivé molekulové hmotnosti (MW) proteinů a jejich podjednotek. MW lze takto určit z migrační vzdálenosti proteinu, který se v polyakrylamidovém gelu separuje (Shapiro et al., 1967).

3.2.3.1. Příprava vzorků

Nejprve byly vzorky hemolymfy ředěny ve vodě tak, aby po aplikaci 10 µl vzorku do jamky v polyakrylamidovém gelu bylo v jamce celkové množství 3 µg nebo 15 µg proteinů. Pro ředění 3 µg/jamka byl celkový objem ředěné hemolymfy 100 µl. Pro ředění 15 µg/jamka byl celkový objem ředěné hemolymfy 20 µl. Ke vzorku ředěné hemolymfy byl přidán stejný objem 2x vzorkovacího pufru dle Laemmliho (100 µl ředěné hemolymfy + 100 µl vzorkovacího pufru / 20 µl ředěné hemolymfy + 20 µl vzorkovacího pufru). Takto připravený vzorek byl promíchán na vortexu a zahříván v inkubátoru při 95 °C po dobu 5 minut. Následně byl vzorek ochlazen v ledové lázni a centrifugován na stolní centrifuze po dobu 1 minuty.

3.2.3.2. Postup přípravy gelů a průběh elektroforézy

Skla pro přípravu gelů byla důkladně odmaštěna pomocí ethanolu. Skla byla umístěna do držáku pro přípravu gelů, mezi skla byly vloženy plastové hřebínky a pomocí popisovače byla vyznačena vzdálenost 1 cm od konce zubů hřebínku. Poté byly hřebínky odstraněny.

Do dvou označených kádinek byly připraveny roztoky na dělicí a zaostřovací gel napipetováním jednotlivých komponentů kromě APS dle následující tabulky (Tab. 2).

Tab. 2: Složení dělicího a zaostřovacího gelu. Objemy jsou uvedené v ml.

Typ gelu	dd H ₂ O	AA/Bis	1,5 M Tris/HCl	0,5 M Tris/HCl	10% SDS	TEMED	APS
10% dělicí	4,1	3,3	2,5	-	0,1 ml	0,01	0,1
4% zaostřovací	3,05	0,65	-	1,25	0,05 ml	0,01	0,1

Přidáním čerstvě připraveného roztoku APS v objemu 0,1 ml do kádinky pro dělicí gel byla zahájena polymerizační reakce. Připravený gel byl po promíchání na magnetické míchačce Big Squid (IKA, Německo) rychle přenesen pomocí Pasteurovy pipety do prostoru mezi skla. Na povrch gelu byla nanesená tenká vrstva *n*-butanolu. Po zatuhnutí dělicího gelu (cca 30 min) byla vrstva *n*-butanolu odstraněna, povrch gelu byl opláchnut destilovanou vodou ze stříčky a vysušen filtračním papírem. Stejným způsobem byl připraven zaostřovací gel, kterým byl převrstven ztuhlý dělicí gel. Do zaostřovacího gelu byl ihned vložený 10 jamkový hřebínek a gel opět přibližně 30 min tuhnul.

Skla s připravenými gely byla vložena do elektroforetické komůrky a mezi skla byl nalit elektrodotový pufr tak, aby přetekl do jamek gelu. Jamky byly propláchnuty a byly do nich nanесeny vzorky. Do jamek č. 1 a č. 10 byly automatickou pipetou aplikovány 3 μl proteinového markeru (SigmaMarker™ wide range 6500-200 000 Da, Merck, USA). Do všech ostatních jamek bylo pipetováno 10 μl vzorku (vzorky s obsahem 3 ug/jamka i 15 ug/jamka).

Do prostoru elektroforetické vany byl nalit elektrodotový pufr a celá komora byla uzavřena víkem. Aparatura byla umístěna do ledničky a přes víko napojena na zdroj konstantního napětí o hodnotě 100 V. Jakmile doputovala zóna bromfenolové modři, která byla obsažena ve vzorkovacím puffru, na rozhraní zaostřovacího a dělicího gelu, bylo na zdroji zvýšeno konstantní napětí na hodnotu 200 V. Po zhruba hodině doputovala zóna bromfenolové modři až téměř na konec dolního okraje skel. V tento okamžik byl zdroj napětí vypnut a aparatura od něj byla odpojena. Elektrodotový pufr byl vylit a od skel byly pomocí plastové špachtle odstraněny gely. Zaostřovací gel byl odstraněn do odpadu.

Dělicí gel byl přemístěn do plastové krabičky, kde byl promyt destilovanou vodou. Dále byl k němu přidán fixační roztok na 30 min. Po dobu fixace byl gel umístěn na

třepačku. Po fixaci byl fixační roztok odstraněn a gel byl promyt destilovanou vodou. Následovalo barvení pomocí koloidního roztoku CBB G-250. Gel byl barven 1,5 hodiny v krabici umístěné na třepačce (12 rpm). Barvicí roztok byl odstraněn a gely byly umístěny do odbarvovacího roztoku na 30 minut. Dokumentace gelů proběhla pomocí přístroje Gel Doc EZ Imager a následně zpracována ve formě fotografií v programu Image Lab. Dále byl pro zpracování výsledků využit program Image J.

Stejný postup popsany výše byl proveden i na komerčním gelu s gradientem (4-20%, Bio-Rad, USA), kdy byly analyzovány všechny vzorky (vzorky s obsahem 3 ug/jamka i 15 ug/jamka). Bylo vždy aplikováno 10 ul vzorku, po zapojení elektroforetické aparatury na zdroj elektrického napětí probíhala elektroforéza při napětí 200 v 40 minut. Dále byl postup stejný jako u připravovaných gelů.

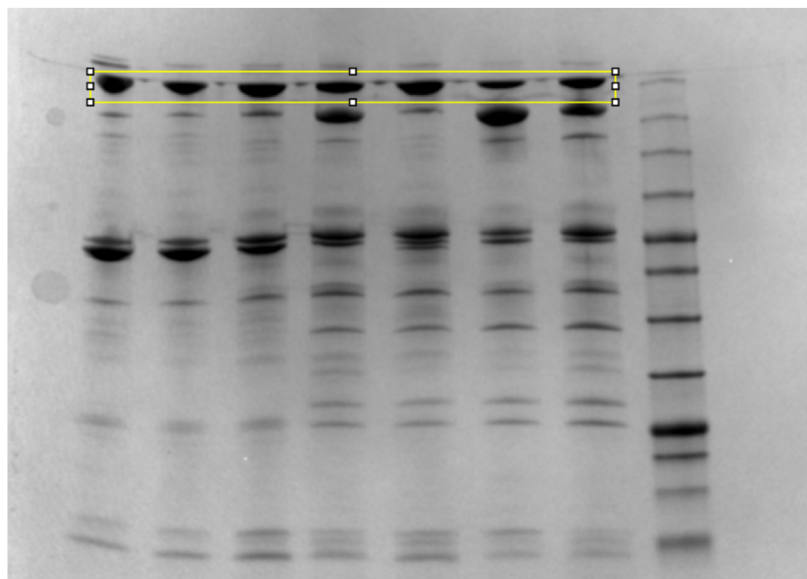
3.2.4. Software Image J

Pro analýzu obrázků gelů byl použit program Image J, který umožňuje měřit hustotu a intenzitu bandů.

Nejprve byl do programu nahrán obrázek v souboru tif. Dále bylo provedeno převedení obrázku do 8-bit formátu a do formátu s černým pozadím. Následovala korekce pozadí, která umožnila zviditelnění a přesnější určování bandů. Pomocí funkce „rectangle“ byla vybrána horizontální linka jednotlivého proteinu (Obr. 8), která byla analyzována pomocí funkce „plot lanes“. Tato funkce vygenerovala profily jednotlivých bandů.

Dále byla použita funkce „straight“, díky které byly označeny jednotlivé píky. Plocha píků byla změřena pomocí funkce „wand“. Použitím funkce „label peaks“ bylo získáno označení daného píku, jeho velikost a jeho velikost v procentech.

Získaná data byla převedena do MS Excel, kde byl proveden výpočet relativní hodnoty. Relativní hodnota byla vypočítána vždy v rámci jedné horizontální linie. První získaná hodnota (v %) byla použita jako „ukazatel“, kterým byly vyděleny všechny ostatní hodnoty (v %) dané linie. Tím bylo vypočítáno relativní množství stejného proteinu pro každý vzorek.

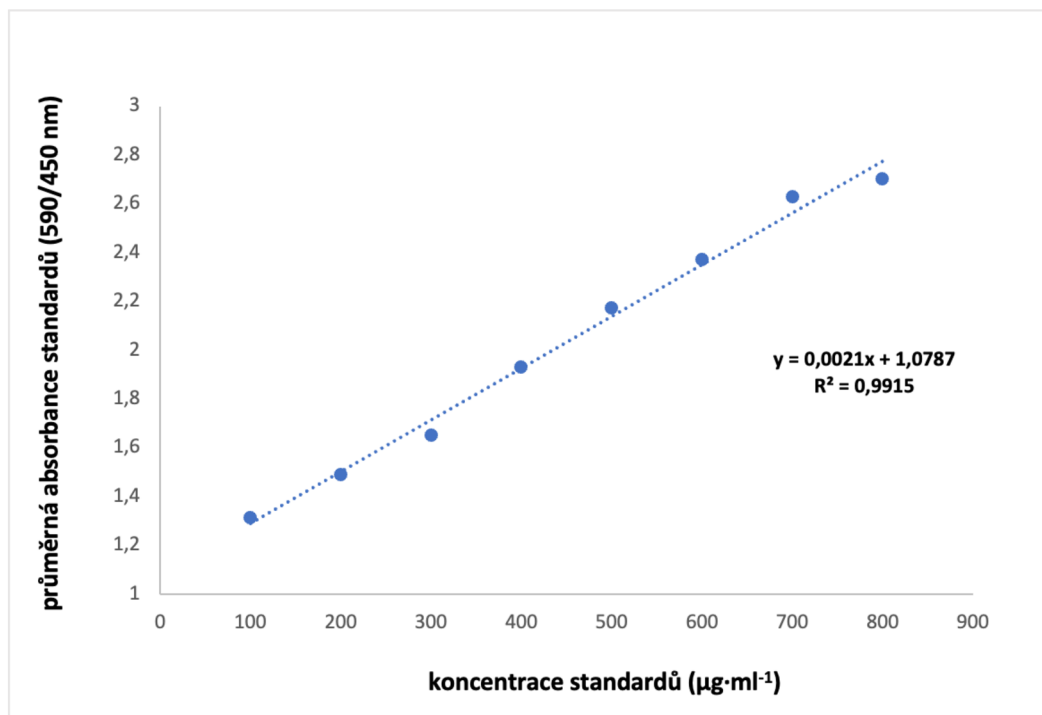


Obr. 8: Ukázka výběru horizontální linie daného proteinu (vyznačeno žlutě) v programu Image J pomocí funkce „rectangle“.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1. Stanovení koncentrace proteinů Bradfordovou metodou

Dle rovnice lineární regrese, která vyplývá z grafu kalibrační přímky standardů (koncentrace 100–800 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Obr. 9) byla stanovena koncentrace celkových proteinů ve vzorcích hemolymfy včely medonosné.

