

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv kleštíka včelího (*Varroa destructor*) na humorální
imunitní systém včely medonosné (*Apis mellifera*)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Radka Freitagová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Rok:	2021

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. Byla jsem seznámena 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 8.5.2021

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, PhD. za věnovaný čas, trpělivost a cenné rady při psaní této bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Radka Freitagová
Název práce	Vliv kleštíka včelího (<i>Varroa destructor</i>) na humorální imunitní systém včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021
Abstrakt	<p>Včela medonosná je velmi důležitým opylovatelem, avšak její zdravotní stav ovlivňuje spousta faktorů. Jedním z nejvýznamnějších parazitů včely medonosné je roztoč klestík včelí (<i>Varroa destructor</i>). Imunitní systém včel je složen z několika úrovní – fyzikálních bariér, buněčné, humorální imunity a sociální imunity. Teoretická část práce obsahuje literární rešerši o imunitním systému hmyzu s detailnějším popisem humorálního imunitního systému. Na humorální imunitě se podílejí antimikrobiální peptidy. Jsou aktivní vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriím, houbám i virům, což z nich činí velmi významnou skupinu molekul. Rovněž byla vypracována literární rešerše o vlivu kleštíka včelího na imunitní systém včel. Nakonec byl vypracován přehled metod, které se používají ke studiu antimikrobiálních peptidů. V praktické části byla testována koncentrace proteinů v jednotlivých tělních částech včely medonosné – hlava, hrud', zadeček. Testovány byly zdravé včely a včely nakažené varroózou. Průměrná koncentrace proteinů v hlavách u zdravých včel byla $0,197 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 3,204\cdot 10^{-2}$, v hrudích $0,450 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 5,931\cdot 10^{-2}$ a v zadečku $0,291 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 7,321\cdot 10^{-2}$. Průměrná koncentrace proteinů v hlavách u včel ze včelstev nakažených</p>

varoózou byla $0,170 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 5,542\cdot 10^{-2}$, v hrudích $0,464 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 7,298\cdot 10^{-2}$ a v zadečku $0,325 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 5,995\cdot 10^{-2}$.

Klíčová slova	Včela medonosná, <i>Varroa destructor</i> , humorální imunitní systém, antimikrobiální peptidy
Počet stran	56
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Radka Freitagová
Title	The influence of <i>Varroa destructor</i> on the humoral immune system of the Honey bee
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
The year of presentation	2021
Abstract	<p>Honey bee is a very important pollinator, but its health condition is affected by many factors. One of the most significant parasites is the <i>Varroa destructor</i> mite. Bees' immune system is composed of several layers – the physical barriers, cell, humoral and social immunity. The theoretical part contains a review of literature about the honey bee's immune system with more detailed description of the humoral immune system. Antimicrobial peptides take part in humoral immunity. They are effective against grampositive and gramnegative bacteria, fungi and viruses, which makes them a very important group of molecules. Literature review of <i>Varroa destructor's</i> influence on the bee's immune system was documented as well. Finally a summary of methods used to study antimicrobial peptides is provided. In the practical part of this thesis a concentration of proteins in honey bee's individual body parts, head, thorax and abdomen in particular was tested. Tests were made on healthy bees and bees infected with varoosis. Average concentration of proteins in head of healthy bees was $0.197 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 3.204\cdot 10^{-2}$, in thorax was $0.450 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 5.931\cdot 10^{-2}$ and in abdomen was $0.291 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 7.321\cdot 10^{-2}$. Average concentration of</p>

proteins head of bees infected with varroosis was $0.170 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 5.542\cdot 10^{-2}$, in thorax was $0.464 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 7.298\cdot 10^{-2}$ and in abdomen was $0.325 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 5.995\cdot 10^{-2}$.

