Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Analýza proteinů v medu a mateří kašičce

Bakalářská práce

2021 Lenka Rozkovcová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Lenka Rozkovcová**
Osobní číslo:	**C20262**
Studijní program:	**B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Zdravotní laborant**
Téma práce:	**Analýza proteinů v medu a mateří kašičce**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Vypracujte rešerši z odborné literatury zaměřenou na proteiny obsažené ve včelím medu a v mateří kašičce, a stručný přehled jejich biologické role pro včelstvo a člověka.

Významnou úlohu pro biologickou aktivitu proteinů nesou jejich post-translační modifikace (glykosylace, fosforylace, methylace aj.). Které informace o proteinech v medu a mateří kašičce jsou známé?

V poslední části rešerše uveďte laboratorní metody, které jsou používané k izolaci a studiu proteinů ze včelích produktů.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Blanka Švecová, Ph.D.**
Katedra analytické chemie

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kanďár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza proteinů v medu a mateří kašičce jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.
Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 13. září 2021

Lenka Rozkovcová

Poděkování

Mé poděkování patří Ing. Blance Švecové, Ph.D. a taktéž Mgr. Marcele Slovákové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovaly.

Anotace

Med a mateří kašička mají důležitou roli pro včely i pro člověka. Posttranslační modifikace proteinů, které jsou v nich obsažené, jsou analyzovány pomocí moderních analytických metod, jako jsou elekroforéza, kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie.

Klíčová slova

med, mateří kašička, proteiny, posttranslační modifikace, metody analýzy

Title

Honey and Royal Jelly Protein Analysis

Annotation

Honey and royal jelly play an improtant role for honeybees and human. The proteins from honey or royal jelly undergo posttranslational modification and they are analyzed by using laboratory methods such as electrophoresis, liquid chromatography and mass spectrometry.

Keywords

honey, royal jelly, proteins, posttranslational modification, methods of analysis

Obsah

Úvod....11
1. Med a mateří kašička....12
2. Hlavní proteiny mateří kašičky....13
2.1. MRJP1....14
2.2. MRJP2....15
2.3. MRJP3....17
2.4. MRJP4....18
2.5. MRJP5....18
2.6. MRJP6....19
2.7. MRJP7....19
2.8. MRJP8....20
2.9. MRJP9....20
2.10. Ostatní proteiny....20
2.10.1. Royalisin....20
2.10.2. Jelleiny....21
2.10.3. Apisimin....21
2.10.4. Royalactin....21
3. Posttranslační modifikace MRJP....21
3.1. Glykosylace....23
3.2. Fosforylace....24
3.3. Methylace....24
3.4. Deamidace....25
4. Metody analýzy MRJP....25
4.1. Izolace MRJP....26
4.2. Elektroforetické metody....27
4.2.1. Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu....28
4.2.1.1. Imobilizovaný pH gradient....28
4.2.1.2. Izoelektrická fokusace....29
4.2.1.3. Jednorozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu....29
4.2.1.4. Modrá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza....30
4.2.1.5. Kombinace 2D BN/SDS-PAGE....31
4.3. Kapalinová chromatografie....32
4.3.1. Dvourozměrná kapalinová chromatografie....34
4.4. Hmotnostní spektrometrie....35
4.4.1. MALDI....36

4.4.2. Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem 37
4.4.3. Hmotnostní spektrogram peptidu MK 37
5. Závěr 39
6. Literatura 40

Seznam obrázků

Obrázek 1: Složení a účinky MK (Ramanathan, 2018) 13
Obrázek 2: MRJP1 (převzato a upraveno z: Biochemistry 2017, 56, 11, 1645-1655).....15
Obrázek 3: I elektroforetická separace MRJP2, II a III krystalografická struktura MRJP2 a jeho izoformy (Habashy, 2019) 16
Obrázek 4: Separace proteinů mateří kašičky metodou 2D-PAGE (Zhang, 2012).....23
Obrázek 5: Ultracentrifugace a dvojrozměrná elektroforéza MK - barveno Coomassie Brilliant Blue (Nozaki, 2012).....27
Obrázek 6: SDS-PAGE vzorků mateří kašičky (Cakir, 2019).....30
Obrázek 7: BN PAGE a BN/SDS PAGE proteinových komplexů (Swamy a kol., 2006) 31
Obrázek 8: Elektroforetická analýza oligomeru MRJP1 (Tamura a kol., 2009).....32
Obrázek 9: Schéma systému HPLC (Reuhs, 2017).....34
Obrázek 10: Dvourozměrná kapalinová chromatografie (Neverova, 2005).....35
Obrázek 11: Hmotnostní spektra methylovaného peptidu mateří kašičky (Zhang,2012).....38

Seznam zkratek

2D LC – dvourozměrná kapalinová chromatografie

2D SDS-PAGE – dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsíranem sodným

BN-PAGE - modrá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza

CBB – Comassie Brilliant Blue – modré barvivo

ESI – ionizace elektrosprejem

HPLC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie

IEF – izoelektrická fokusace

IPG – imobilizovaný pH gradient

MALDI – matricová laserová desorpční ionizace

MK – mateří kašička

MRJP – hlavní proteiny mateří kašičky

MS – hmotnostní spektrometrie

pI – izoelektrický bod

PTM – posttranslační modifikace

TOF – analyzátor doby letu

Úvod

Včela medonosná je celosvětově rozšířena a řadí se mezi společenský hmyz, který tvoří tzv. včelstva. Je hospodářsky využívána pro produkci medu a mateří kašičky, které vytváří ze sladkých rostlinných šťáv a medovice. Med a mateří kašička jsou důležitou součástí potravinářského i farmaceutického průmyslu. Důležitou roli hrají právě proteiny, které mají různé funkce, např. antimikrobiální, protizánětlivé, antioxidační atd.

Většina proteinů není po translaci plně funkční, a tak prochází posttranslačními úpravami. U proteinů medu a mateří kašičky dochází nejčastěji k fosforylaci, glykosylaci, deamidaci a dále k methylaci. Analýzou proteinů a jejich posttranslačních modifikací se zabývá proteomika, která využívá různé laboratorní techniky ke zjištění vlastností proteinů, především struktury a funkce. Při analýze jsou využívány kombinace několika metod. Mezi nejčastěji využívané metody patří dvourozměrná elektroforéza, vysokoúčinná kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie.

Pomocí elektroforézy lze provést separaci proteinů podle jejich molekulových hmotností a izoelektrických bodů. Kapalinová chromatografie využívá k separaci látek různou rychlost migrace v mobilní fázi skrze tuhou stacionární fázi. K identifikaci jednotlivých proteinů je využívána hmotnostní spektrometrie, kdy se musí nejprve proteiny rozštěpit na peptidy, které jsou dále ionizovány a děleny podle poměru hmotností iontů vůči jejich náboji.

1. Med a mateří kašička

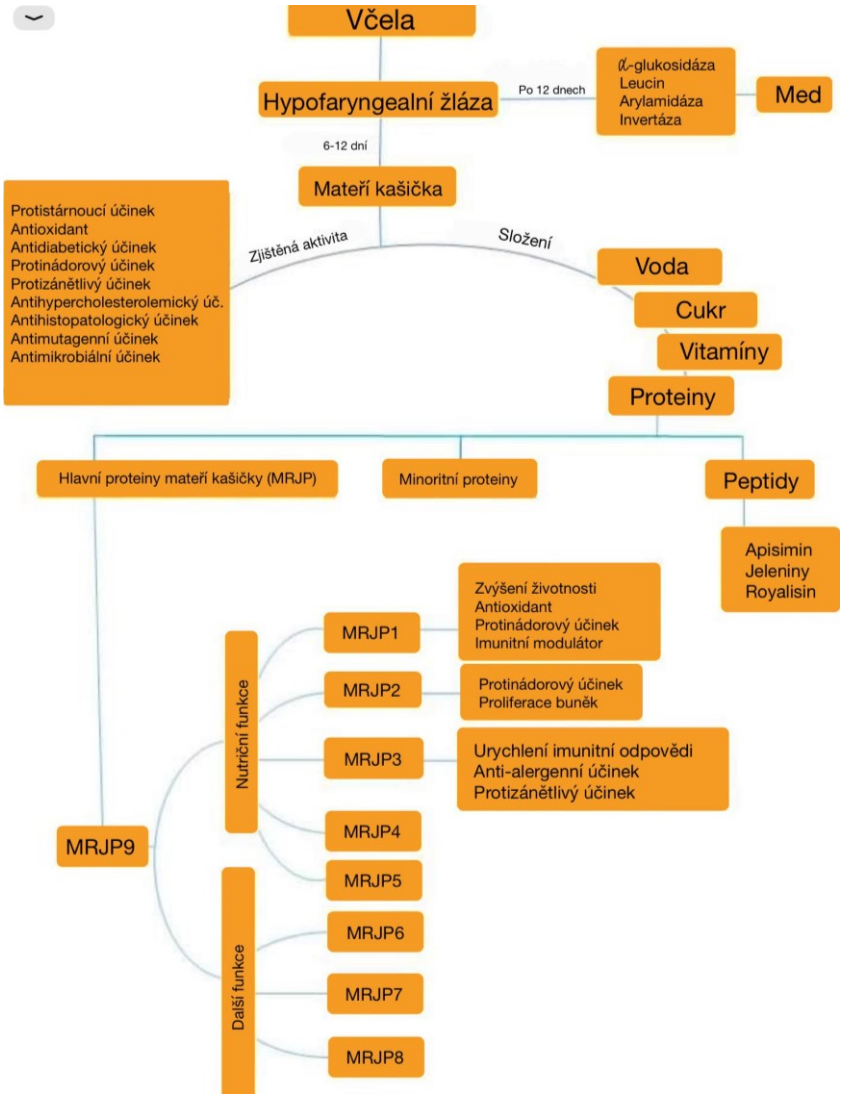
Med je přírodní sladidlo, které je produkováno medonosnými včelami, *Apis mellifera* [1]. Včely ho získávají procesem zrání krmného nektaru, medovice či jiných sladkých rostlinných šťáv [2]. Je složen především ze sacharidů (glukóza, maltóza, fruktóza, sacharóza), dále obsahuje pylová zrna, bílkoviny, volné aminokyseliny, vitamíny, minerály a flavonoidy [1, 3]. Vzhledem k jeho chemickému složení, a především díky obsahu antioxidantů se med řadí mezi funkční potraviny [4].

Proteiny přítomné v medu jsou používány jako markery autenticity, falšování medu a také jako indikátory kvality. Obecně je však tento proteom stále velmi nedostatečně prozkoumán, především z důvodu nízkého množství bílkovin v medu (0,1 – 0,5 hm. %) [1]. Proteiny obsažené v medu jsou nejvíce sekretovány ze slinných a hypofaryngeálních žláz dělnic [2]. U mladých dělnic, tzv. mladušek, dochází ke zvětšení objemu buněk žlázy, která obsahuje aciny, a dochází tak k usnadnění správné sekrece bílkovin [5]. Procentuální zastoupení látek, především proteinů, obsažených v medu, je rozdílné v důsledku jeho původu, respektive geografického původu včel a nektaru, ze kterého je med produkován [1]. Dvě skupiny bílkovin se však vyskytují ve všech různých druzích medu, jsou to enzymy metabolismu sacharidů a charakteristické proteiny mateří kašičky (Major Royal Jelly Protein, MRJP) [2]. Mezi enzymy se řadí glukozooxidáza, kdy je glukóza tímto enzymem oxidována za vzniku peroxidu vodíku, α – amyláza, α – glukosidáza a β – glukosidáza [2, 3, 6]. Vyjmenované enzymy mohou za různorodost chemického složení medu, respektive za různé procentuální zastoupení jednotlivých sacharidů. MRJP proteiny, které nalezneme v medu, jsou označované MRJP1 – 5, royalisin (známý též jako defensin-1) a apisimin. Tyto proteiny jsou důležité pro antimikrobiální aktivitu v medu v kombinaci s dalšími látkami (peroxid vodíku, kyselina glukonová), které vznikají během přeměny cukru [2].

Mateří kašička (MK) je bělavá látka želatinové konzistence. Má výrazně ostrý zápach a chuť. Je částečně rozpustná ve vodě, její pH se pohybuje v kyselém rozmezí 3,4 – 4,5 [7]. MK vzniká fermentací směsi rostlinného pylu, medu a sekretu hypofaryngeální a mandibulární žlázy mladých včel, které se v úlu starají o výživu [4, 8]. Obsahuje vodu (50–60 %), bílkoviny (18 %), sacharidy (15 %), lipidy (3–6 %), minerální soli (1,5 %) a vitamíny dohromady s velkým množstvím bioaktivních látek, jako jsou: kyselina 10-hydroxyl-2-decenová s imunomodulačními vlastnostmi, volné mastné kyseliny a volné aminokyseliny [8, 9]. Jelikož sušina mateří kašičky obsahuje více než 50 % bílkovin [6] je hlavním zdrojem proteinů a představuje výživu pro larvy a včelí královnu [4, 10]. Celkový obsah proteinů v MK je z 90 %

tvořen MRJP [11]. Procentuální zastoupení složení mateří kašičky záleží na lokalitě, sezóně a druhu včelstva.