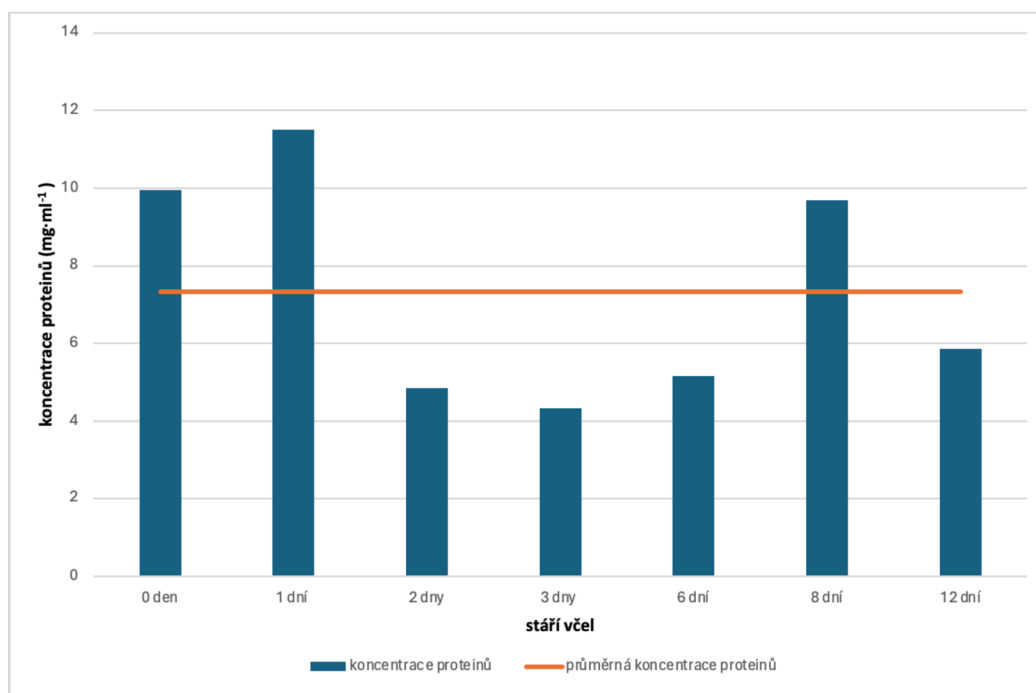


Obr. 9: Kalibrační přímka standardů závislosti poměru průměrné hodnoty absorbance a koncentrace.

Z rovnice lineární regrese byl stanoven obsah proteinů ve vzorcích včelí hemolymfy (Tab. 3). Množství proteinů ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) detekované ve včelách různého stáří je znázorněno graficky na Obr. 10.

Tab. 3: Průměrná absorbance a obsah proteinů ve vzorku hemolymfy stanovený na základě rovnice lineární regrese standardů BSA. Obsah proteinů je uveden v $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Označení vzorku	Průměrná absorbance	Směrodatná odchylka	Obsah proteinů (neřaděno)
1	2,12	0,04	9949,31
2	2,28	0,18	11511,33
3	1,58	0,07	4847,17
4	1,53	0,09	4332,91
5	1,61	0,12	5144,62
6	2,09	0,06	9693,74
7	1,69	0,03	5864,38



Obr. 10: Celková koncentrace proteinů ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) ve vzorcích hemolymfy včely medonosné pro různě staré včely 0-12 dní ($n=3$). Průměrná koncentrace ve všech vzorcích hemolymfy včely medonosné ($7,33 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) je znázorněna oranžovou přímkou.

Průměrná naměřená koncentrace veškerých proteinů ve všech vzorcích hemolymfy včely medonosné činila $7,33 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Nejnížší koncentrace $4,33 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla naměřena u vzorku č. 4 (stáří 3 dny). Nejvyšší koncentrace $11,51 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byla naměřena u vzorku č. 2 (stáří 1 den). Na Obr. 10 můžeme pozorovat nejprve vyšší hladiny koncentrace

proteinů (stáří 0 a 1 den), dále došlo ke snížení hladiny koncentrace (2 dny, 3 dny a 6 dní), nakonec došlo opět k růstu koncentrace proteinů (8 dní).

Kunc et al. (2019) ve své studii uvádějí, že se hladina proteinů u generace zimních včel pohybovala okolo $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. U letní generace včel to bylo okolo $30 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tento fakt potvrzuje i Isani et al. (2023), kde se hladina celkových proteinů u zimních včel pohybovala taktéž okolo $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Laboratorní včely použité v rámci této studie byly chovány v podzimním období, koncentrace proteinů by tedy měla odpovídat průměrné koncentraci proteinů uváděné pro zimní včely ($50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Průměrná koncentrace proteinů stanovená v této studii však byla téměř $5\times$ nižší než ve výše zmíněných studiích. Celkové množství proteinů ve vzorcích mohlo být nižší proto, že včely, ze kterých byla odebrána hemolymfa, byly chované v laboratorních podmínkách a krmeny pylovou náhražkou. Tím, že se včely neúčastnily přirozených potravních letů, během kterých sbírají pyl s rozličným aminokyselinovým složením nemusely mít vhodnou stravu pro biosyntézu proteinů. To, že umístění včel v přírodě ovlivňuje koncentraci proteinů v hemolymfě popisují i Isani et al. (2023), kde byla koncentrace proteinů v hemolymfě výrazně zvýšena v měsíci květnu právě na včelnicích umístěných v oblasti s vyšším počtem rostlin v okolí.

4.2. Zastoupení proteinů v hemolymfě včely medonosné

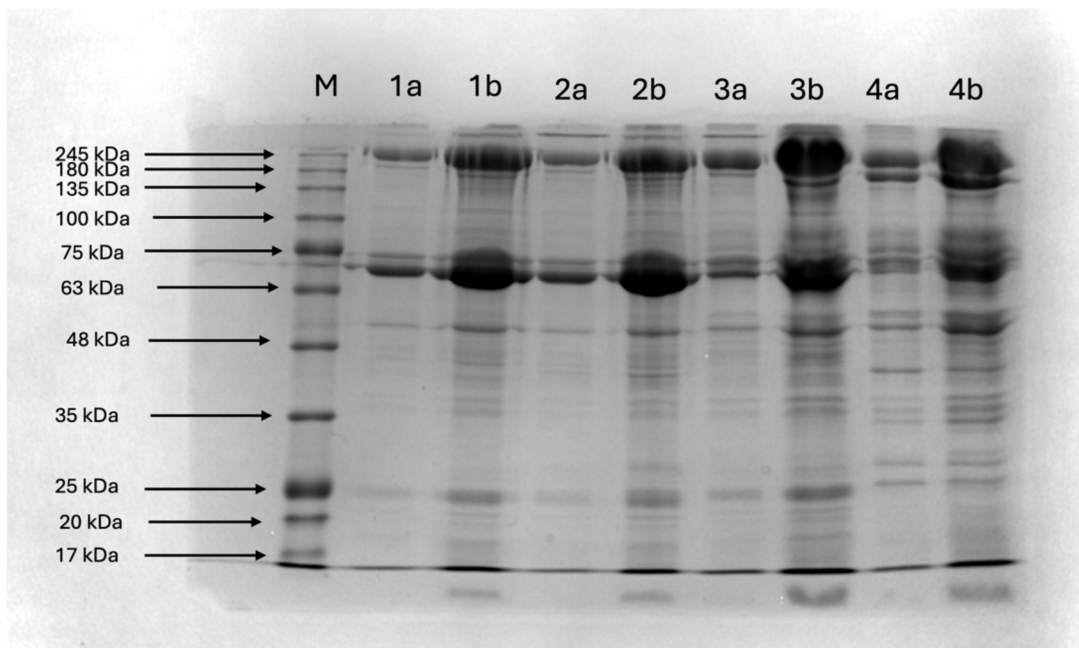
Zjištěné informace (název proteinu, UniProt číslo, teoretické hodnoty pro izoelektrický bod a molekulová hmotnost) pomocí UniProt databáze a Expasy zdroje konkrétních proteinů dříve popsaných jako vyskytujících se v hemolymfě včely medonosné (Isani et al., 2023; Erban et al., 2013 Takeda & Tufail, 2012) jsou uvedeny v Tab. 4. Celkem bylo teoreticky zpracováno 19 proteinů.

Tab. 4: Teoretické informace o proteinech, které byly dosud detekovány v hemolymfě včely medonosné.