Keywords	Honey bee, <i>Varroa destructor</i> , humoral immune system, antimicrobial peptides
Number of pages	56
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	12
2.1	Imunitní systém hmyzu	12
2.1.1	Sociální imunita a fyzikální bariéry	12
2.1.2	Buněčná a humorální imunita	13
2.1.2.1	Antimikrobiální peptidy detekované u včel	14
2.1.3	Buněčné signální dráhy	15
2.1.3.1	IMD	16
2.1.3.2	Toll	17
2.1.3.3	JAK/STAT	18
2.1.4	RNAi v imunitním systému hmyzu	19
2.2	Varroa destructor (kleštík včelí)	20
2.2.1	Nebezpečnost	20
2.2.2	Původ	21
2.2.3	Šíření	21
2.2.4	Popis	21
2.2.5	Množení a reprodukční cyklus	22
2.2.6	Vliv kleštíka včelího na včely a včelstva	23
2.2.6.1	Poškození tukového tělesa	24
2.2.6.2	Ovlivnění obsahu proteinů a množství hemocytů v hemolymfě	25
2.2.7	Virozy včel asociované kleštíkem včelím	26
2.2.7.1	Kašmírský virus – KBV	26
2.2.7.2	Virus akutní paralýzy včel – ABPV	26
2.2.7.3	Virus deformovaných křídel – DWV	26
2.2.8	Vliv na humorální imunitní systém	27
3	METODY DETEKCE A KVANTIFIKACE ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ	29
3.1	Detekce a kvantifikace AmP	29
3.1.1	Extrakce na pevné fázi – SPE	29
3.1.1.1	Reverzní fáze	31
3.1.1.2	Normální fáze	31
3.1.1.3	Iontově výměnná fáze	31
3.2	Metody separace a detekce AmP	32
3.2.1	Kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie - LC-MS	32
3.2.2	Elektroforéza	33

3.2.2.1	Gelová elektroforéza a Western blot.....	34
3.3	Metody studia genové exprese AmP.....	36
3.3.1	Kvantitativní PCR – RT-qPCR	36
4	EXPERIMENTÁNI ČÁST.....	38
4.1	Materiál	38
4.1.1	Chemikálie	38
4.1.2	Biologický materiál.....	38
4.1.3	Přístroje a vybavení.....	38
4.2	Metody	38
4.2.1	Zpracování vzorku včel.....	38
4.2.2	Stanovení proteinů metodou dle Bradforda.....	38
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	39
5.1	Stanovení proteinů metodou Bradforda	39
5.1.1	Kalibrační křivka.....	39
5.1.2	Stanovení proteinů ve vzorcích včel	40
6	ZÁVĚR.....	44
7	LITERATURA	45
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	56

Cíle práce

- Vypracování literární rešerše o imunitním systému hmyzu.
- Zpracování literární rešerše o vlivu kleštíka včelího (*Varroa destructor*) a jím přenášených sekundárních nákaz na humorální imunitní systém včely medonosné.
- Vypracování přehledu metod používaných ke studiu změn hladin nebo genové exprese antimikrobiálních peptidů hmyzu a včel.
- Studium biochemických parametrů humorální imunity na vzorcích včel ze zdravých a z varoózou infestovaných včelstev.

1 ÚVOD

Obratlovci i bezobratlí mají vyvinutý imunitní systém. Imunitní systém rozpoznává, co je pro organismus škodlivé a co nikoli. Tím jej chrání jak před hrozbami vnějšího, tak i vnitřního původu. Včela má několik linií imunitního systému – fyzikální bariéry, buněčnou imunitu a humorální imunitu. Jako eusociální hmyz má včela ještě jednu úroveň imunity, a to imunitu sociální. Všechny tyto úrovně imunitního systému jsou pro včelu i pro celé včelstvo životně důležité. I přes několik úrovní imunitního systému jsou včely a jejich zdraví ohroženo různými původci, kterými mohou být viry, bakterie, houby či roztoči.

Varroa destructor je roztoč, který patří k největším hrozbám včely medonosné. Nejen, že sám o sobě jednotlivé včely oslabuje, ale rovněž působí jako vektor celé řady virů. K léčbě varoózy se používají především akaricidy, látky k hubení roztočů. Tyto látky ale jsou nebezpečné pro vyvíjející se včely. Zjištění, jak přesně kleštík včelí poškozují imunitu včely, by mohlo přinést nové léčebné metody pro hospodářsky významnou včelu medonosnou.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Imunitní systém hmyzu

Živí tvorové jsou v podstatě obklopeni nepřátelským prostředím, aby přežili, vyvinuli si několik obranných mechanismů. Jedním z těchto mechanismů je imunitní systém. Tento systém chrání organismy před cizími látkami a invazí patogenů (Lavine a Strand, 2002; Marmaras a Lampropoulou, 2009).