Mateří kašička má antioxidační, antibakteriální, protirakovinné a také hepatoprotektivní vlastnosti [12]. Na obrázku 1 jsou zobrazeny vlastnosti jak MK, tak i jejích proteinů, které budou rozebírány v kapitole 2. Hlavní proteiny mateří kašičky. Dále má schopnost modulovat vývoj larev, což může souviset s obsahem inhibitorů histondeacetylázy, mikroRNAa a dalších faktorů [8].



Obrázek 1: Složení a účinky MK (Ramanathan, 2018)

2. Hlavní proteiny mateří kašičky

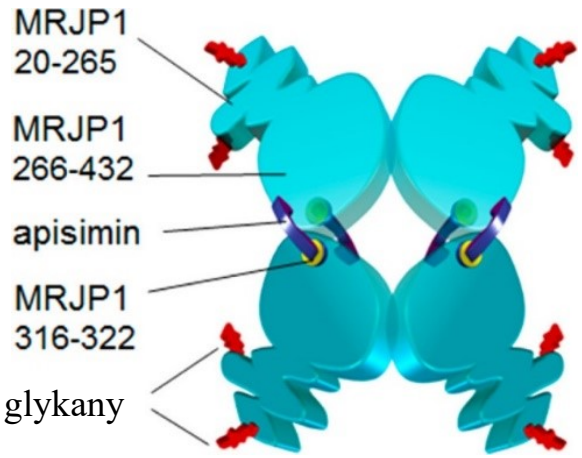
Více než 90 % celkového proteinu v MK tvoří hlavní proteiny mateří kašičky, tzv. MRJP [13]. Do této skupiny patří 9 vysoce homologních proteinů MRJP1–9, které se vyvinuly genovou duplikací s progenitorového genu [5]. Proteiny jsou syntetizovány

v hypofaryngeálních žlázách kojiček jako sekreční proteiny. Dále jsou přímo předloženy do endoplasmatického retikula sekrečních buněk a poté jsou proteiny skladovány v sekrečních váčcích [13]. MRJP jsou glykoproteiny, kde jsou oligosacharidy kovalentně navázány na N-terminálním zbytku [14]. Zralé MRJP obsahují 400–578 aminokyselin a mají teoretickou molekulovou hmotnost mezi 45 a 68 kDa. Většina MRJP je bohatá na esenciální aminokyseliny pro včely (Arg, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Val) a některé mají velmi vysoký obsah dusíku. Tyto proteiny tak slouží jako zásobní proteiny pro biologicky dostupný dusík [15]. Čtyři nejhojněji se vyskytující proteiny v produktech včel (mateří kašička, med) jsou MRJP1 – 3 a MRJP5 [5]. Za použití metody 2D SDS-PAGE (Two-Dimensional Sodium Dodecylsulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis, dvourozměrná polyakrylamidová gelová elektroforéza s dodecylsíranem sodným) bylo zjištěno, že obsah jednotlivých proteinů v MK *Apis mellifera* je přibližně 46 % MRJP1, 11 % MRJP2, 13 % MRJP3 a 30 % tvoří zbývajících šest typů MRJP [14]. Všech 9 typů má podobnou sekvenci aminokyselin [13]. Značné množství studií (např. Miyata, 2007; Kobayashi a kol., 2001 či Ghosh, 2003) dokazuje, že MRJP významně přispívají různým fyziologickým funkcím. Mají antioxidační, protizánětlivé, antihypercholesterolemické, protinádorové a také hypotenzní a vazodilatační dermaprotektivní vlastnosti [14]. Funkcí MRJP je více, od poskytování základních živin, přes antibakteriální účinky až po navázání se na RNA a zvýšení viskozity mateří kašičky [13]. MRJP mají další role v různých tkáních včetně mozku Už v minulosti byly identifikovány geny *mrjp1–9* kódující právě proteiny MRJP1–9. Ví se jen málo o jejich funkci nebo produkci proteinů. Nově přidaný člen skupiny *mrjp*, desátý člen, je pseudogen kódující neúplný polypeptid a mohl by kódovat desátého člena MRJP proteinů. Nazývá se *mrjps-Ψ* [11].

2.1. MRJP1

MRJP1 je nejhojněji se vyskytující slabě kyselý protein (pI 4,9-6,3), jehož velikost je přibližně 55 kDa [6, 16]. Je exprimován jako řetězec 432 aminokyselin, který je následně štěpen signální peptidázou, kdy se odstraní N-terminální 19-koncový segment. Výsledkem je řetězec s molekulovou hmotností 46 861 Da. Během zrání, MRJP1 projde dodatečnou post-translační modifikací. Pomocí separační metody izoelektrické fokusace byla odhalena přítomnost 9 izoforem MRJP1s velmi podobnou molekulovou hmotností. Rozdílnost v přírodě a míra post-translačních modifikací jsou považovány za hlavní příčinu této heterogenity. Dozrálý MRJP1 je glykoprotein, u kterého jsou cukernaté složky navázány převážně na N144 a N177 [8].

Zvláštností je, že se vyskytuje jako monomer (monoMRJP1) i oligomer v komplexu s apisiminem (oligoMRJP1 / apisimin). Tato oligomerní forma vzniká kopurifikací s 54-zbytkem α-helikálního apisiminu. má strukturní funkci a váže se na RNA, čímž zvyšuje viskozitu MK tvorbou fibril při kyselém pH 4,0 [5, 8, 13]. Apisimin podporuje spojení s MRJP1 do vyšších struktur produkcí již zmíněného komplexu MRJP1/apisimin, který vykazuje značnou tepelnou stabilitu. Složení těchto komplexů zůstává nejisté. Pomocí elektroforetické denzitometrie byla zjištěna stechiometrie MRJP1: apisimin 5: 1, ale i jiné vazebné poměry nelze vyloučit. Chromatografické, elektroforetické a metody využívající rozptylu světla přinesly odhady velikosti 280–420 kDa tohoto komplexu [8, 17]. Vazba je zprostředkována pouze nekovalentními interakcemi, protože chybí mezimolekulární disulfidové můstky [8].



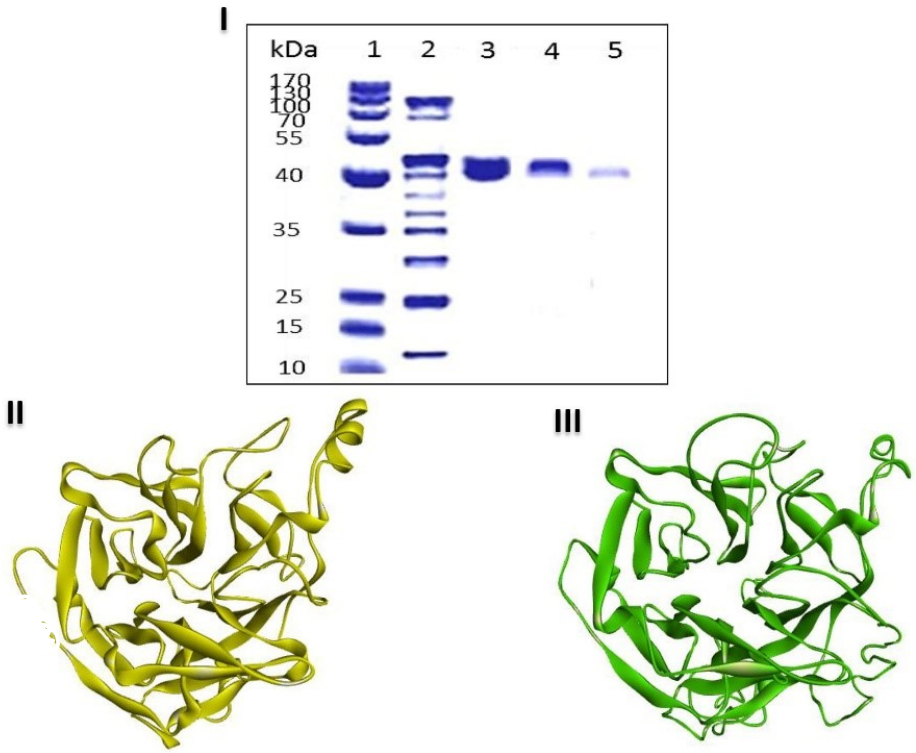
Obrázek 2: MRJP1 (převzato a upraveno z: Biochemistry 2017, 56, 11, 1645-1655)

MRJP1 představuje společně s dalšími proteiny MK hlavní příjem esenciálních aminokyselin [10]. Jeho přesná role není známa, ale existují důkazy, že tento protein je důležitý pro diferenciaci královny prostřednictvím signální dráhy zprostředkované receptorem pro epidermální růstový faktor (EGFR) [8]. Avšak byla zjištěna také antibakteriální aktivita, ale i antihypertenzní účinky a dokonce i aktivita podobná růstovému faktoru v buňkách savců, včetně proliferace a potlačení apoptózy u potkaních hepatocytů [5, 8, 18]. Pravděpodobně podporuje regeneraci jater a může mít cytoprotektivní účinek na hepatocyty [19]. Dále byl MRJP1 společně s MRJP2 charakterizován jako hlavní alergen v MK a *in vivo* stimulují produkci myších makrofágů TNF-α [10]. Užívá se pro detekci znehodnocujících příměsí v medu [6].

2.2. MRJP2

Glykoprotein MRJP2 obsahuje asi 435 aminokyselin, což je přibližně 47% jeho složení, a jeho molekulová hmotnost se pohybuje kolem 49 – 60 kDa [15, 16, 20]. Převážná část

aminokyselin, ze kterých se MRJP2 skládá, jsou leucin a valin [20]. Je to bazický protein, který se vyskytuje v základním rozmezí pI (pI 6,3-8,3) [16, 20]. Skládá se z N-koncové sekvence A-I-V-R-E-N-S a pouze jednoho N-vázaného sacharidového řetězce, který je svou strukturou blízký manóze [20]. MRJP2 je složen z opakujícího se motivu NQ (N / K) XN, který obsahuje sedm repetic pentapeptidu přímo na C-konci, u kterého se délka nelišila u *Apis mellifera*. Naproti tomu u *Apis cerana* se uvádějí polymorfismy délky téhož pentapeptidu s osmi nebo devíti opakováními [15].



Obrázek 3: I elektroforetická separace MRJP2, II a III krystalografická struktura MRJP2 a jeho izoformy (Habashy, 2019)

Posttranslační modifikace MRJP2 vede k rozšíření rozsahu pI z 6,3 na 8,3 [20]. V roce 2005 identifikoval Santos osm různých forem MRJP2 s molekulovou hmotností od 50 673 do 59 995 Da v rozmezí pI od 4,92 do 7,02 v sekretu z hypofaryngeální žlázy včel, zatímco v MK u afrických a evropských včel bylo pozorováno 15 a 12 různých izoforem tohoto proteinu. V jiné studii, Biliková et al., uvedli objev osmi izoforem s hodnotami molekulové hmotnosti kolem 49 kDa v pI rozmezí od 7,5 do 8,5. Toto množství různých izoforem může být způsobeno strukturálními změnami tohoto proteinu jako je proteolýza, glykosylace / deglykosylace, ke kterým dochází při skladování MK [21].

MRJP2 je v MK důležitým zdrojem dusíku pro růst a vývoj včel [10]. Má antibakteriální i antioxidační účinky [19]. Společně s MRJP1 je hlavním alergenem MK [22]. Také stimuluje

myší makrofágy k uvolňování TNF-α [16]. MRJP2 a jeho izoforma XI má protektivní účinek proti poškození jater a rakovině [23].

2.3. MRJP3

Dozrálý MRJP3 je opakující se pentapeptid, který je složen z 524 aminokyselin a celková molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí 60–70 kDa [15, 16]. Mezi hlavní aminokyseliny se řadí arginin a lysin [20]. V MRJP3 se 22 opakování pentapeptidu (N / K / R) QN (A / G / D) (G / D / N) nachází C-terminálně mezi sekvencí aminokyselin 424 a 535. Repetitivní oblast MRJP3 ukazuje variabilitu délky v důsledku odlišného počtu opakování na úrovni DNA mezi jednotlivými včelami v kolonii [15]. Opakované oblasti sestávají z pozitivně nabitých argininových / lysinových zbytků i negativně nabitých aspartátových zbytků. Pomocí imunoblotových analýz exprimovaného proteinu a PCR genomu DNA byl analyzován polymorfismus u tohoto proteinu [20].

Osm různých alel kóduje 14, 22 nebo 25–30 pentapeptidových repetic. Ukázalo se, že repetitivní pentapeptidový motiv existuje také u *Apis cerana, Apis dorsata*, *Apis florea* a afrikanizovaných včelách, ale stupeň polymorfismu se lišil [15]. Polymorfismus je patrnější u MRJP3 produkovaném koloniemi *Apis mellifera carnica* a u poddruhu *Apis mellifera*. Tato variabilita je odvozena z variabilního počtu opakování na genomové úrovni včel včelstva v kolonii [20]. Velikost alely *Apis dorsata* a *Apis cerana* je při 600–700 bp mnohem větší než u *Apis mellifera*, což má za následek vznik 34 – 38 opakování pentapeptidu. Dále se zdá, že polymorfismus je méně výrazný u *Apis florea*, pouze u dvou alel bylo zjištěno, že kódují pouze vznik 24 a 26 opakování [15]. Proto lze MRJP3 a jejich opakující se oblasti použít jako markery pro genetické variace a evoluční trendy včelstev [20].