Název proteinu	Uniprot číslo	pI	MW (kDa)
Abaecin	P15450	10.45	3,879
Apidaecin	Q8WSY8	10.95	23,176
Apolipophoriny	A0A7M7SQ18	8.64	374,247
Apolipophorin-III	A0A8U1C068	5.45	19,447
Defensin 1	Q5J8R1	8.64	5,535
Defensin 2	Q5MQL3	8.27	9,782
Fenoloxidasa (podjednotka A3)	Q86MV4	6.21	80,094
α -glukosidasa	Q17058	5.05	63,759
Chitinase-like protein Idgf4 isoform X2	A0A7M7M4R3	7,25	48,741
Hexamerin 70a	A0A8U0WQF3	6.45	79,192
Hexamerin 110	A7XZB1	6.37	110,21
Hymenoptaecin	Q10416	9.85	10,286
MRJP1	O18330	5.03	46,860
MRJP2	O77061	6.65	49,191
MRJP3	Q17060	6.50	59,486
MRJP4	Q17061	5.82	51,238
MRJP5	O97432	5.95	68,432
Odorant binding protein	Q9BMB3	6.36	14,112
Transferin	Q86PH6	6.59	75,688
Vitellogenin	Q868N5	6.29	199,405

4.3. Separace proteinů v hemolymfě včely medonosné metodou SDS-PAGE

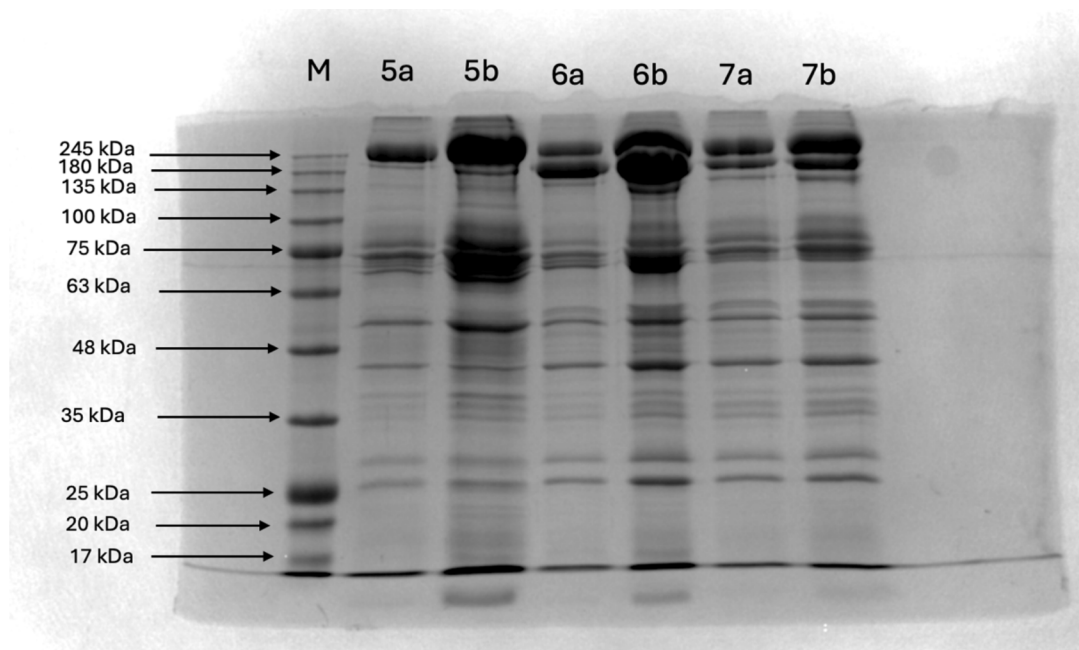
Výsledky popisující proteinový profil hemolymfy včely medonosné při aplikaci 15 μg proteinů na jamku a 3 μg proteinů na jamku pro včely staré 0-3 dny jsou zobrazeny na Obr. 11 a na Obr. 12 pro včely staré 6-12 dní.



Obr. 11: Proteinový profil ve vzorcích ředěné hemolymfy detekovaný metodou SDS-PAGE s použitím 10% dělicího gelu a 4% zaostřovacího gelu. Barveno koloidním CBB G-250. M – marker. 1a – včela stáří 0 dní (3 μg proteinů/jamka); 1b – včela stáří 0 dní (15 μg proteinů/jamka); 2a – včela stáří 1 den (3 μg proteinů/jamka); 2b – včela stáří 1 den (15 μg proteinů /jamka); 3a – včela stáří 2 dny (3 μg proteinů/jamka); 3b – včela stáří 2 dny (15 μg proteinů/jamka); 4a – včela stáří 3 dny (3 μg proteinů/jamka); 4b – včela stáří 3 dny (15 μg proteinů/jamka).

Dle Obr. 11 došlo k rozdělení vzorků na jednotlivé proteiny. Ve vertikálních liniích s aplikovanými 3 μg došlo k lepšímu rozdělení než v liniích s aplikovanými 15 μg , kde byly jednotlivé bandy rozostřené a hůře identifikovatelné.

Ve všech vzorcích došlo k rozdělení na podobné bandy, u vzorků č. 3 (stáří 2 dny) a č. 4 (stáří 3 dny) lze pozorovat intenzivnější a silnější bandy v oblasti okolo 245 kDa. Ve vzorcích č. 1 a č. 2 lze pozorovat naopak silnější bandy v oblasti okolo 70 kDa. Obecně lze lepší rozdělení pozorovat u vzorků č. 3. a 4.

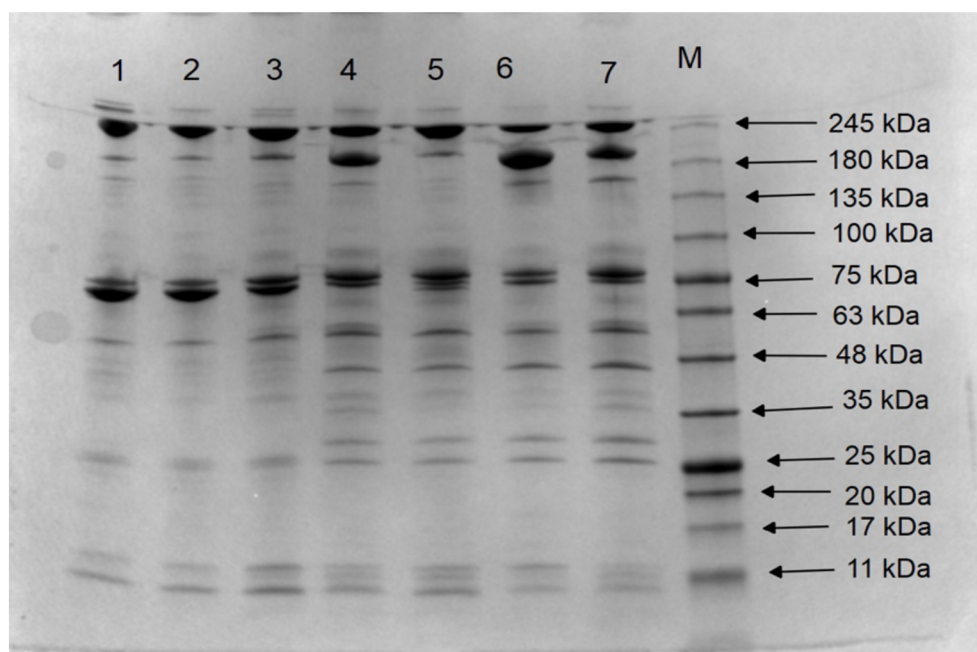


Obr. 12: Proteinový profil ve vzorcích ředěné hemolymfy detekovaný metodou SDS-PAGE s použitím 10% dělicího gelu a 4% zaostřovacího gelu. Barveno koloidním CBB G-250. M – marker. 5a – včela stáří 6 dní (3 μg proteinů/jamka); 5b – včela stáří 6 dní (15 μg proteinů/jamka); 6a – včela stáří 8 dní (3 μg proteinů/jamka); 6b – včela stáří 8 dní (15 μg proteinů /jamka); 7a – včela stáří 12 dní (3 μg proteinů/jamka); 7b – včela stáří 12 dní (15 μg proteinů/jamka).

Na Obr. 12 došlo k rozdělení proteinů na jednotlivé bandy ve všech vzorcích podobně. Jednoznačně nejintenzivnější bandy byly viditelné u vzorku č. 5, lze tedy usoudit, že vzorek č. 5 obsahoval největší množství proteinů. U vzorku č. 6 lze ale ve srovnání se vzorkem č. 5 vyšší obsah proteinu o MW 180 kDa, který pravděpodobně odpovídá proteinu vitellogeninu. U vzorku č. 7 lze pozorovat výrazný pokles celkových proteinů, protein o MW 180 kDa se ale stále vyskytoval ve vyšší koncentraci u vzorku č. 7 než u vzorku č. 5. Pro další analýzy bylo na gely nanášeno 3 μg proteinů na jamku, a to z důvodu lepšího rozdělení vzorků.

4.4. Separace proteinů v hemolymfě včely medonosné na komerčním gradientovém gelu

Dále byl pro elektroforetickou separaci využit komerční gel Mini-PROTEAN TGX s gradientem 4-20% (Bio-Rad, USA) (Obr. 13). Na gel byly nanášeny vzorky (1-7, viz Tab. 1) vždy v koncentraci 3 μg proteinů/jamka, jelikož docházelo dle předchozí analýzy na připravovaném gelu k lepší a rozlišitelnější separaci právě při nižším množství proteinů. Komerční gel byl, byl dále podroben analýze pomocí programu ImageJ a MALDI-TOF analýze pro potvrzení predikovaného zastoupení (viz kap 4.2.).