Hmyz má velmi dobře vyvinutý vrozený imunitní systém, který umožňuje obecné a rychlé reakce proti patogenům. Získaný imunitní systém jim chybí. Naproti tomu obratlovci si vyvinuli novou linii obrany, získanou imunitu (Hoffmann, 2003).

Získaná imunita je evolučně mladší a mechanismy reagují na cizorodé látky prostřednictvím vysoce specifických molekul (protilátky, antigenně specifické receptory T-lymfocytů) a aktivují se až po setkání s daným antigenem. Charakteristickým rysem těchto reakcí je imunologická paměť (Hořejší a Bartůňková, 2009).

Včely jsou eusociální hmyz, který žije ve společenstvích čítajících několik desítek tisíc jedinců. Na včelí imunitní systém můžeme pohlížet ze dvou základních úhlů pohledu: imunita celého včelstva a imunita jedinců (Wilson-Rich *et al.*, 2009). Obě úrovně spolu úzce souvisejí, protože oslabení nebo poškození jednotlivých včel může vést k oslabení celého včelstva (Daníhlík a Petřivalský, 2015).

2.1.1 Sociální imunita a fyzikální bariéry

Sociální imunitu zajišťuje specifické chování jednotlivých včel. Včely vyklízejí dno úlů od zbytků spadaneho vosku, i mrtvolek včel nebo roztočů kleštika včelího (Přidal, 2014). Dalšími faktory sociální imunity je kálení a hnutí dospělých včel mimo úl, čímž přirozeně udržují prostředí úlů čisté (Daníhlík a Petřivalský, 2015).

Jedním z důležitých faktorů sociální imunity včelstva je tzv. hygienické chování, což je schopnost dospělých včel rozpoznávat a vyklízet uhynulý plod (larvy, kukly). Hygienické chování je mechanismus, jakým včely snižují infekční tlak ve svém hnízdě (Panasiuk *et al.*, 2010).

Na individuální úrovni mají včely několik linií vrozené imunity. První z nich jsou fyzikální bariéry, které zabraňují vstupu patogenu do organismu. Mezi fyzikální bariéry řadíme kutikulu, stěnu zažívacího traktu a stěnu vzdušnic (Evans a Spivak, 2010).

2.1.2 Buněčná a humorální imunita

Buněčná imunita je složitější než fyzikální bariéry a zajišťují ji hemocyty (Lavine a Strand, 2002). Hemocyty cirkulují v hemolymfě (Charalambidis *et al.*, 1995; Meister a Lagueux, 2003), podílí se na enkapsulaci, nodulaci a fagocytóze mikroorganismů, které proniknou do těla včely (Lavine a Strand, 2002). Důležitou funkcí hemocytů je produkce látek účastnících se humorální imunitní odpovědi, což znamená, že buněčná a humorální imunita jsou spolu úzce svázány (Daníhlík a Petřivalský, 2015).

Humorální imunitu tvoří jednotlivé molekuly, účastníci se imunitní odpovědi. Patří mezi ně lektiny, lysozym, antimikrobiální peptidy a fenoloxidasová kaskáda (Hultmark, 2003; Evans *et al.*, 2006). Tyto složky jsou vylučovány tukovým tělesem a hemocyty. Některé jsou v hemolymfě přítomny neustále, část je exprimována v reakci na zranění či mikrobiální infekci (Turner, 1994; Evans *et al.*, 2006; Laughton *et al.*, 2011). Lektiny jsou v hemolymfě přítomny neustále. Mají glykoproteinovou povahu, vážou se na glykosylované proteiny buněčné stěny bakterií a tím spouštějí fagocytózu a fenoloxidasovou kaskádu (Turner, 1994). Lysozym je enzym s imunitní funkcí, hydrolyzuje β -1,4-glykosidovou vazbu mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetyl-D-glukosaminem v peptidoglykanu mureinu a mezi N-acetyl-D-glukosaminovými zbytky chitinu (Gliński, 2001; Evans *et al.*, 2006). Včela produkuje tři typy lysozymů. Jeden i-lysozym (invertebrate-bezobratlí) a dva c-lysozomy (chicken-kuře). Jeden z c-lysozymů je nadměrně regulován napadenými včelami (Evans *et al.*, 2006). Lysozym můžeme najít i u jiných zvířat, rostlin, hub a bakteriofágů (Bulet *et al.*, 1999).