MRJP3 se vyskytuje jako pět izoforem s molekulovou hmotností v rozmezí od 80 590 Da do 87 000 Da a izoelektrickými body od 7,05 do 8,04 [21]. Dle jiných studií bylo odhaleno 8 izoforem či dvacet čtyři a deset. Předpokládá se, že přítomnost většího počtu izoforem MRJP3 je způsobena degradací tohoto proteinu během skladování [20].

Tento protein obsahuje velké množství biologicky dostupného dusíku pro vyvíjející se larvy [5]. Má silné imunoregulační účinky *in vivo* i *in vitro* [18]. Moduluje imunitní odpovědi potlačením produkce IL-4, IL-2 a IFN-γ v T-buňkách [16] . MRJP3 také potlačuje produkci IgE a IgG1 a funguje jako antialergenikum [24]. Také funguje jako protizánětlivé činidlo v aktivovaných myších makrofázích tím, že inhibuje produkci prozánětlivých cytokinů, jako jsou TNF-, IL-6 a IL-1 [25].

2.4. MRJP4

Průměrná molekulová hmotnost MRJP4 se odhaduje přibližně na 60 kDa [20]. Je složen ze 444 aminokyselin, což tvoří 44,5% obsahu z jeho celkového složení [15, 20]. Hlavními aminokyselinami jsou leucin a valin [20]. Jeho isoelektrický bod se pohybuje kolem hodnoty 5,74 [15]. Jeho přítomnost v hypofaryngeální žláze byla potvrzena v roce 1998 [20]. V MK *Apis mellifera* se vyskytuje ve stopovém množství [5]. Včelám zajišťuje hlavní příjem esenciálních AMK [10].

Molekulová hmotnost MRJP4 se liší u různých druhů včel. Tyto rozdíly nejspíše vyplývají z osmi možných N-koncových glykosylačních míst, z různých stupňů glykosylace a právě z diverzity druhů včel [20]. MRJP4 je kontinuálně exprimován ve všech stádiích u *Apis mellifera* [26]. U afrických včel Santos a kol. neobjevili při proteomické analýze sekrece hypofaryngeální žlázy s použitím genomu včel jako reference pro identifikace proteinu žádné izoformy MRJP4. Obvyklá sekvence tryptického proteinu byla nalezena v C-koncové oblasti proteinu RJP57-2 (v databázi proteinů NCBI; přístupové číslo Q17061), což je ekvivalent proteinu MRJP4 [21]. Avšak Sano a kol. pozoroval u afrikanizovaných a evropských včel pět, respektive dvě různé formy tohoto proteinu [18].

Sekvence C-konce MRJP4 u *Apis cerana*, AcMRJP4, má vysoký obsah asparaginu a pozitivně nabitých aminokyselin. AcMRJP4-15 je hydrofilní peptid obsahující 88 aminokyselinových zbytků umístěných na C-konci AcMRJP4 [27]. Při studii z roku 2019 Kim prokázal, že AcMRJP4-15 má aktivnější antimikrobiální roli než AcMRJP4 a že antimikrobiální aktivita AcMRJP4 byla pravděpodobně způsobena jeho C-koncem. AcMRJP4-15 může fungovat jako účinná antimikrobiální látka, která vykazuje aktivitu proti bakteriím, houbám a kvasinkám [28].

2.5. MRJP5

Molekulová hmotnost MRJP5 je okolo 68 kDa a hodnota pI je asi 5,95 [15]. Jeho obsah AMK je 51,4 %, což je asi 578 aminokyselin [15, 20]. Tripeptidové repetice u tohoto proteinu jsou bohaté na arginin a methionin, který obsahuje síru, a tak má význam jako zásobárna síry [11, 20]. Nejzajímavějším rysem proteinu MRJP5 je oblast repetic umístěna mezi aminokyselinovými zbytky 367 a 540 [20]. Tato repetice je motiv MRJP5, který se opakuje 58x s dominancí tripeptidového Dinucleotide Repeat Motif (DRM) [15, 20]. Celková délka oblasti opakování v MRJP5 je 174 aminokyselin, což je delší než u MRJP3 o 100 aminokyselin [20].

Také u MRJP5 byl zjištěn polymorfismus spojený s geneticky podmíněnou délkovou variabilitou. U *Apis mellifera* byly dosud zjištěny pouze dvě různé alely. Opakovaná oblast tripeptidu DRM byla také nalezena u *Apis cerana* (pět různých alel) a afrikanizovaných včel (šest různých alel) s přibližně stejnou velikostí jako u *Apis mellifera*. U včel *Apis dorsata* měla oblast tripeptidových repetic pouze 23 opakování [15].

Stejně jako MRJP4 je i MRJP5 kontinuálně exprimován ve všech stádiích *Apis mellifera* [26]. Rovněž poskytuje v MK výživné složky, jako jsou esenciální aminokyseliny [20]. Podle studie od Santos a kol. byly v sekretu hypofaryngeální žlázy včely u proteinu MRJP5 zjištěny tři různé formy s molekulovou hmotností v rozmezí od 79 075 do 79 471 Da a hodnotami pI v rozmezí od 6,34 do 6,80 [21]. U evropských a afrických včel byly zjištěny čtyři a sedm různých izoforem [18]. Navzdory těmto více formám má včelí genom jedinou kopii genu mrjp-5, což naznačuje, že tento protein může být citlivý na posttranslační modifikace [21]. Mohlo by se tedy jednat o produkty proteolýzy nebo glykosylce / deglykosylace během skladování MK [20].

2.6. MRJP6

MRJP6 je složen ze 417 aminokyselin, což představuje přibližně 42% složení, a mezi hlavní AMK patří leucin. Jeho molekulová hmotnost je 47,58 kDa a pI 6,01 [15, 20]. V MK *Apis mellifera* se vyskytuje ve stopovém množství [5]. U *Apis cerana* je neustále exprimován ve vysokých hladinách z hypofaryngeální žlázy ve všech vývojových stádií včel, především u dělnic a létavek, avšak nemá žádnou nutriční hodnotu [20, 26]. Při proteomické analýze MK *Apis mellifera* byla zjištěna pouze jedna forma MRJP6 [21]. Podle Sano et al. v roce 2004 MRJP6 nebyl nalezen v proteomu v MK. Avšak stále nebyla identifikována řada proteinových skvrn, které by tomuto proteinu mohly odpovídat [18].

2.7. MRJP7

Aminokyseliny tvoří přibližně 48,3% složení MRJP7 [20]. Obsahuje tedy 426 AMK z toho je leucin hlavní aminokyselinou, jeho molekulová hmotnost je 48,66 kDa a pI 4,85 [15, 20]. Stejně jako MRJP6 ani MRJP7 nemá nutriční roli u *Apis cerana*. Je konstantně exprimován hypofaryngeální žlázou včel a byl i detekován v mozku včel ošetřovatelek [20]. U *Apis mellifera* byla detekována pouze jedna forma [21]. Oproti tomu podle Sano et al. nebyl pozorován v proteomu MK. I přesto by se mohl v proteomu vyskytovat, jelikož doposud nebyla identifikována řada proteinových skvrn [18].

2.8. MRJP8

MRJP8 o molekulové hmotnosti 45,06 kDa obsahuje 49,5 % aminokyselin, což je asi 400 AMK. Hlavní aminokyselinou je leucin a izoelektrický bod nabývá hodnoty 5,81 [15, 20]. U MRJP8 se předpokládá, že se jedná o předchůdce proteinů MRJP [20]. Oproti ostatním proteinům MRJP se vyskytuje ve velmi malém množství. Všechny MRJP kromě MRJP8 se vyskytují v MK *Apis mellifera*. Dle Buttstedt ho nalezneme v MK pouze u afroamerizovaných včel [15]. Santos uvádí přítomnost MRJP8 v MK u afrických včel [21]. U *Apis cerana* je exprimován z hypofaryngeální žlázy včel ve stádiu létavek [26]. Je možné ho detekovat i ve včelím jedu [20].

2.9. MRJP9

Obsah aminokyselin v MRJP9 je 403, což odpovídá asi 47,3 % a molekulové hmotnosti 46,27 kDa. Hlavní aminokyselinou je izoleucin. Izoelektrický bod pro tento protein je přibližně 8,62 [15, 20]. MRJP9 je obsažen i ve včelím jedu nejen v MK. Stejně jako u MRJP8 se i u MRJP9 předpokládá, že se jedná o původní protein MRJP [20]. Dle studie z roku 2007 nemá MRJP9 v MK afrických včel žádnou nutriční hodnotu, avšak je imunosenzibilizujícím činidlem [29].

2.10. Ostatní proteiny

Další proteiny, které jsou přítomny v menším množství než MRJP jsou royalisin, jelleiny, aspimin a royalactin [10]. Tyto proteiny jsou tzv. antimikrobiální (AMP) a představují molekuly obrany hostitele v organismech a hrají důležitou roli ve vrozeném imunitním systému organismů včetně hmyzu [30]. Jednou ze skupin AMP jsou defensiny, které působí proti řadě mikroorganismů a tvoří obranný systém většiny organismů včetně včel [31]. Hmyzí defensiny obsahují 28–54 aminokyselin, které mají obdobnou strukturu, jako je amino-koncová smyčka, jedna α-šroubovice a dvě antiparalelní β-vlákna stabilizovaná třemi disulfidovými vazbami [30].

2.10.1. Royalisin

Royalisiny jsou amfipatické proteiny (hydrofobní i hydrofilní vlastnosti) jejichž molekulová hmotnost je 5523 Da, skládají se z 51 aminokyselin, ve kterých šest cysteinových zbytků tvoří tři intramolekulární disulfidové vazby, což vede ke kompaktní globulární struktuře [10, 30]. Tyto disulfidové můstky mohou poskytnout kompaktní strukturu vykazující vysokou stabilitu při nízkém pH a vysoké teplotě [10]. U royalisinu byl zjištěn i inhibiční účinek na houby, některé gramnegativní bakterie a larvy *Paenibacillus*. *Paenibacillus* je včelí patogen,

který způsobuje smrtelnou nemoc larev včel. Bylo zjištěno, že royalisin je běžnou složkou medu a podílí se na antimikrobiálních účincích medu při hojení ran [30].

2.10.2. Jelleiny

Tvorba jelleinů může být výsledkem tryptického štěpení MRJP1 specifickými proteázami. Jelleiny mají strukturní základ antimikrobiálních proteinů a vyznačují se hydrofobními zbytky. Prokázaly své antimikrobiální účinky *in vitro* [32]. Byly vyselektovány čtyři typy jelleinů (Jellein I – Jellein IV) v MK. Jellein I (PFKISIHL-NH_2) se liší od Jellein II (TPFKISIHL-NH_2) pouze díky Thr (T) zbytku v C-terminální části. Zdá se, že tato modifikace mění antibakteriální aktivitu, jelikož Jellein I má vyšší antibakteriální aktivitu než Jelleine II. Při odstranění zbytku Leu (L) na N-konci Jelleinu II za vzniku Jelleinu IV (TPFKISIH-NH_2) dojde k úplné ztrátě antimikrobiální aktivity. U Jelleinu III (EPFKISIHL-NH_2) byla prokázána nižší aktivita oproti Jelleinu II z důvodu nahrazení Thr (T) na C-terminálním konci za Glu (E). Vzhledem k přítomnosti zbytku Arg (R) v poloze 373 a zbytku Thr (T) v poloze 374 primární sekvence MRJP1 lze předpokládat, že Jellein II může být produktem trávení MRJP1. Působení exo-proteinázy jak na C-koncový, tak na N-koncový tryptický fragment by mohlo vést k tvorbě Jelleinů I a IV [10, 33].

2.10.3. Apisimin

Apisimin je peptid jehož molekulová hmotnost je 5 540,4 Da. Obsahuje několik strukturních prvků: 34 % α-helikální, 20% β-list, 11% β-otočka, 30% náhodná struktura. Dobře definovaná sekundární struktura, jejíž výskyt je 65 %, v tak malém peptidu se skládá z jedné aromatické aminokyseliny a je bez disulfidových můstků. N-koncová aminokyselinová sekvence přírodního peptidu apisiminu purifikovaného z MK je K-T-S-I-S-V-K. Zralý apisimin je tvořen 54 aminokyselinami. Je bohatý na valin (18,5 %) a serin (16,7 %) a obsahuje pouze jednu aromatickou aminokyselinu, fenylalanin [34].

2.10.4. Royalactin

Royalactin je monomerní formou proteinu MRJP1, který se hojně vyskytuje v MK [35]. Jeho molekulová hmotnost je přibližně 57 kDa. Indukuje diferenciaci larev včel na královny. Má vliv na zvětšení velikosti těla, vývoj vaječníků a zkracuje dobu vývoje u včel [36].