Obr. 13: Rozdělení proteinů ve vzorcích ředěné hemolymfy metodou SDS-PAGE s použitím komerčního gradientového gelu (4-20%). Barveno koloidním CBB G-250. M – marker. 1 – včela stáří 0 dní (3 μg proteinů/jamka); 2 – včela stáří 1 den (3 μg proteinů/jamka); 3 – včela stáří 2 dny (3 μg proteinů/jamka); 4 – včela stáří 3 dny (3 μg proteinů/jamka); 5 – včela stáří 6 dní (3 μg proteinů/jamka); 6 – včela stáří 8 dní (3 μg proteinů/jamka); 7 – včela stáří 12 dní (3 μg proteinů/jamka).

Ve většině jamek došlo k rozdělení na přibližně 15 bandů. Díky použití komerčního gelu bylo možné jednotlivé bandy lépe rozlišit ve srovnání s připravovanými gely, kde rozdělení tak přesné nebylo. Mezi jamkami lze pozorovat různé intenzity a změny v zastoupení daných proteinů. Dle vypracované Tab. 4 s teoretickými molekulovými hmotnostmi a literární rešerše na téma proteiny hemolymfy včely medonosné byly predikovány konkrétní proteiny na základě porovnání s markerem molekulové hmotnosti.

Ve všech jamkách byl identifikován band s přibližnou MW 245 kDa. Dle toho, že se je to protein s největší MW lze usuzovat, že se jedná o Apolipophoriny, které mají největší

MW ze všech dosud v hemolymfě popsaných proteinů. Hodnota odečtená z markeru, ale nesouhlasí s teoretickou MW (okolo 300 kDa). Lze předpokládat, že došlo k rozštěpení Apolipophorinu na jeho fragment ApoLp-I s odhadovanou MW 240 kDa. Všechny vzorky vykazovaly velké identifikovatelné bandy, kromě vzorku č. 6 (8 dní steré včely), kde byl band Apolipophorinu užší v porovnání s ostatními vzorky.

Druhý identifikovatelný band přítomný ve všech jamkách měl přibližnou MW 180 kDa. Pravděpodobně se jedná o fragment vitellogeninu, jehož množství byla nejvyšší u včel starých 3, 8 a 12 dní (vzorky č. 4, č. 6 a č. 7). U včel čerstvě vylíhlých a starých 1, 2 a 6 dní (vzorky č. 1, č. 2, č. 3 a č. 5) byl přítomen ale bandy byly mnohem užší a tím pádem vzorky obsahovaly tohoto fragmentu vitellogeninu méně. Jelikož se vitellogenin vyskytuje v typickém dvojitěm bandu jako fragment 180 kDa popsany více společně s fragmentem o MW 150 kDa, byl v těsné blízkosti 180 kDa fragmentu viditelný další band. Ten se podařilo identifikovat ve všech vzorcích, ale s vyšší intenzitou ve vzorcích, kde byla vyšší koncentrace fragmentu o MW 180 kDa (tedy vzorky č. 4, č. 6 a č. 7).

V jamkách č. 1 a č. 2 se oproti ostatním jamkám jednoznačně nevyskytoval protein s přibližnou MW 85 kDa. Jeho výskyt byl prokazatelný až od vzorku č. 3 (včely staré 2 dny). Dle uvedených MW v Tab. 4 lze předpokládat, že může být přítomna Fenoloxidasa (podjednotka A3), dle MW ale nelze jednoznačně identifikovat.

V pásu molekulové hmotnosti kolem 80 kDa došlo ve všech vzorcích k rozdělení proteinů na dva bandy, vyjma u včel starých 6 dnů (vzorek č. 5), kde došlo k rozdělení proteinů na bandy tři. V této oblasti by mohl být přítomen Hexamerin 70a a zároveň i Transferin, proto došlo nejspíše k rozdělení na dva odlišné bandy.

Další viditelná horizontální linka proteinů se pohybovala v oblasti okolo 55 kDa. Tento protein byl identifikován ve všech jamkách, ale u včel starých 4, 8 a 12 dní (vzorky č. 4, č. 6 a č. 7) byl doprovázen málo intenzivním bandem proteinu nad, který u ostatních vzorků nebyl pozorován. Teoreticky by se mohlo jednat o proteiny patřící do skupiny MRJPs.

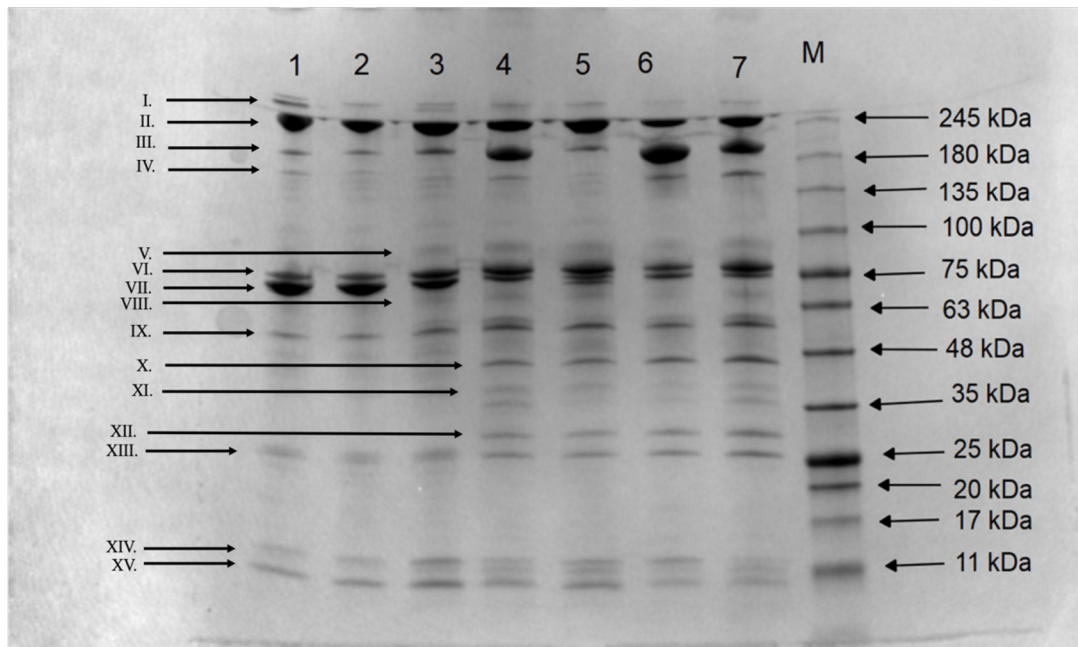
U včel starých 3, 6, 8 a 12 dní (vzorky č. 4, č. 5, č. 6 a č. 7) byly identifikovány proteiny o přibližné MW 30 kDa, které nebyly přítomny v ostatních vzorcích. Tento protein by mohl nejbližší odpovídat fragmentu III Apolipophorinu.

V oblasti MW 25 kDa - 11 kDa byly ve všech vzorcích identifikovány proteiny, které lze na základě znalostí přiřadit k antimikrobiálním peptidům nebo odorant binding proteinům.

(Isani et al., 2023) ve své studii prováděli proteinovou separaci pomocí SDS-PAGE na komerčním gradientovém gelu (4-12 %). Na gelu se jim separovalo zhruba 11 bandů. První band označili jako Apolipophoriny, jelikož měl největší MW, stejně jako v této studii. Další dva identifikované proteiny byli Vitellogeniny (fragment 180 kDa a 150 kDa). Na gelu se vyskytoval dvojitý band, který je typický pro Vitellogeniny a podařil se identifikovat i v této studii. V oblasti MW okolo 65 kDa byly separovány tři bandy proteinů, které byly označeny jako Hexamerin 70a, Transferin a ApoLp-III. Hexamerin 70a a Transferin byli identifikováni i v této studii. ApoLp-III má dle Tab. 4 teoretickou MW okolo 20 kDa, tudíž lze předpokládat jeho výskyt na gelu níže. Dále se na gelu vyskytovaly dva bandy s MW 50-60 kDa. Ty se vyskytovaly i v této studii a byly zařazeny mezi proteiny patřící do skupiny MRPJs. Dále už byly na gelu identifikovány pouze proteiny s malou MW (okolo 15 kDa), které byly označeny jako odorant binding proteiny. Tyto proteiny byly identifikovány i v této studii. Obecně lze říci, že byly ve studii (Isani et al., 2023) rozděleny proteiny na jednotlivé bandy velmi podobně, jako v této studii. Avšak v této studii byly separovány ještě 4 bandy navíc.

4.5. Analýza bandů pomocí softwaru Image J a MALDI analýza

Použití softwaru Image J umožnilo identifikovat 15 bandů a tím tedy 15 proteinů. Výsledky z této analýzy jsou uvedeny v Tab. 5. Obrázek komerčního gelu s vyznačenými analyzovanými horizontálními liniemi je zaznamenán na Obr. 14.



Obr. 14: Obrázek komerčního gelu (Obr. 13) s vyznačenými horizontálními liniemi (římské číslice), které byly použity pro analýzu v softwaru Image J.

Software Image J jako konečná data poskytl procentuální zastoupení proteinu v daném bandu. Čím vyšší hodnoty číslo dosahovalo, tím více proteinu bylo v dané jamce přítomno. Pro lepší orientaci mezi čísly byl pak proveden přepočít na relativní hustotu, kde platila stejná úměra – čím vyšší hodnota čísla, tím vyšší zastoupení proteinu.

Pro ověření identifikace proteinů byl gel na komerčním gradientu podroben analýze pomocí metody MALDI-TOF na oddělení proteinů a proteomiky katedry biochemie prof. Mgr. Markem Šebelou, Dr. Analyzované bandy gelu jsou vyznačeny na Obr. 15, výsledky z analýzy MALDI-TOF jsou zaznamenány v Tab. 6.