Fenoloxidasová kaskáda je spuštěna lipopolysacharidy a peptidoglykanem z buněčných stěn bakterií, β -1,3-glukany z hub (Kanost a Gorman, 1993) nebo jinými sloučeninami jako jsou například endogenní faktory produkované při poškození tkáně (Cerenius a Söderhäll, 2004). Kaskáda začíná zymogenem pro-fenoloxidasou. Pro-fenoloxidasu aktivuje enzym fenoloxidasu, která katalyzuje oxygenaci fenolů na *o*-difenoly a následnou oxidaci *o*-difenolů na *o*-chinony. *O*-chinony jsou poté neenzymově polymerovány až na barvivo melanin. Melanin je přirozenou součástí kutikuly hmyzu. (Kanost a Gorman, 1993). Po mechanickém poranění či přítomnosti cizích objektů jako jsou parazité a mikroorganismy se melanin ukládá kolem poškozené tkáně nebo cizího objektu. Melanin vytváří štít proti vetřelci, který pronikl do organismu, čímž brání jeho množení nebo zpomaluje jeho růst (Cerenius a Söderhäll, 2004).

Antimikrobiální peptidy (AmP) jsou významnou skupinou molekul, které se podílejí na humorální imunitě (Wimley a Hristova, 2011). AmP jsou aktivní vůči bakteriím (grampozitivním i gramnegativním), houbám i virům (Cooper, 2006). AmP mají obecně krátký aminokyselinový řetězec (30-60 aminokyselin), pozitivní náboj, jsou tepelně stabilní a nemají účinek na eukaryotní buňky (Li *et al.*, 2012).

Antimikrobiální peptidy byly izolovány ze všech živých organismů od prokaryot po savce (Li *et al.*, 2012). Přírodních AmP bylo popsáno více než 7000 (Hongyu, 2019), z toho přibližně 200 u hmyzu (Li *et al.*, 2012). AmP hmyzu jsou syntetizovány především v tukovém tělese, ale i v hemocytech, odtud jsou poté exprimovány do hemolymfy (Vilmos a Kurucz, 1998). Včely produkují AmP do hemolymfy, jedu i mateří kašičky (Daníhlík *et al.*, 2016).

Ke zvýšení tvorby AmP dochází, pokud se včela dostane do kontaktu s mikroblem. Jejich hladina může stoupat dokonce i po dva dny (Kucharski a Maleszka, 2003). Buněčnou signální dráhu vedoucí k tvorbě AmP spouští molekuly z povrchu bakterií – lipopolysacharidy, i hub - β -1,3-glukany (Daníhlík *et al.*, 2016). Mechanismus účinku je u peptidů různý. Peptidy mohou způsobovat permeabilizaci, tedy narušení membrány a mají účinky na řadu intracelulárních cílových molekul. V případě, že je narušena buněčná membrána, vede toto narušení k buněčné smrti. Vytvoření membránové interakce způsobí vznik dočasného póru. Těmito póry se peptidy dostanou dovnitř buňky. V cytosolu mohou mít AmP více intercelulárních cílů. Mohou vázat DNA, RNA i proteiny (Maróti *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011). Účinky AmP jsou jak bakteriocidní, tak bakteriostatické (Otvos *et al.*, 2000; Brogden, 2005).

2.1.2.1 Antimikrobiální peptidy detekované u včel

Včely produkují AmP do hemolymfy, jedu i mateří kašičky. U včely medonosné byly popsány čtyři rodiny antimikrobiálních peptidů: apidaeciny, abaecin, hymenoptaecin a defensiny (Daníhlík *et al.*, 2016).

A) Apidaeciny

Apidaeciny jsou peptidy, které jsou tvořeny sekvencí 18-20 aminokyselin. Apidaeciny jsou peptidy bohaté na prolin. V současné době jsou známy 4 isoformy apidaecinů. Jsou účinné převážně proti gramnegativním bakteriím (Casteels *et al.*, 1989). Mechanismus účinku zahrnuje nespecifickou vazbu peptidu na vnější membránu. Po navázání následuje proniknutí peptidu do mezimembránového prostoru

a irreverzibilní vazba s receptorovou molekulou. Nakonec je přemístěn dovnitř buňky, tam se naváže na bakteriální chaperon DnaK a chaperonin GroEL (Casteels a Tempst, 1994; Otvos *et al.*, 2000).