3. Posttranslační modifikace MRJP

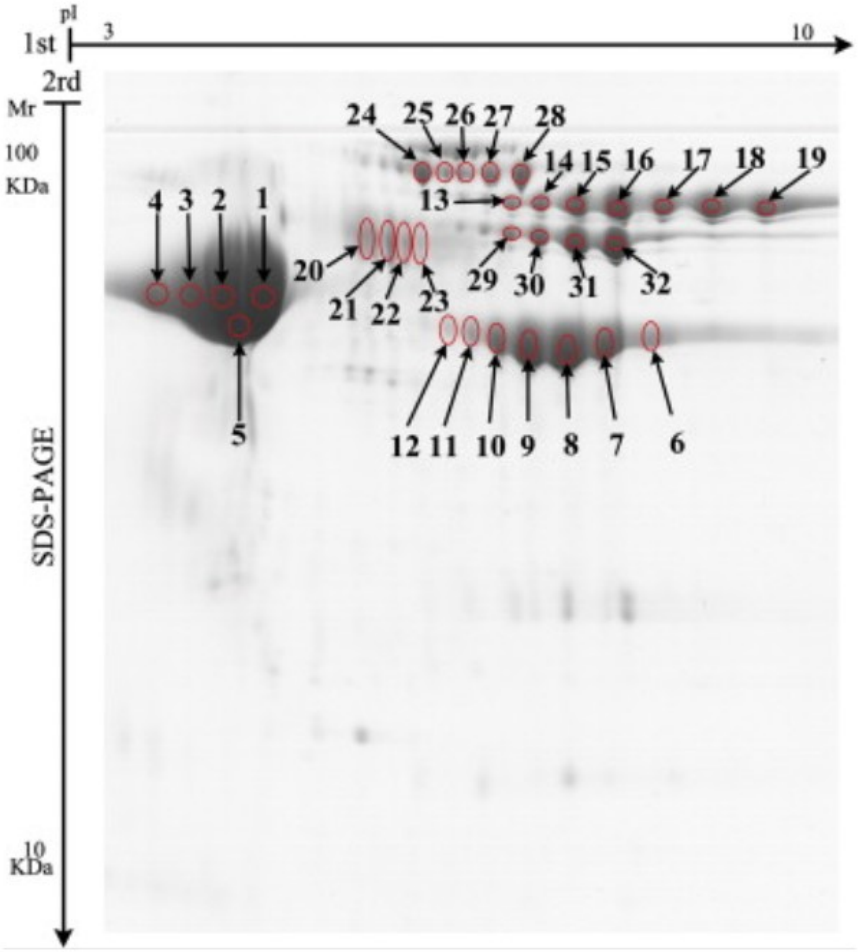
Syntézou polypeptidových řetězců na ribozomech se obvykle nezíská plně funkční protein. Nově vytvořený polypeptidový řetězec musí podstoupit určité chemické modifikace mimo ribozom. Tyto modifikace jsou nejčastěji řízeny enzymy a dochází k nim po přečtení informací

poskytnutých templátovou RNA (mRNA), tedy po překladu mRNA. Tyto další procesy se nazývají posttranslační úpravy.

Procesy posttranslační modifikace proteinu lze rozdělit do dvou hlavních skupin. První skupina jsou proteolytické procesy, jedná se tedy hlavně o štěpení určitých peptidových vazeb, což vede k odstranění některých vytvořených polypeptidových fragmentů. Druhá skupina se skládá z procesů, které modifikují postranní řetězce aminokyselinových zbytků a obvykle neinterferují s hlavním řetězcem polypeptidu. Chemická podstata a funkce těchto modifikací je různorodá. Kromě toho je každý typ modifikace charakteristický pro určité skupiny aminokyselinových zbytků. Výsledkem těchto procesů je, že je proteom buňky nebo organismu obohacen o další složky než jsou pouze ty, které jsou kódovány geny.

Existují čtyři hlavní skupiny proteinových funkcí, které vyžadují posttranslační modifikace aminokyselinových zbytkových řetězců. Funkční aktivita velkého počtu proteinů vyžaduje přítomnost určitých protetických skupin kovalentně vázaných na polypeptidový řetězec. Jsou to nejčastěji složité organické molekuly, které se přímo podílejí na aktivitě bílkovin. Transformace neaktivních apoproteinů do enzymů je jednou z těchto modifikací. Další důležitá skupina posttranslačních modifikací reguluje biochemické procesy změnami enzymatické aktivity. Další velká skupina úprav jsou proteinová značení, která zajišťují intracelulární lokalizaci proteinů, včetně značení proteinů pro transport do proteazomu, kde jsou následně hydrolyzovány a naštěpeny. Některé posttranslační úpravy přímo resp. nepřímo ovlivňují prostorovou strukturu nově syntetizovaných proteinů [37].

Mezi nejčastější posttranslační modifikace u MRJP patří fosforylace, glykosylace a deamidace. Právě tyto posttranslační modifikace (PTM) by mohly mít za následek různé hodnoty izoelektrických bodů, které byly zjištěny u MRJP1-5 při dvourozměrné gelové elektroforéze (2-DE) [38]. U všech devíti proteinů mateří kašičky, MRJP1-9, bylo detekováno několik fosforylačních a glykosylačních míst. V další práci studující posttranslační modifikace u MRJP, byly zjištěny N-vázané oligosacharidy typu manózy (72 %), biantenárního typu (8 %) a struktury hybridního typu (3 %) [15]. Ve studii od Zhang z roku 2012 bylo pomocí metody 2-DE získáno celkem 32 skvrn (obr. č. 4) s molekulovou hmotností od 49 do 80 kDa a pI od 4,00 do 9,00. Těchto 32 skvrn bylo identifikováno jako MRJP1–5 [38].



Obrázek 4: Separace proteinů mateří kašičky metodou 2D-PAGE (Zhang, 2012)

3.1. Glykosylace

Glykosylace je nejčastější modifikační cestou v posttranslační modifikaci proteinu. Odhaduje se, že více než 50 % proteinů v přírodě je glykosylováno; z toho je více než 70% glykoproteinů N-glykosylovaných. N-vázané glykany jsou kovalentně vázány k asparaginovému (N) postrannímu řetězci s motivem Asn-X-Ser / Thr a lze je rozdělit do tří tříd podle složení monosacharidů a jejich větvení. Glykosylace proteinů hraje velmi důležitou roli při regulaci mnoha biologických procesů, včetně buněčné proliferace, buněčného růstu a imunitní aktivity. Normální fyziologická funkce glykoproteinu přímo souvisí s povahou monomeru glykanového řetězce na jeho proteinu. Přestože jsou MRJP označovány jako glykoproteiny, bylo v MK identifikováno pouze 12 různých N-glykanů [39].

MRJP1 je N-vázaný glykoprotein, u kterého může glykosylace probíhat na třech různých místech. Tato místa nacházíme v sekvencích ESLNKSL, jedná se o jedinečnou strukturu komplexního typu ukrývající T-antigen, VAVNATT a GLVNNTQ (obě struktury typu

manózy). U MRJP2 může probíhat glykosylace na dvou různých místech. U MRJP2, který obsahuje N-vázaný cukerný řetězec typický pro manózu, a u homologu MRJP2, MRJP2a. Tomuto homologu MRJP2 chybí první čtyři a posledních dvacet čtyři aminokyselin. Jde o GLVNRTV (N-vázaný typ, struktury biantennárního nebo triantennárního typu) a IAVNATT (struktura manózového typu). Pro MRJP3 bylo prokázáno, že se jedná o N-vázaný glykoprotein [15].

3.2. Fosforylace

Reverzibilní fosforylace u proteinů je jednou z nejrozšířenějších a nejdůležitějších PTM, které ve většině případů probíhají na postranních řetězcích zbytků serinu, treoninu a tyrozinu [40, 38]. Hraje klíčovou roli v mnoha biologických procesech jako je buněčné dělení, signální transdukce, regulace lokalizace proteinů a regulace aktivity enzymů. Kromě toho může fosforylace v sekrečních proteinech, jako je kasein v mléce, stabilizovat vysoké hladiny fosforečnanu vápenatého pro tvorbu micel, což zvyšuje nutriční hodnotu proteinů. Proto se předpokládá, že fosforylované MRJP1 a MRJP2 podporují vydatnější výživu, která je vyžadována pro vysoké nutriční nároky rychle rostoucích larev včel a aktivní královny snášejících vajíčka [38]. Při fosforylaci může dojít ke změně pI proteinu ze zásaditého na kyselý poskytnutím záporného náboje postranním řetězcům serinových, threoninových a tyrosinových zbytků [40, 38]. Fosforylace byla nalezena kromě u MRJP1-2 i u MRJP7, ale nebyla prokázána u MRJP3–5 [15, 38].

3.3. Methylace

Methylace bílkovin obvykle probíhá na atomech kyslíku v karboxylátech postranního řetězce kyseliny asparagové a kyseliny glutamové nebo někdy na nukleofilních postranních řetězcích amidových dusíků asparaginu, glutaminu, ε-aminu lyzinu a imidazolového kruhu histidinu. Při této reakci dochází ke zvýšení hydrofobicity bílkovin [38]. Překrytím negativního náboje na postranním řetězci karboxylátu výše uvedených aminokyselin může methylace změnit pI proteinu z kyselého na bazický. Kromě toho dochází k deamidaci bílkovin na zbytcích glutaminylu a asparaginylu, což může změnit strukturu bílkovin a tím dále ovlivnit jejich vlastnosti. Methylace ve většině MRJP naznačuje, že mají hlavní roli při tvorbě vysoce viskózních micel v MK [40, 38]. Methylační modifikace může zvýšit nízkou reaktivitu dusíku karboxamidové skupiny asparaginu N-glykosylaci proteinů, tj. modifikace methylem by tím tedy mohla zvýšit glykosylaci proteinů [40].

U MRJP1-5 a stejně tak i u MRJP7 dochází k methylaci [15]. Potenciální methylace MRJP ukázala, že téměř všechny proteinové skvrny na 2-DE byly methylace kyseliny asparagové (D) nebo kyseliny glutamové (E) [15, 38]. Z analýzy PTM MRJP v práci Zhang a kol. (2012) vyplývá, že ve spotech 1–5 (obr. 4) (MRJP1) bylo pozorováno 11, 3, 8, 9 a 6 methylovaných míst. Ve spotech 6–12 (obr. 4) (MRJP2) byla pozorována 2, 4, 5, 5, 3, 3 a 3 methylační místa. Skvrny 14–19 (obr. 4) (MRJP3) měly 2, 2, 3, 2, 5 a 5 methylačních míst, přestože žádná nebyla pozorována v místě 13. Kromě toho skvrny 21–23 (obr. 4) (MRJP 4) měly 1, 2 a 2 methylační místa, zatímco skvrna 20 (obr. 4) (MRJP4) žádné neměla. Na místě 24 (obr. 4) (MRJP5) nedošlo k žádné methylaci, ale místa 25–28 (obr. 4) měla 1, 2, 3 a 3 metylační místa. U skvrn 29–32 (obr. 4) (MRJP 3) byly pozorovány 0, 1, 2 a 3 methylační místa [38].

3.4. Deamidace

Deamidace v proteinech je spontánní neenzymatická reakce, ke které dochází na glutaminylových a asparaginylových zbytcích, když u proteinů dochází k degradaci. Deamidace byla zjištěna u většiny MRJP. Kromě MRJP3 měly všechny ostatní MRJP míry deamidace (počet deamidovaných peptidů / celkový počet peptidů) vyšší než 25 %. Rychlost deamidace proteinů závisí například na primární sekvenci proteinu a teplotě [38]. Vyšší míra deamidace (> 25 %) všech MRJP, kromě MRJP3, naznačuje, že deamidační reakci lze snadno zahájit vysokou teplotou, čímž se sníží kvalita degradace proteinů mateří kašičky. MK je citlivá na teplotu a při krátkodobém udržování při pokojové teplotě významně degraduje [41]. Relativně nižší rychlost deamidace v MRJP3 naznačuje, že se jedná o zásobárnu zpracovatelného dusíku, která vyžaduje relativně větší stabilitu [41, 38]. Vzhledem k této biochemické povaze by měla být mateří kašička udržována za nižší teploty, aby se udržela kvalita a aby se zabránilo deamidační reakci [41].

4. Metody analýzy MRJP

Pomocí elektroforetických a chromatografických metod můžeme separovat a identifikovat tisíce proteinů, ale žádná jednotlivá metoda nemůže rozlišit všechny proteiny v proteomu vzhledem k jejich velkému počtu a koncentračnímu rozsahu [42]. Proteomický výzkum zahrnuje přípravu vzorků, separaci proteinů, jejich identifikaci a interpretaci dat. Příprava vzorku je prvním kritickým krokem, který ovlivňuje výsledek celé proteomické analýzy. Dalším krokem je separace proteinů. Využívají se multidimenzionální separační techniky, které jsou schopny poskytnout rozlišení tisíců proteinových druhů. Patří mezi ně dvourozměrná

elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE) a kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (LC – MS) [43].