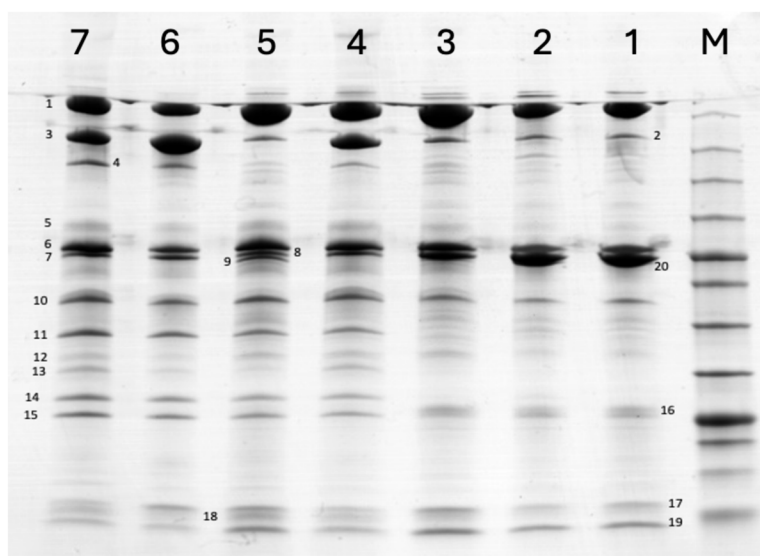
Tab 5: Výsledky analýzy pomocí softwaru Image J. Římské číslice – označení horizontální linky zdroje dat na Obr. 14. % - procentuální množství proteinu v rámci horizontální linie na gelu. RD – relativní hustota (z angl. relative density). Modré označení – nejvyšší relativní množství, oranžové označení – nejnižší množství.

Označení	Odhadovaná velikost proteinu		Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Vzorek 4	Vzorek 5	Vzorek 6	Vzorek 7
I.	>245 kDa	%	22,85	7,90	12,56	19,73	14,65	8,51	13,81
		RD	1,00	0,35	0,55	0,86	0,64	0,37	0,60
II.	245 kDa	%	15,91	13,97	15,48	14,41	15,67	10,45	14,13
		RD	1,00	0,88	0,97	0,91	0,99	0,66	0,89
III.	180 kDa	%	3,91	5,09	10,28	20,68	7,41	31,57	21,06
		RD	1,00	1,30	2,63	5,29	1,89	8,07	5,39
IV.	150 kDa	%	8,28	6,30	9,80	13,76	7,40	29,77	24,70
		RD	1,00	0,76	1,18	1,66	0,89	3,59	2,98
V.	85 kDa	%	-	-	13,09	20,01	25,17	15,57	26,16
		RD	-	-	1,00	1,53	1,92	1,19	2,00
VI.	79 kDa	%	33,57	27,34	39,09	22,32	29,73	22,21	25,75
		RD	1,00	0,81	1,16	0,64	0,88	0,66	0,77
VII.	75 kDa	%	38,52	35,16	26,33	26,88	29,50	19,8	23,82
		RD	1,00	0,91	0,68	0,70	0,77	0,51	0,62
VIII.	60 kDa	%	-	-	10,93	20,66	19,69	16,97	31,75
		RD	-	-	1,00	1,89	1,80	1,55	2,9
IX.	55 kDa	%	6,57	8,46	14,45	19,11	18,23	14,57	18,6
		RD	1,00	1,29	2,20	2,91	2,77	2,22	2,83
X.	45 kDa	%	-	-	-	21,30	24,00	22,39	32,31
		RD	-	-	-	1,00	1,13	1,05	1,52
XI.	36 kDa	%	-	-	-	27,81	21,20	17,23	33,77
		RD	-	-	-	1,00	0,76	0,62	1,21
XII.	30 kDa	%	-	-	-	22,24	20,60	20,90	36,26
		RD	-	-	-	1,00	0,92	0,93	1,63
XIII.	26 kDa	%	6,43	8,85	18,62	17,35	14,81	12,69	21,24
		RD	1,00	1,37	2,89	2,69	2,30	1,97	3,30
XIV.	11 kDa	%	6,04	4,61	19,75	14,79	19,61	15,13	20,08
		RD	1,00	0,76	3,27	2,45	3,24	2,50	3,32
XV.	<11 kDa	%	3,86	7,87	22,18	16,05	23,35	10,38	16,32
		RD	1,00	2,04	5,75	4,16	6,06	2,69	4,23

Obecně vyšší zastoupení proteinů vykazovaly včely starší. Většina nejzastoupenějších proteinů byla přítomna u včel starších 3 a více dní. Celkem 6 proteinů bylo u včel starých 12 dní (vzorek č. 7) stanovených jako nejzastoupenější. Vymykala se ale například skupina proteinů s MW větší než 245 kDa, MW 245 kDa a 75 kDa, kde bylo nejvyšší zastoupení daných proteinů u čerstvě vylíhlých včel (stáří 0 dní). Nejnižší zastoupení proteinů lze pozorovat u včel čerstvě vylíhlých (stáří 0 dní) až po včely staré dva dny, kde se nacházela většina proteinů s nejnižším zastoupením. Velmi se ale vymykají včely staré 8 dní (vzorek č. 6), kde bylo identifikováno 5 proteinů s nejnižším zastoupením.

První analyzovaná linie proteinu v software image J měla odhadovanou MW větší než 245 kDa. Protein měl nejvyšší zastoupení u čerstvě vylíhlých včel (0 dní; 28,87 %). Nejnižší zastoupení proteinu bylo u včel se stářím jednoho dne (7,9 %). MW druhého analyzovaného proteinu se pohybovala okolo 240 kDa. Protein byl v nejvyšším zastoupení u včel čerstvě vylíhlých (0 dní; 15,91 %), nejméně se vyskytoval u včel starých 8 dní (10,45 %). Třetí analyzovaný protein o MW 180 kDa byl přítomen ve všech vzorcích. Nejvíce zastoupený byl u včel starých 8 dní (31,57 %). Nejméně zastoupený byl u včel čerstvě vylíhlých (0 dní; 3,91 %). Další, čtvrtý, protein MW 150 kDa byl nejhojněji zastoupen u včel starých 8 dní (29,77 %) a nejméně u včel starých 1 den (6,30 %). To téměř kopíruje zastoupení proteinu v analyzované linii III. Protein o MW okolo 85 kDa byl identifikován pouze u vzorků starších dvou dnů včetně. Nejvyšší zastoupení měl u včel starých 12 dní (26,16 %), nejnižší zastoupení měl u včel starých právě dva dny (13,09 %). Šestý protein s MW přibližně 79 kDa byl identifikován ve všech vzorcích. Největší množství proteinu bylo přítomno u včel se stářím dva dny (39,09 %). Opačně tomu bylo u včel se stářím 6 dní (22,21 %). V sedmé horizontální linii byl přítomen protein s MW okolo 75 kDa, Nejvyšší množství tohoto proteinu bylo u včel čerstvě vylíhlých (0 dní; 38,52 %). Nejméně proteinu obsahovaly včely staré 8 dní (19,8 %). Osmý protein byl zastoupen pouze u včel starých dva dny a více včetně. MW proteinu je 60 kDa. Největší množství proteinu bylo přítomno u včel starých 12 dní (31,75 %). Naopak nejmenší množství proteinu bylo přítomno u včel se stářím 8 dní (16,97 %). Protein v pořadí devátý s odhadovanou MW 55 kDa byl nejvíce zastoupen u včel starých 3 dny (19,11 %). Nejnižší množství proteinu vykazovaly čerstvě vylíhlé včely (0 dní; 6,57 %). Desátý protein byl zastoupen pouze u vzorků včel starých 3 dny a starších včetně. Protein s přibližnou MW 45 kDa byl v nejhojnějším množství u včel starých 12 dní, v nejnižším množství u včel starých 3 dny, tedy v prvním identifikovaném vzorku.

Stejně jako předchozí byl další protein identifikován pouze u vzorků se stářím 3 dny a starších. Protein měl přibližnou MW 36 kDa a jeho nejvyšší hladina byla stanovena ve vzorku včel starých 12 dní (33,77 %). Nejnižší množství proteinu bylo stanoveno ve vzorku včely staré 8 dní (17,23 %). Protein o MW 30 kDa byl identifikován stejně jako dva předchozí proteiny u včel starých 3 dny a starších. Nejvyšší množství proteinu bylo stanoveno ve vzorku včel starých 12 dní (36,26 %). Nejnižší množství proteinu bylo stanoveno ve vzorku včel starých dní 6 (20,6 %). Třináctý protein identifikován znovu u všech vzorků včely medonosné. Nejhojněji byl zastoupen u vzorku včel starých dvanáct dní (21,24 %). Nejnižší množství bylo zjištěno ve vzorku včel čerstvě vylíhlých (0 dní; 6,43 %). Předposlední protein, který měl MW okolo 11 kDa byl nejvíce zastoupen ve vzorku včel starých 12 dní (20,08 %). Nejméně ve vzorku včel starých 1 den (4,61 %). Poslední, patnáctý protein s MW menší než 11 kDa byl identifikovaný ve všech vzorcích včel. Nejvyšší množství tohoto proteinu bylo identifikováno ve vzorku včel starých 8 dní (23,35 %). Nejnižší množství vzorku bylo přítomno u včel čerstvě vylíhlých (0 dní; 3,86 %).



Obr. 15: Vybrané bandy pro analýzu pomocí MALDI TOF. Rozdělení proteinů ve vzorcích ředěné hemolymfy metodou SDS-PAGE s použitím komerčního gradientového gelu (4-20%). Barveno koloidním CBB G-250. M – marker. 1 – včela stáří 0 dní (3 µg proteinů/jamka); 2 – včela stáří 1 den (3 µg proteinů/jamka); 3 – včela stáří 2 dny (3 µg proteinů/jamka); 4 – včela stáří 3 dny (3 µg proteinů/jamka); 5 – včela stáří 6 dní (3 µg proteinů/jamka); 6 – včela stáří 8 dní (3 µg proteinů/jamka); 7 – včela stáří 12 dní (3 µg proteinů/jamka).