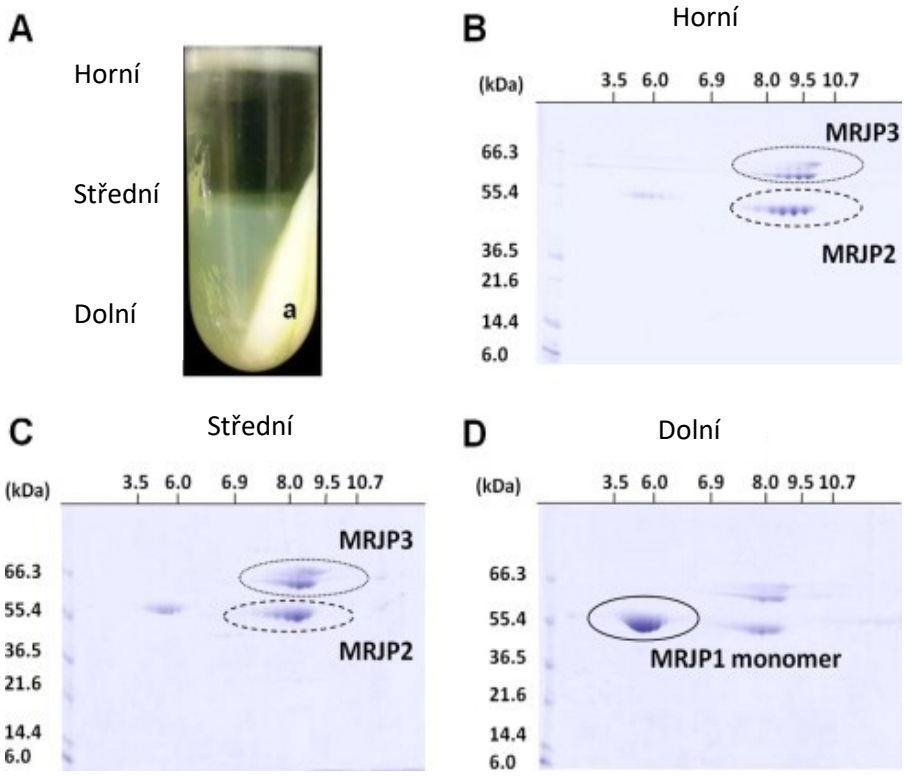
4.1. Izolace MRJP

Abychom mohli MRJP analyzovat, musíme je nejprve extrahovat z MK. V současné době je nejčastěji používanou metodou izolace bílkovin dialýza s destilovanou vodou, může následovat lyofilizace dialyzátu. Tato metoda odstraňuje nízkomolekulární a interferující sloučeniny, jako jsou např. cukry, pasivně selektivní difúzí skrze semipermeabilní membránu [1]. Při extrakci rozpustných proteinů MK (SRJP) po dialýze následuje samotná extrakce disolucí. Izolace cílové frakce z MK dialýzou je však časově náročná. Dialyzační systém vyžaduje nejméně 7 dní na dokončení procesu extrakce. Další nevýhodou této extrakční metody založené na dialýze je nízký výtěžek [16]. Existují i další metody k izolaci proteinů, které využívají sloučeniny jako je wolframan sodný, síran amonný nebo srážení acetonem. Používá se i kombinace dialýzy bílkovin a srážení [1].

V roce 2019 Bocian vyvinul novou extrakční metodu s použitím nasyceného roztoku fenolu. Extrakce fenolem byla provedena u vzorků medu. Vzorky medu zředěné deionizovanou vodou byly smíchány s fenolem a vortexovány po dobu 15 minut. Poté byly odstředěny a ponechány srážet přes noc roztokem octanu amonného v methanolu. Bylo provedeno další odstředění, rozpuštění v pufru a takto připravené vzorky byly připraveny k analýze pomocí 2D elektroforézy [1].

Metoda, která zpracovává MK nejprve ultracentrifugací, je oproti dalším metodám extrakce MRJP technicky méně náročná a výtěžnost této metody je vyšší. Avšak z ekonomického hlediska je náročná z důvodu vysokých nákladů na ultracentifugační zařízení. Tato metoda poskytla vodné roztoky MRJP, u kterých byla výsledná koncentrace proteinu více než 1,7krát vyšší než koncentrace získaná sedmidenní dialýzou. Výsledný výtěžek množství celkových proteinů pomocí této metody byl více než 10krát vyšší než výtěžek získaný dialýzou.

Ultracentrifugace MK po dobu 1 hodiny vedla k viditelné třívrstvé separaci supernatantu viz obrázek č. 5. Horní a střední vrstva měla vysoký obsah MRJP2 (52 kDa) a MRJP3 (60-70 kDa). MRJP1 (55 kDa), který měl podobnou molekulovou hmotnost jako MRJP2 a MRJP3, byl přítomen ve spodní vrstvě ve formě oligomeru [44].



Obrázek 5: Ultracentrifugace a dvojrozměrná elektroforéza MK - barveno Coomassie Brilliant Blue (Nozaki, 2012)

Li a kol. použili pro přípravu proteinů před elektroforetickým stanovením ultrazvukovou extrakci do fosfátového pufru (pH 7,6). Po odstředění byl supernatant převeden do zkumavky s lyzačním pufrem (8 M močovina, 2 M thiomočovina, 4% CHAPS, 20 mM Tris-báze, 30 mM DTT a 2% biolytu pro pH v rozmezí 3 - 10), opět ultrazvukován a odstředěn. K supernatantu byla přidána kyselina trichloroctová a poté byla směs udržována na ledu, aby došlo k vysrážení a odsolování proteinu. Následovala dvě odstředění, homogenizace a úprava pH na hodnotu 7,0 pomocí NaOH. Tento extrakt musí být do doby analýzy uchováván při -70 °C. [41].

4.2. Elektroforetické metody

Elektroforéza je poměrně jednoduchá, rychlá a velmi citlivá metoda, které se využívá ke studiu vlastností proteinů. Separace proteinů je založena na faktu, že nabité molekuly migrují skrze gel díky elektrickému poli, které je vytvářeno elektrodami. Nejobvyklejším typem gelu je agarózový či polyakrylamidový. Agaróza je především využívána k separaci velkých makromolekul jako jsou například nukleové kyseliny, kdežto polyakrylamidový gel se využívá k separaci proteinů. Polyakrylamidový gel může být použit ke zjištění velikosti, množství, čistoty a izoelektrického bodu polypeptidů a proteinů [45]. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu se běžně nazývá zkratkou PAGE.

4.2.1. Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Jednorozměrné separace jsou pro účinné rozdělení komplexních proteinových směsí nedostatečné. Kombinace dvou elektroforetických procesů na gelu v pravém úhlu by měla poskytnout mnohem větší míru rozlišení, než je možné u obou samostatně [42]. Dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (2D-PAGE) je účinná separační technika, která umožňuje rozlišení tisíců proteinů. Její schopnost vysokého rozlišení vychází ze skutečnosti, že první a druhý rozměr jsou založeny na dvou nezávislých charakteristikách proteinu [46]. Proteiny jsou rozděleny na gelu pomocí izoelektrické fokusace (IEF), která odděluje proteiny v první dimenzi podle jejich izoelektrického bodu, a dále je následována elektroforézou ve druhé dimenzi v přítomnosti dodecylsíranu sodného (SDS), který odděluje proteiny podle jejich molekulové hmotnosti [42].

Zavedením imobilizovaných pH gradientových gelů pro IEF, které jsou komerčně dostupné, je možné oddělit dostatečné množství proteinů pro další charakterizaci a generovat vysoce reprodukovatelné 2D mapy. Po separaci jsou proteiny ve 2D gelech obvykle barveny Coomassie Brilliant Blue (CBB) nebo modifikovaným stříbrným barvením, které je kompatibilní s následnou analýzou MS. 2D gely jsou digitalizovány a výsledné gelové obrazy jsou kvalitativně a kvantitativně analyzovány pomocí specializovaných softwarových programů. Tímto způsobem lze kvantifikovat proteiny a srovnávat a porovnávat bodové vzory ve více gelech. Statistickou analýzu lze provádět na skupinách prvků (skvrn) v sadách gelů a lze hodnotit variace, rozdíly a podobnosti [46].

Na obrázku 4 (str. 23) bylo zobrazeno rozdělení proteinů mateří kašičky pomocí dvourozměrné gelové elektroforézy. Vzorek proteinu byl podroben 2D-PAGE a proteiny byly obarveny CBB G-250. K identifikaci byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS).

4.2.1.1. Imobilizovaný pH gradient

Imobilizovaný pH gradient (IPG) umožňuje tvorbu stabilních a reprodukovatelných gradientů pH schopných fokusovat kyselé a bazické proteiny na jediném gelu, který je v širokém rozmezí pH. V IPG jsou nosné amfolyty připojeny k molekulám akrylamidu a odlévány do gelů za vzniku fixního gradientu pH. Fixace gradientu brání driftu v gelu a také zajišťuje, že mohou být odlévány efektivním a reprodukovatelným způsobem. Použití IPG stripů s úzkým rozsahem umožnilo oddělit větší počet proteinů, než bylo možné u standardní 2D-PAGE, protože užší rozsah pH byl rozložen na větší fyzickou vzdálenost. Toto rozšíření

umožnilo oddělit proteiny s podobnými hodnotami izoelektrických bodů (pl) s vyšším rozlišením [42].

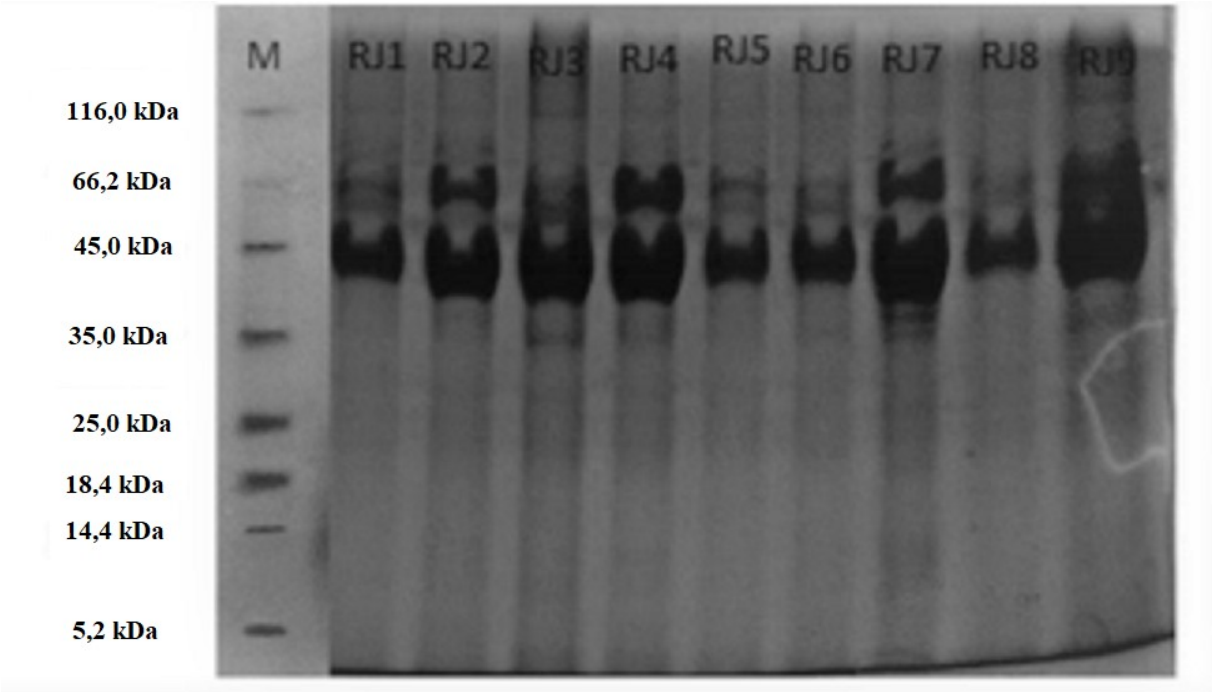
4.2.1.2. Izoelektrická fokusace

Izoelektrická fokusace (IEF) je separační metoda pro amfoterní molekuly a biočástice, neboli částice schopné vykazovat pozitivní, negativní nebo nulový elektrický náboj jako funkci pH. V přítomnosti elektrického pole a gradientu pH nabité částice elektroforeticky migrují, dokud nejsou kondenzovány nebo zaostřeny v poloze, která odpovídá jejich izoelektrickému bodu, kde se jejich čistý náboj blíží nule. Malé molekuly, komplexní makromolekuly a biočástice lze tedy oddělit, pokud se jejich izoelektrické body (pH s nulovým nábojem) liší [47].

4.2.1.3. Jednorozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu

Nejčastěji používaným elektroforetickým uspořádáním je jednorozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu, která je poměrně jednoduchou a cenově dostupnou metodou. Existuje velké množství variant [45]. Nejčastěji se provádí v polyakrylamidových gelových tyčinkách, skleněných nebo plastových zkumavkách obsahujících amfolyty [42]. Tento typ elektroforézy s polyakrylamidovým gelem a dodecylsíranem sodným se označuje jako SDS-PAGE. Při této metodě dochází k denaturaci proteinů a výsledkem analýzy je přesné rozdělení proteinů podle jejich molekulové hmotnosti [45].

Ve studii Çakira z roku 2019 byla frakce supernatantu použita pro profily proteinů z 9 vzorků mateří kašičky klasickou SDS-PAGE. Mateří kašička byla rozpuštěna v roztoku NaCI a odstředěna. Gelová elektroforéza byla provedena při laboratorní teplotě, při 40-50 mA a běžela přibližně 3 hodiny. Po elektroforéze byly gelové desky obarveny CBB R-25. Proteinový marker byl proveden paralelně se vzorkem včelího jedu stanoveným Sirin et al., 2016. V Cakirově studii nedošlo k velmi dobré separaci proteinů, ale pouze ke vzniku dvou velkých skvrn (obr. 6), což naznačuje, že tyto skvrny se soustřeďují ve stejné oblasti u všech vzorků mezi 40 a 70 kDa [48].