Tab. 6: Výsledky analýzy MALDI TOF. SV (skóre vyhledávání) > 100 (jednoznačná identifikace, zelená barva), SV > 70 (dostačující skóre identifikace, fialová barva), SV < 70 (nízké skóre identifikace, černá).

Označený pás na gelu	Název proteinu (angl.)	Uniprot číslo	SV	Teoretická MW (kDa)
1	Apolipoporphins	A0A7M7SQ18_APIME	311	376,809
2	Vitellogenin	VIT_APIME	88	201,048
3	Vitellogenin	VIT_APIME	226	201,048
4	Vitellogenin	VIT_APIME	89	201,048
5	Alpha-glucosidase	Q25BT7_APIME	71	66,568
5	Protein PFC0760c isoform X1	A0A7M7ML16_APIME	59,6	56,422
6	Apolipoporphins	A0A7M7SQ18_APIME	126	376,809
6	Protein artichoke	A0A7M7IGY7_APIME	48	75,705
7	Hexamerin	A5YVK7_APIME	143	81,460
7	Transferrin	Q86PH6_APIME	65	78,657
8	Transferrin	Q86PH6_APIME	96	78,657
8	Hexamerin	A5YVK7_APIME	75	81,460
9	Phenoloxidase subunit A3	Q86MV4_APIME	214	80,094
9	Protein furry isoform X6	A0A7M7MLB1_APIME	55	356,123
10	Chitinase-like protein Idgf4 isoform X2	A0A7M7M4R3_APIME	100	48,741
10	Phenoloxidase subunit A3	Q86MV4_APIME	98	80,094
11	Cleavage stimulation factor subunit 2 isoform X1	A0A7M7R7F2_APIME	49,2	48,137
12	Xaa-Pro aminopeptidase ApepP isoform X3	A0A7M7L8X4_APIME	58,3	73,441
13	IRP30	A0A7M7RA20_APIME	60	30,421
14	Cytochrome c, testis-specific-like Eukaryotic	A0A7M7FYZ8_APIME	56	11,565
15	translation initiation factor 5B	A0A7M7GQQ5_APIME	58,4	119,181
16	Ferritin	A0A7M7MU23_APIME	59	25,603
16	Ferritin	A0A7M7R7Z9_APIME	54	25,186
17	Odorant-binding protein 14 precursor	A0A8U0WQC3_APIME	63,2	15,201
18	Odorant-binding protein 14 precursor	A0A8U0WQC3_APIME	62	15,201
19	OBP 13	A0A7M6UMJ2_APIME	57	15,105
20	Hexamerin	A5YVK7_APIME	211	81,460

Pomocí MALDI analýzy byl se skórem vyšší, než sto identifikováno 7 bandů. Jednalo se o následující proteiny: Apolipophoriny (označení na Obr. 14 – I.), Vitellogenin (180 kDa; označení na Obr. 14 – II.), Hexamerin (označení na Obr. 14 – VII.), A3 podjednotka fenoloxidas (označení na Obr. 14 – VIII.) a „Chitinase-like protein Idgf4 isoform X2“ (označení na Obr. 14 – IX.)

Se skóre 70–100 byly identifikovány následující proteiny: Vitellogenin (150 kDa), α -glukosidasa, Transferin. Ostatní proteiny měly nižší skóre identifikovatelnosti, a tudíž je nelze jednoznačně určit.

Erban et al. (2016) stanovili pomocí MALDI TOF z gelů barvených CBB protein Idgf 4. Tento protein je považován za vývojový protein u larev, ale je přítomen i u celého životního cyklu včely medonosné, i přesto, že jsou jeho funkce neznámé. V analyzovaných vzorcích se tento protein podařilo identifikovat. Na komerčním gelu (Obr. 15) byl protein označen číslem 10 a můžeme ho pozorovat u všech vzorků. Tento protein se podařilo také identifikovat ve studii Isani et al. (2023). Na Obr. 14 byl tento protein identifikován v IX. linii a nejvíce byl zastoupen u včel starých 3 dny, nejnižší zastoupení bylo u včel čerstvě vylíhlých (stáří 0 dní).

Dalším identifikovaným proteinem v této studii byl Hexamerin. Měl vysoké skóre identifikovatelnosti a jeho MW se pohybovala okolo 75 kDa. Právě z MW můžeme usoudit, že se jednalo o Hexamerin 70a. Hexamerin 110 nebyl v hemolymfě, jak jsme již předpokládali identifikován, jelikož není z tukových tělísek do hemolymfy uvolňován. Ke stejným výsledkům došli i (Erban et al., 2016), kde pomocí analýzy objasňují že Hexameriny 110, 70b a 70c jsou nezbytné pouze pro včely ve stádiu larvy a kukly, zatímco Hexamerin 70a zůstává přítomen ve všech třech stádiích. Hexamerin 70a byl taktéž identifikován ve studii Isani et al. (2023), kteří také pozorovali nárůst tohoto proteinu u zimní generace včel. Na Obr. 14 byl Hexamerin identifikován v linii VII. Nejvyšší hladina Hexamerinu byla přítomna ve vzorcích včel čerstvě vylíhlých (stáří 0 dní). Nejnižší hladina byla přítomna u včel starých 8 dní.

Erban et al. (2016) identifikovali v hemolymfě včely medonosné protein zvaný Ferritin. Ten naopak nebyl identifikován v hemolymfě ve studii Isani et al. (2023). Isani et al. (2023) naopak identifikovali Transferin, který ve studii Erban et al. (2016) nebyl identifikován. Ve vzorcích č. 1 – č. 7 byly v této práci identifikovány jak Ferritiny, tak Transferiny. Ferritiny byly identifikovány jen s nízkou spolehlivostí, a proto by jejich přítomnost byla potřeba ověřit pomocí dalších metod (např. LC-MS). Transferin byl v rámci této studie v hemolymfě spolehlivě identifikován v těsné blízkosti Hexamerinu

70 a. Na Obr. 14 byl Ferritin identifikován v linii XIII. Nejvyšší hladina byla stanovena u včel starých 12 dní. Nejméně Ferritinu bylo přítomno u včel starých 1 den. Transferin byl na Obr. 14 identifikován v linii VI., nejvyšší množství proteinu bylo přítomno u včel starých 2 dny. Nejnižší množství proteinu bylo přítomno u včel starých 3 dny.

S poměrně nízkým skóre identifikovatelnosti byly v analyzovaných gelech přítomny odorant binding proteiny, konkrétně prekursor OBP-14. Na Obr. 14 byly identifikovány v linii XIV., v této linii byli nejvíce zastoupeny u včel se stářím 12. dní. Nejméně byly zastoupeny ve vzorcích včel starých 2 dny. Studie Erban et al. (2016) je prokázala v hemolymfě dělnic, kde byly hojně zastoupeny, a proto jsou považovány za důležité při jejich vývoji. Z výsledků této studie lze usoudit, že jsou odorant binding proteiny důležité, jelikož jejich množství v hemolymfě bylo poměrně velké (nejvíce kolem 23 %).

V hemolymfě včely medonosné byl identifikován také vitellogenin, a to konkrétně fragmenty: 180 kDa a 150 kDa. Fragment o MW 40 kDa nebyl identifikován. Ve stejném uspořádání byl přítomen také v hemolymfě ve studii Isani et al. (2023). Na Obr. 14 byl Vitellogenin identifikován v linii III a IV. Linie III patřila fragmentu o MW 180 kDa, jež byl nejhojněji zastoupen v hemolymfě včel starých 8 dní (31,57 %). Nejméně byl zastoupen v hemolymfě včel starých čerstvě vylíhlých (0 dní). Linie IV patřila fragmentu o MW 150 kDa, kdy bylo relativní zastoupení velmi podobné. Nejvyšší množství 150 kDa Vg bylo zastoupeno u včel starých 8 dní (29,77 %) a nejnižší množství u včel starých jeden den.

Erban et al. (2016) prokázali v hemolymfě včely medonosné Apolipoporphoriny, Apolipoporphorin III a protein vázající mastné kyseliny. Ve vzorcích č. 1 – č. 7 v této studii byly identifikovány Apolipoporphoriny bez rozdělení na ApoLp-I, ApoLp-II a ApoLp-III. Isani et al. (2023) jednotlivé fragmenty dle metody MALDI identifikovali, ApoLp-I v oblasti okolo 200 kDa, ApoLp-II v oblasti okolo 80 kDa a ApoLp-III v oblasti okolo 20 kDa.

V hemolymfě včely medonosné byly v rámci této práce dále identifikovány α -glukosidasa a podjednotka fenoloxidasy A3 stejně jako u Erban et al. (2013). Nepodařilo se ale identifikovat (GST), kterou Erban et al. (2013) identifikovali v oblasti 20 kDa.

Fenoloxidasa (podjednotka A3) je významný protein, který se v této studii podařilo identifikovat. Na Obr. 14 byl přítomen ve společné linii s Hexamerinem 70a. Fenoloxidasa byla identifikována také ve studii Erban et al. (2013), ti ji považují za důležitý protein u dlouhověké generace včel. To je potvrzeno i v této studii, kdy byla Fenoloxidasa hojně zastoupena ve všech vzorcích.

5. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se věnuje proteinům včely medonosné, jejich struktuře, funkci a zastoupení v hemolymfě včely medonosné. V teoretické části jsou shrnuty dosavadní poznatky právě o struktuře a funkcích jak nejzastoupenějších proteinů, tak u ostatních, méně prozkoumaných proteinů. Poslední kapitola literární rešerše je věnovaná zastoupení proteinů napříč vývojovými stádii včely medonosné.

V praktické části byla nejprve stanovena koncentrace celkových proteinů ve vzorcích hemolymfy včely medonosné. Z těchto údajů byly vypočítány hodnoty pro aplikaci vzorku na gel. Na gelu probírala separace hemolymfy pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Po optimalizaci množství vzorku (3 μg proteinů na jamku) byl využit komerční gel s gradientem, který byl po proběhnutí elektroforézy podroben analýze MALDI TOF.

V hemolymfě včely medonosné byly identifikovány čtyři hlavní proteiny: Hexamerin, Transferrin, Vitellogenin a Apolipoporphoriny, u kterých byla až na Apolipoporphoriny potvrzena predikovaná teoretická molekulová hmotnost. Proteiny byly přítomny ve všech vzorcích včely medonosné a mohou být tedy označeny jako klíčové pro správný vývoj a život tohoto hmyzu. Tím byly potvrzeny i předchozí studie zabývající se touto problematikou. Na komerčním gelu bylo identifikováno celkem 15 proteinů. Pomocí MALDI-TOF analýzy bylo s jednoznačným skóre identifikovatelností prokázáno 5 proteinů (Apolipoporphoriny, fragment Vitellogeninu 180 kDa, Hexamerin, A3 podjednotka fenoloxidasu a „Chitinase-like protein Idgf4 isoform X2“). S dostatečným skóre identifikovatelnosti byly prokázány 3 proteiny (fragment Vitellogeninu 150 kDa, Transferin a α – glukosidasa) a proteinů s nízkým skóre identifikovatelnosti bylo 11. Celkem bylo tedy pomocí MALDI-TOF analýzy identifikováno 20 proteinů. Zastoupení jednotlivých proteinů bylo relativně kvantifikováno pomocí softwaru Image. U každého proteinu byl určen vzorek s nejvyšším a nejnižším množstvím sledovaných proteinů. Obecně vyšší zastoupení proteinů vykazovaly včely starší. Většina nejzastoupenějších proteinů byla přítomna u včel starších 3 a více dní. Nejnižší zastoupení proteinů lze pozorovat u včel čerstvě vylíhlých (stáří 0 dní) až po včely staré dva dny, kde se nachází většina proteinů s nejnižším zastoupením.

Proteiny s nízkým skóre identifikovatelnosti, by do budoucna bylo dobré více prozkoumat a pospat jejich roli a vliv na organismus včely medonosné.

Pro ověření zastoupení proteinů s nízkým skóre identifikovatelnosti by bylo vhodné využít kapalinovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií (LC-MS), která by přesněji identifikovala jednotlivé proteiny.

Celkově by mohly být další práce zaměřeny na zkoumání hladiny a zastoupení proteinů u různě infikovaných včel, kdy by proteiny mohly sloužit jako markery včelích onemocnění.

6. LITERATURA

- Amdam, G. V., Ihle, K. E., & Page, R. E. (2009). Regulation of Honeybee Worker (*Apis mellifera*) Life Histories by Vitellogenin. *Hormones, Brain and Behavior*, 1003-1027. <https://doi.org/10.1016/B978-008088783-8.00029-2>
- Amdam, G. V., Norberg, K., Hagen, A., & Omholt, S. W. (2003). Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 1799-1802. <https://doi.org/10.1073/pnas.0333979100>
- Aurori, C. M., Buttstedt, A., Dezmirean, D. S., Mărghitaș, L. A., Moritz, R. F. A., & Erler, S. (2014). What Is the Main Driver of Ageing in Long-Lived Winter Honeybees: Antioxidant Enzymes, Innate Immunity, or Vitellogenin? *The Journals of Gerontology: Series A*, 69(6), 633-639. <https://doi.org/10.1093/gerona/glt134>
- Beintema, J. J., Stam, W. T., Hazes, B., & Smidt, M. P. (1994). Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins). *Molecular Biology and Evolution*, 11(3), 493-503. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040129>
- Berger, J., & Slavíčková, K. (2008). Morphological Characterization of Hemocytes in the Adult Linden Bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). *Zoological Studies*, 47(4), 466-472.
- Bitondi, M. M. G., Nascimento, A. M., Cunha, A. D., Guidugli, K. R., Nunes, F. M. F., & Simões, Z. L. P. (2006). Characterization and expression of the Hex 110 gene encoding a glutamine-rich hexamerin in the honey bee, *Apis mellifera*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 63(2), 57-72. <https://doi.org/10.1002/arch.20142>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cabbri, R., Ferlizza, E., Nanetti, A., Monari, E., G., Galuppi, R., & G. I. S. A. N. I. (2018). Biomarkers of nutritional status in honeybee hemolymph. *Apidologie*, 49(5), 606-618. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0588-9>
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., & Tempst, P. (1993). Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7044-7054. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53143-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53143-4)

- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Van Damme, J., Elicone, C., Fleming, M., Jacobs, F., & Tempst, P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*, *187*(2), 381-386. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15315.x>
- Castillo, J. C., Robertson, A. E., & Strand, M. R. (2006). Characterization of hemocytes from the mosquitoes *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *36*(12), 891-903. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.08.010>
- Crichton, R. R., Wilmet, S., Legssyer, R., & Ward, R. J. (2002). Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *91*(1), 9-18. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(02\)00461-0](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(02)00461-0)
- Danihlík, J., Aronstein, K., & Petřivalský, M. (2016). Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*, *54*(2), 123-136. <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>
- de Groot, A. P. (1952). Amino acid requirements for growth of the honeybee (*Apis mellifica* L.). *Experientia*, *8*(5), 192-194. <https://doi.org/10.1007/BF02173740>
- Elbein, A. D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, *13*(4), 17R-27R. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg047>
- Ellis, A. M., & Hayes, G. W. (2015). An evaluation of fresh versus fermented diets for honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research*, *48*(3), 215-216. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.48.3.11>
- Erban, T., Harant, K., Kamler, M., Markovic, M., & Titera, D. (2016). Detailed proteome mapping of newly emerged honeybee worker hemolymph and comparison with the red-eye pupal stage. *Apidologie*, *47*(6), 805-817. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0437-7>
- Erban, T., Jedelsky, P. L., & Titera, D. (2013). Two-dimensional proteomic analysis of honeybee, *Apis mellifera*, winter worker hemolymph. *Apidologie*, *44*(4), 404-418. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0190-5>
- Fluri, P., Lüscher, M., Wille, H., & Gerig, L. (1982). Changes in weight of the pharyngeal gland and haemolymph titres of juvenile hormone, protein and vitellogenin in worker honey bees. *Journal of Insect Physiology*, *28*(1), 61-68. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(82\)90023-3](https://doi.org/10.1016/0022-1910(82)90023-3)

- 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>
- Geiser, D. L., & Winzerling, J. J. (2012). Insect transferrins: Multifunctional proteins: Multifunctional proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(3), 437-451. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.011>
- Gupta, A. P. (2010). Hemocyte types: their structures, synonymies, interrelationships, and taxonomic significance. *Insect Hemocytes*, 85-128. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511759987.005>
- 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>
- Hauerland, N. H. (1996). Insect storage proteins: gene families and receptors. *Insect biochemistry and molecular biology*, 26(8-9). [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(96\)00035-5](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(96)00035-5)
- Havukainen, H., Halskau, Ø., & Skjaerven, L. (2011). Deconstructing honeybee vitellogenin: novel 40 kDa fragment assigned to its N terminu. *Journal of Experimental Biology*, 214(4), 582–592. <https://doi.org/10.1242/jeb.048314>
- Huang, K., Liu, Y., & Perrimon, N. (2022). Roles of Insect Oenocytes in Physiology and Their Relevance to Human Metabolic Diseases. *Frontiers in Insect Science*, 2. <https://doi.org/10.3389/finsc.2022.859847>
- Hyršl, P. (2006). Lipophoriny a zásobní proteiny hmyzí hemolymfy. In *Zoologické dny Brno 2006* (pp. 91-92).
- Hyršl, P. (2018). Imunita hmyzu a dalších bezobratlých živočichů 1. *Živa*, 2018(1), 32-34.
- Chan, Q. W. T., Howes, C. G., & Foster, L. J. (2006). Quantitative Comparison of Caste Differences in Honeybee Hemolymph. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(12), 2252-2262. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600197-MCP200>
- Chan, Q. W. T., Howes, C. G., & Foster, L. J. (2006). Quantitative Comparison of Caste Differences in Honeybee Hemolymph. *Molekular and Cellular Proteomics*, 5(12), 2252-2262. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600197-MCP200>

- Chapman, R. F., Douglas, A. E., & Simpson, S. J. (2013). *The insects: structure and function / R.F. Chapman ; edited by Stephen J. Simpson, Angela E. Douglas* (5th). Cambridge University Press.
- Chino, H., & Downer, R. G. (1982). Insect hemolymph lipophorin: a mechanism of lipid transport in insects. *Advances in biophysics*, *15*(67–92). [https://doi.org/10.1016/0065-227x\(82\)90005-3](https://doi.org/10.1016/0065-227x(82)90005-3)
- Cho, Y., & Cho, S. (2019). Hemocyte-hemocyte adhesion by granulocytes is associated with cellular immunity in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54484-5>
- Ilyasov, R., Gaifullina, L., Saltykova, E., Poskryakov, A., & Nikolenko, A. (2012). Review of the Expression of Antimicrobial Peptide Defensin in Honey Bees *Apis Mellifera* L. *Journal of Apicultural Science*, *56*(1), 115-124. <https://doi.org/10.2478/v10289-012-0013-y>
- Isani, G., Bellei, E., Rudelli, C., Cabbri, R., Ferlizza, E., & Andreani, G. (2023). SDS-PAGE-Based Quantitative Assay of Hemolymph Proteins in Honeybees: Progress and Prospects for Field Application. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms241210216>
- Kanost, M. R., Kawooya, J. K., Law, J. H., Ryan, R. O., Van Heusden, M. C., & Ziegler, R. (1990). Insect Hemolymph Proteins. *Advances in Insect Physiology*, *(22)*, 299-396.
- Keitel, U., Schilling, E., Knappe, D., Al-Mekhlafi, M., Petersen, F., Hoffmann, R., & Hauschildt, S. (2013). Effect of antimicrobial peptides from *Apis mellifera* hemolymph and its optimized version Api88 on biological activities of human monocytes and mast cells: towards clinical applications. *Innate Immunity*, *19*(4), 355-367. <https://doi.org/10.1177/1753425912462045>
- Khosravi, R., Sendi, J. J., Brayner, F. A., Alves, L. C., & Feitosa, A. P. S. (2016). Hemocytes of the Rose Sawfly *Arge ochropus* (Gmelin) (Hymenoptera: Argidae). *Neotropical Entomology*, *45*(1), 58-65. <https://doi.org/10.1007/s13744-015-0339-9>
- Kim, B. Y., & Jin, B. R. (2015). Apolipophorin III from honeybees (*Apis cerana*) exhibits antibacterial activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *182*, 6-13. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.11.010>