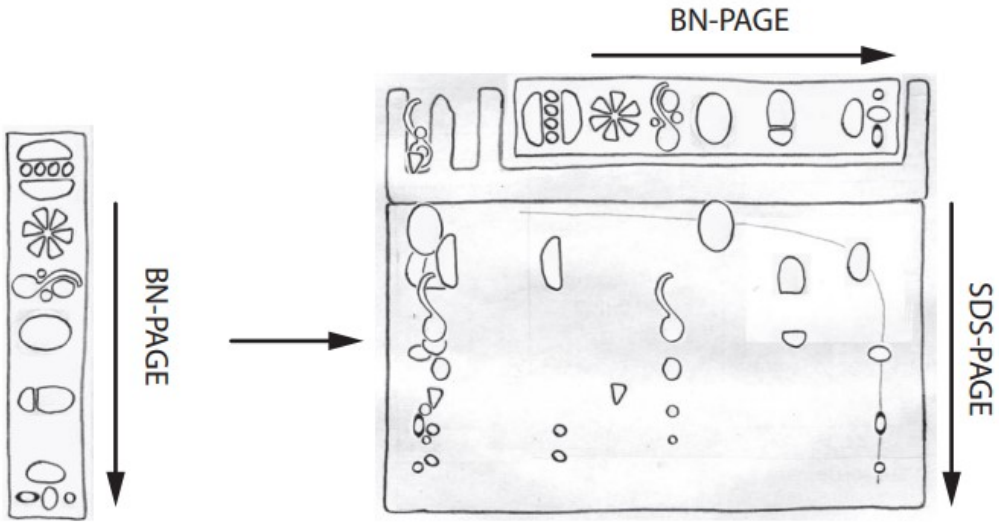


Obrázek 6: SDS-PAGE vzorků mateří kašičky (Cakir, 2019)

4.2.1.4. Modrá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza

Modrá nativní polyakrylamidová gelová elektroforéza (BN-PAGE) má výhody pro studium multiproteinových komplexů (MPC) v tom, že může poskytovat informace o velikosti, počtu, složení bílkovin, stechiometrii nebo relativním množství MPC. V BN-PAGE se používá barvivo Coomassie Blue (CB), které se nespecificky váže na všechny proteiny. Elektroforetická mobilita MPC je určena záporným nábojem vázaného barviva CB a velikostí a tvarem komplexu. Barvivo nepůsobí jako detergent a zachovává strukturu MPC. Na rozdíl od jiných nativních systémů gelové elektroforézy jsou MPC odděleny nezávisle na jejich izoelektrickém bodě, a proto lze odhadnout velikost MPC. Kromě toho vazba CB na proteiny snižuje jejich tendenci k agregaci během stohovacího procesu elektroforézy [49].

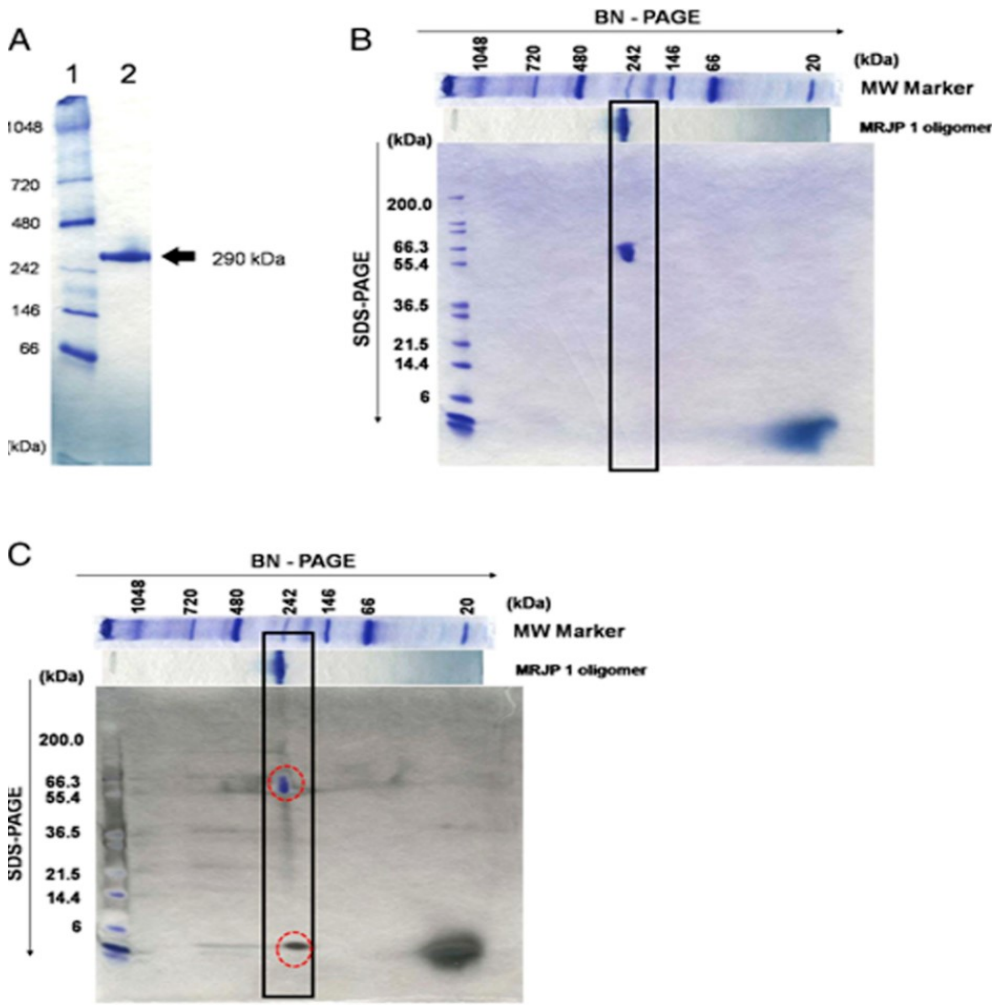
Princip BN-PAGE je znázorněn na obrázku 7. Proteiny a MPC jsou odděleny za nativních podmínek v prvním rozměru BN-PAGE. Pro dvojrozměrné BN-PAGE a SDS-PAGE jsou proteiny a / nebo MPC denaturovány SDS v gelovém proužku poté, co jsou odděleny BN-PAGE. Poté jsou aplikovány na gel druhého rozměru SDS-PAGE. Hyperbolický tvar úhlopříčky ve dvourozměrném gelu je způsoben gradientovým gelem v první a lineárním gelem ve druhé dimenzi. Monomerní proteiny jsou umístěny na diagonále a komponenty MPC pod diagonálou.



Obrázek 7: BN PAGE a BN/SDS PAGE proteinových komplexů (Swamy a kol., 2006)

4.2.1.5. Kombinace 2D BN/SDS-PAGE

Ve studii o oligomeru MRJP1od Tamura, byl protein ve vzorku smíchán s pufrem pro vzorek NuPAGE dodecylsíranem lithným (LDS) s 50 mM dithiotreitolu. Následně byl po dobu 5 minut povařen při 100°C. Směsi vzorků se aplikovaly na NuPAGE 4–12 % bis-tris polyakrylamidové gely. Running Buffer se připravil za použití pufru NuPAGE MES SDS. SDS-PAGE byla prováděna při konstantní hodnotě 200 V. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit nezbarvený standard Mark 12. Při barvení pomocí CBB byl oligomer MRJP1 detekován pouze jako skvrna 55 kDa (obr. 8B), zatímco dvě skvrny (55 a 5 kDa) byly vizualizovány na stejné ose po dvojitém barvení barvením CBB a stříbrem (obr. 8C). Při elektroforetické analýze bylo potvrzeno, že 5 kDa protein bylo obtížné detekovat barvením CBB z důvodu nízké afinity k tomuto barvivu. Při analýze pomocí BN/SDS-PAGE byl 55 kDa protein identifikován jako MRJP1 (*Apis mellifera*). Tyto výsledky naznačují, že oligomer MRJP1 je složen ze dvou typů proteinu: monomeru MRJP1 a proteinu 5 kDa. Dále byl také zkoumán objemový poměr dvou skvrn na BN/SDS-PAGE stříbrem obarvených gelech. Poměr objemů mezi monomerem MRJP1 a proteinem 5 kDa byl přibližně 5,17. S největší pravděpodobností to vychází z toho, že během tvorby oligomeru je navázáno na jeden 5 kDa protein pět monomerů MRJP1 [17].



Obrázek 8: Elektroforetická analýza oligomeru MRJP1 (Tamura a kol., 2009)

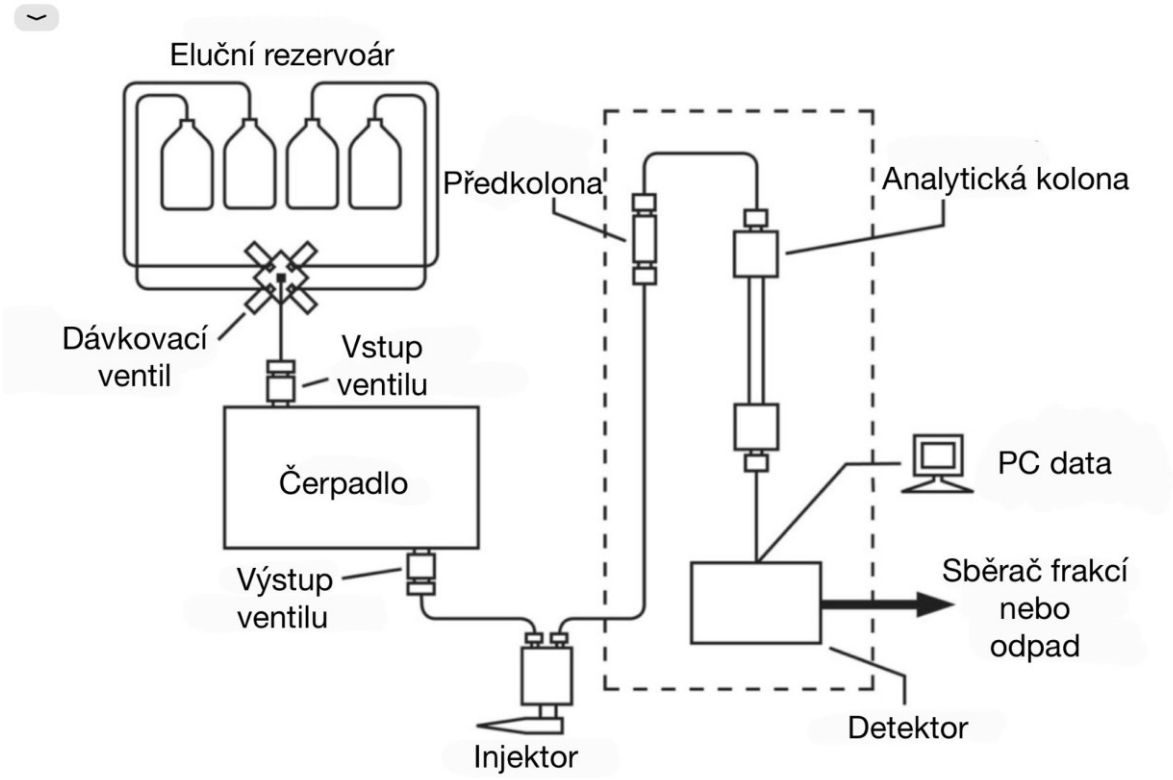
4.3. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je vhodná zejména pro separaci vysoce polárních látek a látek o velké molekulové hmotnosti, tedy i proteiny [50]. Techniky kapalinové chromatografie (např. iontová výměna, vylučování podle velikosti, afinitní chromatografie a separace na reverzních fázích) patří mezi nejčastější metody separace proteinů [43]. Nejčastěji využívanou metodou kapalinové chromatografie pro proteomiku je HPLC (High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Vzorky pro proteomickou analýzu jsou k dispozici ve velkých množstvích. Analyty jsou však přítomny v nepatrných koncentracích, proto byly vyvinuty čerpací systémy pro poskytování průtoků v rozsahu nl/min. Využívá se převážně nano-HPLC, kde je průtok 200–300 nl/min skrze separační kolony o vnitřním průměru 75–100 μm [51]. Jako další typ kolon se využívají monolitické kolony, které se objevily jako alternativa propustného materiálu k minimalizaci protitlaku systému. Monolity jsou definovány jako souvislá pevná struktura připomínající porézní výplňový

materiál. Analytické kolony obsahující monolity vykazují nižší odpor vůči průtoku částic analytu při prováděné analýze [52, 53].

Nano-HPLC, která může být uspořádána jako chromatografie na reverzních fázích (RP-HPLC), využívá k separaci proteinů nepolární stacionární fázi, jejíž volba má největší dopad na separaci sledovaných proteinů a peptidů. Účinnost separace látek je určena vlastnostmi stacionární fáze, jako např. velikost částic. Typicky se pro analytickou separaci proteinů, peptidů nebo jiných molekul používají velikosti částic 3 a 5 μm. Účinnost separace se zvyšuje o 30–40 %, když se velikost částic sníží z 5 na 3 μm pro stejnou délku kolony. Částice, které jsou menší než 3 μm a které je obtížné vyrobit v jednotné velikosti a naplnit do kolony, zvyšují protitlak nad mezní hodnotu tlaku většiny komerčně dostupných systémů HPLC [43]. Miniaturizovanou HPLC lze konfigurovat se dvěma nebo více pumpami, dojde tedy k odstranění problému s omezeným množstvím rozpouštědla v zásobníku. Navíc tato funkce umožňuje kontinuální tok mobilní fáze v izokratickém režimu nebo provádění gradientového režimu s konečným objemem rozpouštědla [54].

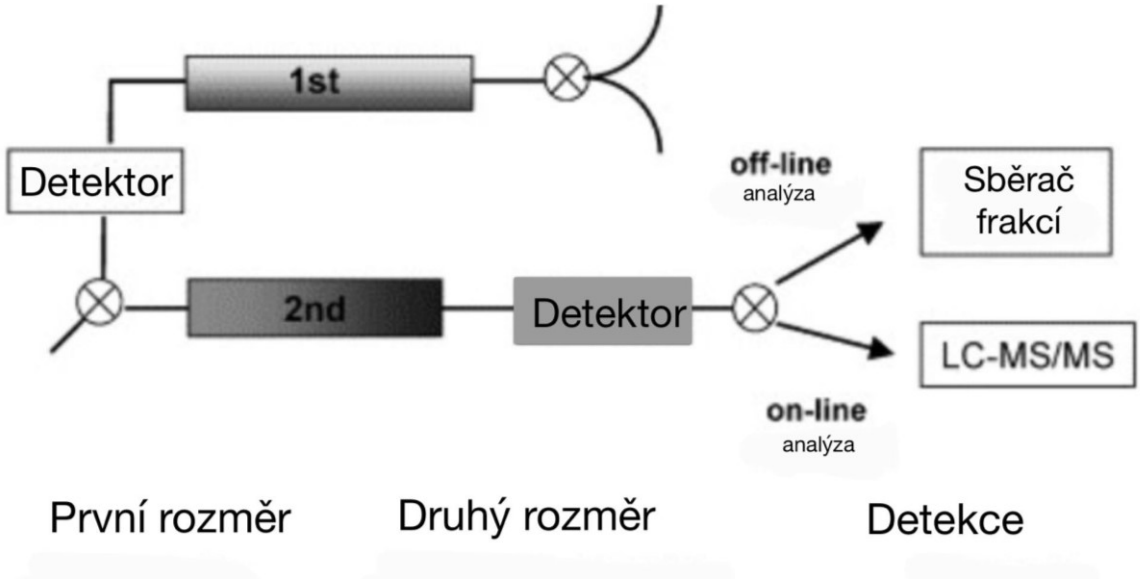
Schematický diagram základního systému HPLC je uveden na obr. 9. Mezi hlavní součásti tohoto systému patří čerpadlo, injektor, kolona, detektor a počítač. Důležité jsou také zásobníky mobilní fáze a sběrač frakcí, který se používá, pokud je zapotřebí další analýza oddělených složek [55]. V kapilární, nano nebo čipové LC byly použity další techniky detekce, jako jsou světelné diody, laserem indukovaná fluorescence a elektrochemická detekce. Nevýhodou jsou neadekvátní kvalitativní informace o cílových sloučeninách [54].



Obrázek 9: Schéma systému HPLC (Reuhs, 2017)

4.3.1. Dvourozměrná kapalinová chromatografie

V tradiční dvourozměrné kapalinové chromatografii (2D LC) je k dispozici téměř jakákoli kombinace stacionárních fází s různými retenčními vlastnostmi (obr. 10). Jelikož většina současných 2D LC systémů je propojena s hmotnostními spektrometry, musí být výběr pro separaci první dimenze doplněn chromatografií s reverzní fází ve druhé dimenzi, protože v tomto případě jsou vzorky eluované z kolony RP v nejžádanější formě pro nástřik do hmotnostního spektrometru. V tomto typu analýzy jsou nejvhodnější pro primární chromatografickou separaci molekulová vylučovací chromatografie a iontově výměnná chromatografie [43].



Obrázek 10: Dvourozměrná kapalinová chromatografie (Neverova, 2005)

4.4. Hmotnostní spektrometrie

Hmotnostní spektrometrie (MS) je analytická technika používaná ke stanovení hmotnosti atomů nebo molekul. Díky fragmentaci iontů poskytuje také strukturální informace [56]. Analýza biomolekul, jako jsou proteiny a peptidy, v hmotnostním spektrometru vyžaduje, aby analyt tvořil nabitý iont v plynné fázi. Vývoj účinných nedestruktivních ionizačních metod umožňuje analýzu intaktních biomolekul pomocí MS bez významné degradace vzorku. Nejčastěji používanými postupy těchto ionizací jsou ionizace elektrosprejem (ESI) a matricová laserová desorpční (MALDI) [57].

Nejběžnější metodou pro studium proteinů založenou na MS je metoda bottom-up nebo shotgun. Ve studiích proteomiky bottom-up je izolována směs proteinů enzymaticky nebo chemicky štěpena na peptidy. Výsledná směs komplexních peptidů se frakcionuje za použití chromatografie a dalších metod. Po chromatografické separaci na reverzní fázi jsou peptidy eluované z chromatografické kolony ionizovány elektrosprejovou ionizací (ESI) a analyzovány pomocí MS. Přednost MS nespočívá jen v přesnosti měření hmotnosti v částech na milion (ppm), ale ve schopnosti provádět tandemová měření MS (MS/MS), která poskytují další informace specifické pro peptidovou aminokyselinovou sekvenci. Typická LC MS/MS zahrnuje získání předběžného hmotnostního spektra intaktního peptidu, disociaci požadovaného izolovaného prekurzorového iontu na menší fragmenty a následnou hmotnostní

analýzu fragmentů. Fragmentace peptidů je obvykle výsledkem srážky vyvolané disociace nebo alternativních technik, jako je disociace elektronového záchytu nebo disociace elektronového přenosu. Obě metody elektronové fragmentace poskytují lepší pokrytí sekvencí větších analytů [58].

MS je preferovanou technikou pro charakterizaci a kontrolu kvality rekombinantních proteinů a další makromolekuly. Je také běžně používána pro identifikaci proteinů. Protože pomocí MS se stanovuje molekulová hmotnost proteinu, je tato metoda volena pro detekci a charakterizaci posttranslačních modifikací a potenciálně může identifikovat jakoukoli kovalentní modifikaci, která mění hmotnost proteinu. V MS lze využít různé principy separace iontů, např. analyzátor doby letu (TOF), tzv. kvadrupól nebo separaci selektivním vypuzováním iontů ze tří dimenzionálního zachycovacího pole (iontová past nebo iontový cyklotron s Fourierovou transformací) [59].

Hmotnostní spektrometr je zařízení, které se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Iontový zdroj se používá k výrobě iontů v plynné fázi, hmotnostní analyzátor oddělí ionty podle jejich poměru m/z (hmotnosti k náboji) a detektor registruje ionty pro každý poměr m/z. Hmotnostní spektrometr může nebo i nemusí být spojen s některou separační technikou: plynovou nebo kapalinovou chromatografií nebo kapilární elektroforézou [56].

4.4.1. MALDI

Matricová laserová desorpční ionizace je metoda „měkké ionizace“. Ke generování plynné fáze, protonovaných molekul, velkého přebytku matricového materiálu je současně vysrážen s molekulami analytu (tj. s molekulami, které mají být analyzovány) pipetováním submikrolitrového objemu směsi na kovový substrát a nechává se vyschnout. Výsledná pevná látka je pak ozářena nanosekundovými laserovými pulzy, obvykle z malých dusíkových laserů s vlnovou délkou 337 nm. Matrice je obvykle malá organická molekula s absorbcí na vlnové délce použitého laseru. Při práci s biomolekulami se téměř výlučně používají matrice kyseliny α-kyano-4-hydroxyskořicové nebo kyseliny dihydroxybenzoové (DHB). Matrice se liší v množství energie, které dodávají biomolekulám během desorpce a ionizace, a tím způsobují stupeň fragmentace (unimolekulární rozpad). Pro MALDI existují různé možnosti přípravy vzorku. Například matrice může být nanesena v mikrokrystalickém tenkém filmu na podklad, což vede k lepší přilnavosti, aby bylo možné vzorek lépe umýt, a které také představuje větší krystalický povrch, ze kterého mohou být ionty desorbovány. Příměs s matricí může být

prospěšná; například nitrocelulóza zvyšuje rovnoměrné zastoupení peptidů a fruktóza může snížit energetický stav desorbovaných iontů [57].

4.4.2. Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem

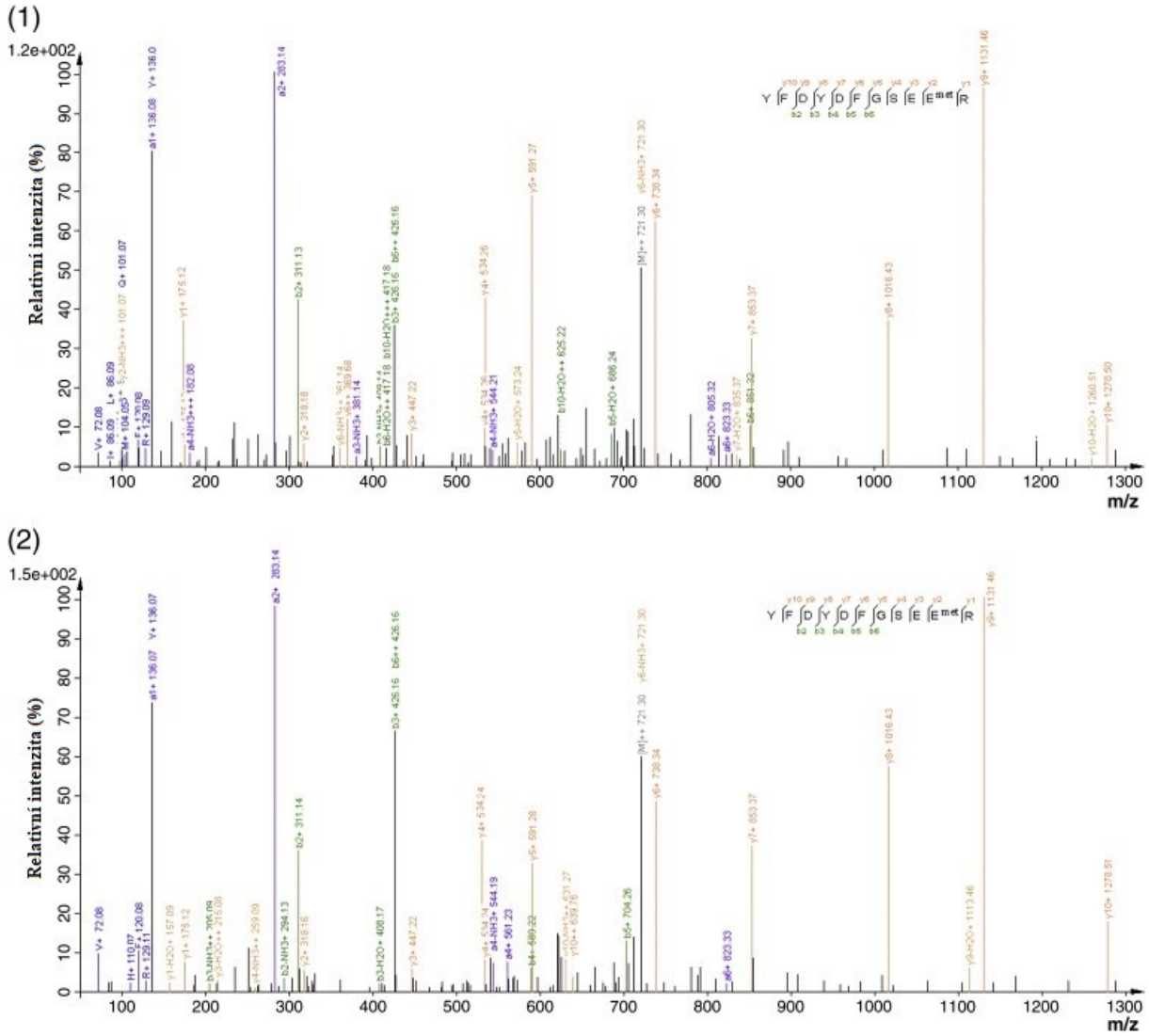
Hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (ESI-MS) byla vyvinuta pro použití v hmotnostní spektrometrii biologických vzorků. Kapalina obsahující analyt je čerpána při nízkých rychlostech (mikrolitr za minutu) hypodermickou jehlou při vysokém napětí vůči elektrostatickému rozptylu nebo elektrosprejem, který tvoří mikrometrické kapičky, které se rychle odpařují a které předávají svůj náboj molekulám analytu. Tento ionizační proces probíhá ve vakuu a je proto velmi citlivý (bez fragmentace analytových iontů v plynné fázi) [57].

Ve studii z roku 2012 byly proteiny MK separovány na 2-DE obarveny CBB a vzniklé skvrny (obr. 4 str. 23) byly dále analyzovány. Skvrny 1–5 (obr. 4) byly pomocí hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem jednoznačně určeny jako MRJP1 (pokrytí sekvence > 70%), se stejnou teoretickou molekulovou hmotností (49,31 kDa) a pI (5,10), ačkoli jejich experimentální pI se posunulo (5,10 – 5,47). Skvrny 6 – 12 (obr. 4) byly stanoveny jako prekurzor MRJP2 (pokrytí sekvence ~ 70%), se stejnými hodnotami teoretické molekulové hmotnosti (51,44 kDa) a pI (6,83). Zde se experimentální pI (6,51–7,51) stále lišilo. Skvrny 13-19 (obr. 4) byly identifikovány jako MRJP3 (pokrytí sekvence ~ 50 %) vykazující stejnou teoretickou molekulovou hmotnost (61,62 kDa) a posunutý pI (teoretický ~ 6,47 a experimentální 6,76–8,25). Skvrny 20–23 (obr. 4) byly identifikovány jako MRJP4 (pokrytí sekvence ~ 50 %) vykazující stejnou teoretickou molekulovou hmotnost (53,32 kDa) a posunutý pI (teoretický ~ 5,89 a experimentální 6,28–6,43). Spoty 24–28 (obr. 4) byly detekovány jako MRJP5 (pokrytí sekvence 34–47 %) se stejnou teoretickou molekulovou hmotností (70,48 kDa) a posunutým pI (teoretický ~ 6,11 a experimentální 6,45–6,79). Skvrny 29–32 (obr. 4) byly také identifikovány jako MRJP3 (pokrytí sekvence ~ 50 %) a vykazovaly stejnou teoretickou molekulovou hmotnost (61,62 kDa) a posunutý pI (teoretický ~ 6,47 a experimentální 6,77-7,34). Tyto výsledky potvrdily PTM vzniklé fosforylací, methylací a deamidací u MRJP1-5 [38].