- Kim, B. Y., Lee, K. S., Choo, Y. M., Kim, I., Je, Y. H., Woo, S. D., & Lee, S. M. (2008). Insect transferrin functions as an antioxidant protein in a beetle larva. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *150*(2), 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.02.009>
- Kodrík, D. (2000). *Fyziologie hmyzu: učební texty*. Entomologický ústav AV ČR.
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L., & Olczyk, K. (2015). Bee Pollen: Chemical Composition and Therapeutic Application. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2015/297425>
- Kucharski, R., & Maleszka, R. (2003). Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*, *3*(1). <https://doi.org/10.1093/jis/3.1.27>
- 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). <https://doi.org/10.3390/insects10080244>
- Leipart, V., Montserrat-Canals, M., Cunha, E. S., Luecke, H., Herrero-Galán, E., Halskau, Ø., & Amdam, G. V. (2022). Structure prediction of honey bee vitellogenin: a multi-domain protein important for insect immunity. *FEBS Open Bio*, *12*(1), 51-70. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13316>
- Li, W. -F., Ma, G. -X., & Zhou, X. -X. (2006). Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure–function relationships and mode of action. *Peptides*, *27*(9), 2350-2359. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.016>
- Lundgren, J. G., & Jurat-Fuentes, J. L. (2012). Physiology and Ecology of Host Defense Against Microbial Invaders. In *Insect Pathology* (Second Edition, pp. 461-480). Academic Press.
- Martins, J. R., Anhezini, L., Dallacqua, R. P., Simões, Z. L. P., Bitondi, M. M. G., & Dearden, P. K. (2011). A Honey Bee Hexamerin, HEX 70a, Is Likely to Play an Intranuclear Role in Developing and Mature Ovarioles and Testioles. *PLoS ONE*, *6*(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029006>
- Martins, J. R., Nunes, F. M. F., Cristino, A. S., Simões, Z. L. P., & Bitondi, M. M. G. (2010). The four hexamerin genes in the honey bee: structure, molecular evolution and function deduced from expression patterns in queens, workers and drones. *BMC Molecular Biology*, *11*(23). <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-23>

- Münch, D., Amdam, G. V., & Wolschin, F. (2008). Ageing in a eusocial insect: molecular and physiological characteristics of life span plasticity in the honey bee. *Functional Ecology*, 22(3), 407-421. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01419.x>
- Nation, J. L. (2016). *Insect physiology and biochemistry* (Third Edition). CRC Press.
- 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), e62. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050062>
- Park, H. -G., Kim, B. -Y., Kim, J. -M., Choi, Y. -S., Yoon, H. -J., Lee, K. -S., & Jin, B. -R. (2021). Upregulation of Transferrin and Major Royal Jelly Proteins in the Spermathecal Fluid of Mated Honeybee (*Apis mellifera*) Queens. *Insects*, 12(8), 690. <https://doi.org/10.3390/insects12080690>
- 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*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(4). [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(03\)00021-3](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(03)00021-3)
- Ramanathan, A. N. K. G., Nair, A. J., & Sugunan, V. S. (2018). A review on Royal Jelly proteins and peptides. *Journal of Functional Foods*, 44, 255-264. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.03.008>
- Resh, V. H., & Cardé, R. T. (Eds.). (2009). *Encyclopedia of Insects* (2nd ed.). Academic Press.
- Ribeiro, C., & Brehélin, M. (2006). Insect haemocytes: What type of cell is that? *Journal of Insect Physiology*, 52(5), 417-429. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2006.01.005>
- Rodríguez-García, C., Heerman, M. C., Cook, S. C., Evans, J. D., DeGrandi-Hoffman, G., Banmeke, O., Zhang, Y., Huang, S., Hamilton, M., Chen, Y. P., & Lattorff, M. (2021). Transferrin-mediated iron sequestration suggests a novel therapeutic strategy for controlling Nosema disease in the honey bee, *Apis mellifera*. *PLOS Pathogens*, 17(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009270>
- Rodríguez-García, C., Heerman, M. C., Cook, S. C., Evans, J. D., DeGrandi-Hoffman, G., Banmeke, O., Zhang, Y., Huang, S., Hamilton, M., Chen, Y. P., & Lattorff, M. (2021). Transferrin-mediated iron sequestration suggests a novel therapeutic strategy for controlling Nosema disease in the honey bee, *Apis mellifera*. *PLOS Pathogens*, 17(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009270>

- Rosales, C., & Uribe-Querol, E. (2017). Phagocytosis: A Fundamental Process in Immunity. *BioMed Research International*, 2017, 1-18. <https://doi.org/10.1155/2017/9042851>
- Salmela, H., Amdam, G. V., Freitak, D., & Schneider, D. S. (2015). Transfer of Immunity from Mother to Offspring Is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin. *PLoS Pathogens*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005015>
- Salmela, H., Stark, T., Stucki, D., Fuchs, S., Freitak, 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>
- Satyavathi, V. V., Minz, A., & Nagaraju, J. (2014). Nodulation: An unexplored cellular defense mechanism in insects. *Cellular Signalling*, 26(8), 1753-1763. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.02.024>
- Seehuus, S. -C., Norberg, K., Gimsa, U., & Krekling. (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>
- Shapiro, A. L., Viñuela, E., & V. Maizel, J. (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 28(5), 815-820. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(67\)90391-9](https://doi.org/10.1016/0006-291X(67)90391-9)
- Stanley, R. G., & Linskens, H. F. (1974). *Pollen*. Springer-Verlag.
- Takeda, M., & Tufail, M. (2012). *Hemolymph Proteins and Functional Peptides: Recent Advances in Insects and Other Arthropods (volume 1)* (Vol. 00001). Bentham Science Publishers.
- Tarpan, M. A., De Cooman, H., Sagstuen, E., Waroquier, M., & Callens, F. (2011). Identification of primary free radicals in trehalose dihydrate single crystals X-irradiated at 10 K. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13(23), 294-302. <https://doi.org/10.1039/c0cp02616f>
- 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)

- Van der Horst, D. J., & Rodenburg, K. W. (2010). Lipoprotein assembly and function in an evolutionary perspective. *BioMolecular Concepts*, 1(2), 165-183. <https://doi.org/10.1515/bmc.2010.012>
- Van der Horst, D. J., & Ryan, R. O. (2017). Lipid Transport. *Reference Module in Life Sciences*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.04045-0>
- Včely: Vývojová stádia včelího plodu. Cit.vfu.cz. Retrieved November 28, 2023, from <https://cit.vfu.cz/nz/NHZ/anatomie%20vcel.html>
- Weers, P. M. M., & Ryan, R. O. (2003). Apolipoprotein III: a lipid-triggered molecular switch: a lipid-triggered molecular switch. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 33(12), 1249-1260. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2003.06.013>
- Wille, H., Wille, M., Kilchenmann, V., Imdorf, A., & Bühlmann, G. (1985). Pollenernte und Massenwechsel von drei Apis mellifera-Völkern auf demselben Bienenstand in zwei aufeinanderfolgenden Jahren. *Revue suisse de zoologie*, 92, 897-914.
- Wolteđji, D., Fang, Y., Han, B., Feng, M., Li, R., Lu, X., & Li, J. (2013). Proteome Analysis of Hemolymph Changes during the Larval to Pupal Development Stages of Honeybee Workers (Apis mellifera ligustica). *Journal of Proteome Research*, 12(11), 5189-5198. <https://doi.org/10.1021/pr400519d>
- Yamashita, M., & Iwabuchi, K. (2001). Bombyx mori prohemocyte division and differentiation in individual microcultures. *Journal of Insect Physiology*, 2001(47), 325-331. [https://doi.org/10.1016/S0022-1910\(00\)00144-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1910(00)00144-X).
- 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>
- Zufelato, M. S., Lourenço, A. P., Simões, Z. L. P., Jorge, J. A., & Bitondi, M. M. G. (2004). Phenoloxidase activity in Apis mellifera honey bee pupae, and ecdysteroid-dependent expression of the prophenoloxidase mRNA. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(12), 1257-1268. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.08.005>

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA/BIS	akrylamid/N,N'-mehylenbisakrylamid
AKH	adipokinetický hormon
AMK	aminokyselina
APS	peroxosíran amonný
BSA	hovězi sérový albumin
CBB	Coomassie Brilliant Blue
DAG	diacylglyceroly
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	numerické klasifikační schéma pro enzymy
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
MALDI TOF	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s detektorem doby letu
MRJPs	hlavní proteiny mateří kačičky z angl. Major royal jelly proteins
MS	hmotnostní spektrometrie
MW	molekulová hmotnost z angl. molecular weight
RD	relativní hustota z angl. relative density
SDS	dodecylsíran sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
TEMED	N, N,N',N'-tetramethylethan-1,2-diamin
Vg	vitellogenin
Vg-like	vitellogeninu podobné proteiny
vWFD	von Willebrandův faktor, typ D