4.4.3. Hmotnostní spektrogram peptidu MK

Na obrázku 11 jsou zobrazena hmotnostní spektra methylovaného peptidu mateří kašičky. Kde (1) jsou tandemová hmotnostní spektra methylovaného peptidu YFDYDFGSEEmetR získaného z MK pomocí dvourozměrné gelové elektroforézy a (2) jsou tandemová hmotnostní spektra syntetického methylovaného peptidu YFDYDFGSEEmetR. Spektra jsou označena

různými barevnými kódy, kde modrá, zelená a červená představují ionty a, b a y. Šedá je prekurzorový ion a je označen jako [M] [38].



Obrázek 11: Hmotnostní spektra methylovaného peptidu mateří kašičky (Zhang, 2012)

5. Závěr

Při analýze proteomu medu a mateří kašičky bylo zjištěno, že asi 90 % proteinů tvoří tzv. MRJP. Do této skupiny patří devět proteinů značených MRJP1-9. Pomocí dvourozměrné elektroforézy a následné hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem bylo zjištěno, že molekulová hmotnost proteinů v MK se pohybuje v rozmezí 49-70 kDa a izoelektrický bod 5,1-7,5. U proteinů bylo zjištěno, že během zrání a skladování mateří kašičky či medu, prochází různými reakcemi, jako jsou glykosylace, fosforylace, methylace a deamidace. U MRJP1 byla zjištěna tři místa, na kterých dochází ke glykosylaci, a u MRJP2 dvě glykosylační místa. K fosforylaci nedochází u MRJP3-5. K methylaci dochází u MRJP1-5 a u MRJP7. Všechny MRJP prochází deamidací, avšak u MRJP3 je míra deamidace oproti ostatním proteinům nižší.

Vzhledem k vývoji metod používaných v proteomice, došlo i k vývoji rychlejších a účinnějších metod k izolaci proteinů ze vzorku medu či mateří kašičky. Mezi takovéto metody patří například metoda izolace pomocí ultracentrifugace, která je však ekonomicky náročná. Další metodou je extrakce fenolem, kterou v roce 2019 použil Bocian. Při analýze proteinu medu a mateří kašičky je nejpoužívanější technikou dvourozměrná elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s barvením pomocí barviva CBB. Výsledkem je vznik skvrn, které jsou vyřezány a podrobeny další analýze. Další hojně využívanou technikou je kapalinová chromatografie, především nano-HPLC, při které se v koloně využívají částice stacionární fáze o velikosti 3 μm, a tím je možné dosáhnout poměrně vysoké účinnosti separace jednotlivých proteinů. K identifikaci jednotlivých proteinů se využívá hmotnostní spektrometrie nejčastěji s ionizací elektrosprejem. Při ionizaci dojde k naštěpení proteinu na jednotlivé peptidy a ty jsou dále rozděleny dle jejich poměru m/z. Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrogram, který se porovnává se spektry jednotlivých peptidů v databázi.

6. Literatura

1. BOCIAN, Aleksandra, et al. An effective method of isolating honey proteins. *Molecules*, 2019, 24.13: 2399.
2. LEWKOWSKI, Oleg, et al. The effect of diet on the composition and stability of proteins secreted by honey bees in honey. *Insects*, 2019, 10.9: 282.
3. WON, Se-Ra, et al. Honey major protein characterization and its application to adulteration detection. *Food Research International*, 2008, 41.10: 952-956.
4. ISMAIL, Wan Iryani Wan, et al. Physicochemical Analysis, Antioxidant and Anti Proliferation Activities of Honey, Propolis and Beebread Harvested from Stingless Bee. In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. IOP Publishing, 2018. p. 012048.
5. WINKLER, Paul; SIEG, Frank; BUTTSTEDT, Anja. Transcriptional control of honey bee (Apis mellifera) Major Royal Jelly Proteins by 20-hydroxyecdysone. *Insects*, 2018, 9.3: 122.
6. WON, Se-Ra, et al. Immunological characterization of honey major protein and its application. *Food Chemistry*, 2009, 113.4: 1334-1338.
7. SABATINI, Anna Gloria, et al. Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2009, 1.1: 1-6.
8. MANDACARU, Samuel C., et al. Characterizing the structure and oligomerization of major royal jelly protein 1 (MRJP1) by mass spectrometry and complementary biophysical tools. *Biochemistry*, 2017, 56.11: 1645-1655.
9. Viuda-Martos, M., et al. "Functional properties of honey, propolis, and royal jelly." *Journal of food science* 73.9 (2008): R117-R124.
10. FRATINI, Filippo, et al. Royal Jelly: An ancient remedy with remarkable antibacterial properties. *Microbiological Research*, 2016, 192: 130-141.
11. DRAPEAU, Mark David, et al. Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Research*, 2006, 16.11: 1385-1394.
12. OTHMAN, Z. A., et al. Nutritional, phytochemical and antioxidant analysis of bee bread from different regions of Malaysia. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2019, 81.5: 955-960.
13. MUREŞAN, Carmen I.; BUTTSTEDT, Anja. pH-dependent stability of honey bee (Apis mellifera) major royal jelly proteins. *Scientific reports*, 2019, 9.1: 1-6.
14. CHIU, Hui-Fang, et al. Hypocholesterolemic efficacy of royal jelly in healthy mild hypercholesterolemic adults. *Pharmaceutical biology*, 2017, 55.1: 497-502.
15. BUTTSTEDT, Anja; MORITZ, Robin FA; ERLER, Silvio. Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (Apis mellifera) as members of the yellow gene family. *Biological Reviews*, 2014, 89.2: 255-269.
16. TAMURA, Shougo, et al. Estimation and characterisation of major royal jelly proteins obtained from the honeybee Apis merifera. *Food Chemistry*, 2009, 114.4: 1491-1497.
17. TAMURA, Shougo, et al. Molecular characteristics and physiological functions of major royal jelly protein 1 oligomer. *Proteomics*, 2009, 9.24: 5534-5543.
18. SANO, Osamu, et al. Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (Apis mellifera) by two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004, 52.1: 15-20.
19. PARK, Min Ji, et al. Major royal jelly protein 2 acts as an antimicrobial agent and antioxidant in royal jelly. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2019, 22.3: 684-689.
20. RAMANATHAN, Ajitha Nath Koomankode Ganapathi; NAIR, Ananthakrishnan Jayakumaran; SUGUNAN, Vetha Sundaram. A review on Royal Jelly proteins and peptides. *Journal of Functional Foods*, 2018, 44: 255-264.

21. SANTOS, Keity Souza, et al. Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (Apis mellifera L.). *Insect biochemistry and molecular biology*, 2005, 35.1: 85-91.
22. KASHIMA, Yuri, et al. Identification of a novel hypocholesterolemic protein, major royal jelly protein 1, derived from royal jelly. *PloS one*, 2014, 9.8: e105073.
23. HABASHY, Noha H.; ABU-SERIE, Marwa M. Major royal-jelly protein 2 and its isoform X1 are two novel safe inhibitors for hepatitis C and B viral entry and replication. *International journal of biological macromolecules*, 2019, 141: 1072-1087.
24. ALBERTOVÁ, Viera, et al. Organization and potential function of the mrjp3 locus in four honeybee species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, 53.20: 8075-8081.
25. KOHNO, Keizo, et al. Royal jelly inhibits the production of proinflammatory cytokines by activated macrophages. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2004, 68.1: 138-145.
26. LIU, Hao, et al. Transcriptome differences in the hypopharyngeal gland between Western Honeybees (Apis mellifera) and Eastern Honeybees (Apis cerana). *BMC genomics*, 2014, 15.1: 1-12.
27. KIM, Bo Yeon; JIN, Byung Rae. Antimicrobial activity of the C-terminal of the major royal jelly protein 4 in a honeybee (Apis cerana). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2019, 22.2: 561-564.
28. KIM, Bo Yeon, et al. Honeybee (Apis cerana) major royal jelly protein 4 exhibits antimicrobial activity. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 2019, 22.1: 175-182.
29. ALBERT, Stefan; KLAUDINY, Jaroslav. MRJP9, an ancient protein of the honeybee MRJP family with non-nutritional function. *Journal of apicultural research*, 2007, 46.2: 99.
30. BÍLIKOVA, Katarina, et al. Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of Apis mellifera. *Peptides*, 2015, 68: 190-196.
31. KLAUDINY, Jaroslav, et al. Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee Apis mellifera. *Insect biochemistry and molecular biology*, 2005, 35.1: 11-22.
32. ROMANELLI, Alessandra, et al. Peptides from Royal Jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins. *Journal of peptide science*, 2011, 17.5: 348-352.
33. FONTANA, Renato, et al. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (Apis mellifera). *Peptides*, 2004, 25.6: 919-928.
34. BILIKOVÁ, K., et al. Apisimin, a new serine–valine-rich peptide from honeybee (Apis mellifera L.) royal jelly: purification and molecular characterization 1. *FEBS letters*, 2002, 528.1-3: 125-129.
35. MALESZKA, Ryszard. Beyond Royalactin and a master inducer explanation of phenotypic plasticity in honey bees. *Communications biology*, 2018, 1.1: 1-7.
36. KAMAKURA, Masaki. Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature*, 2011, 473.7348: 478-483.
37. KNORRE, D. G.; KUDRYASHOVA, N. V.; GODOVIKOVA, T. S. Chemical and functional aspects of posttranslational modification of proteins. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, 2009, 1.3 (3).
38. ZHANG, Lan, et al. Towards posttranslational modification proteome of royal jelly. *Journal of proteomics*, 2012, 75.17: 5327-5341.
39. LIN, Na, et al. Site-Specific Analysis of N-Linked Glycosylation Heterogeneity from Royal Jelly Glycoproteins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2019, 67.33: 9411-9422.

40. WALSH, Christopher. *Posttranslational modification of proteins: expanding nature's inventory*. Roberts and Company Publishers, 2006.
41. LI, Jian-ke, et al. Proteomics analysis of major royal jelly protein changes under different storage conditions. *Journal of proteome research*, 2008, 7.8: 3339-3353.
42. ISSAQ, Haleem J.; VEENSTRA, Timothy D. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques*, 2008, 44.5: 697-700.
43. NEVEROVA, Irina; VAN EYK, Jennifer E. Role of chromatographic techniques in proteomic analysis. *Journal of Chromatography B*, 2005, 815.1-2: 51-63.
44. NOZAKI, Reo, et al. A rapid method to isolate soluble royal jelly proteins. *Food chemistry*, 2012, 134.4: 2332-2337.
45. HAMES, B. David (ed.). *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. OUP Oxford, 1998.
46. BERANOVA-GIORGIANNI, Sarka. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2003, 22.5: 273-281
47. CATSIMPOOLAS, Nicholas (ed.). *Isoelectric focusing*. Elsevier, 2012.
48. ÇAKIR, Hilal Ebru; ŞİRİN, Yakup; KOLAYLI, Sevgi. Royal Jelly and Its SDS-PAGE Electrophoresis Profiles. *Apiterapi ve Doğa Dergisi*, 2019, 2.1: 17-20.
49. SWAMY, Mahima, et al. Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) for the identification and analysis of multiprotein complexes. *Science's STKE*, 2006, 2006.345: pl4-pl4.
50. SCOTT, Raymond PW. Principles and practice of chromatography. *Chrom-ed book series*, 2003, 1.
51. MITULOVIĆ, Goran; MECHTLER, Karl. HPLC techniques for proteomics analysis—a short overview of latest developments. *Briefings in Functional Genomics*, 2006, 5.4: 249-260.
52. MACIEL, Edvaldo Vasconcelos Soares; DE TOFFOLI, Ana Lúcia; LANÇAS, Fernando Mauro. Current status and future trends on automated multidimensional separation techniques employing sorbent-based extraction columns. *Journal of separation science*, 2019, 42.1: 258-272.
53. LADISCH, Michael; ZHANG, Leyu. Fiber-based monolithic columns for liquid chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2016, 408.25: 6871-6883.
54. MACIEL, Edvaldo Vasconcelos Soares, et al. Miniaturized liquid chromatography focusing on analytical columns and mass spectrometry: A review. *Analytica chimica acta*, 2020, 1103: 11-31.
55. REUHS, Bradley L. High-performance liquid chromatography. In: *Food analysis*. Springer, Cham, 2017. p. 213-226.
56. DE HOFFMANN, Edmond. Mass spectrometry. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 2000.
57. MANN, Matthias; HENDRICKSON, Ronald C.; PANDEY, Akhilesh. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual review of biochemistry*, 2001, 70.1: 437-473.

ANGEL, Thomas E., et al. Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41.10: 3912-3928.