B) Abaecin

Abaecin je peptid bohatý na prolin, je tvořen sekvencí 33-34 aminokyselin (Xu *et al.*, 2009). Abaecin je syntetizován z prekurzoru, který je delší o 19 aminokyselin, ty se po aktivaci peptidu odštěpí. Na rozdíl od apidaecinu má abaecin nižší antimikrobiální aktivitu. Je aktivní vůči grampozitivním i gramnegativním bakteriím. Proti gramnegativním bakteriím je ovšem méně účinný (Casteels *et al.*, 1990).

C) Hymenoptaecin

Hymenoptaecin je lineární peptid tvořený sekvencí 93 aminokyselin. Patří do skupiny peptidů bohatých na glycin. Je aktivní vůči gramnegativním i grampozitivním bakteriím (Casteels *et al.*, 1993). U včel i u plodu se jeho hladina velmi rychle zvyšuje v reakci na infekci (Chan *et al.*, 2006).

D) Defensiny

Defensiny jsou peptidy bohaté na cystein, obsahují 5 cysteinových zbytků, které vytvářejí 3 disulfidové vazby. Jsou tvořeny sekvencí 51 aminokyselin (Casteels-Josson *et al.*, 1994). Struktura je tvořena smyčkou z α -helixu a dvěma antiparalelními β -skládanými listy, které jsou stabilizovány disulfidovými můstky (Klaudiny *et al.*, 2005). U včel se vyskytují ve dvou formách – defensin 1 a defensin 2. Defensin 1 je syntetizován ve slinných žlázách a nalezneme jej v mateří kašičce a medu. Defensin 2 je syntetizován buňkami tukového tělesa a hemocyty (Ilyasov *et al.*, 2012).

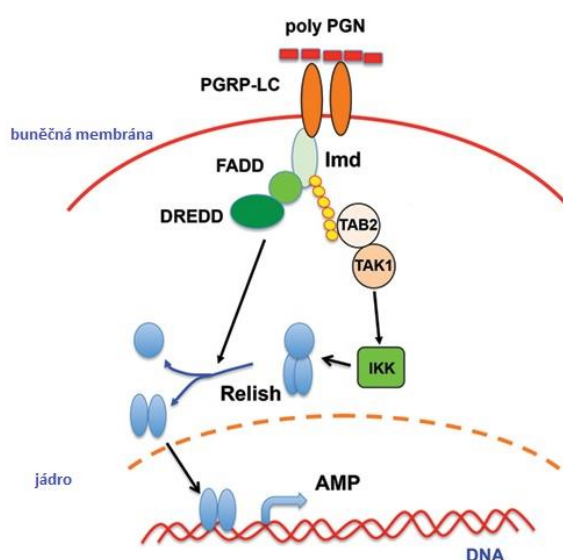
2.1.3 Buněčné signální dráhy

U včely medonosné byly popsány 4 signální dráhy: Imd signální dráha, Toll signální dráha, JAK/STAT signální dráha a JNK signální dráha (Evans *et al.*, 2006). Prvním krokem ke spuštění buněčné signalizace je rozpoznávání struktur charakteristických pro patogenní mikroorganismy (PAMP – pathogen-associated molecular patterns) (Brutscher *et al.*, 2015). PAMP mohou být lipopolysacharidy gramnegativních bakterií, peptidoglykany, které jsou charakteristické pro grampozitivní bakterie nebo glukany a mannany typické pro kvasinky a plísňe (Hořejší a Bartůňková, 2009). Po navázání molekuly na receptorový protein na povrchu buňky dojde k jejímu rozpoznání receptorovým proteinem. Receptory signál převedou do vnitřní signalizační dráhy-složité kaskády molekul, které řídí chování buňky (Alberts, 1998).

2.1.3.1 IMD

IMD (Immune deficiency pathway – dráha imunitní nedostatečnosti) (Myllymäki *et al.*, 2014) řídí expresi většiny antimikrobiálních peptidů u octomilky *Drosophila melanogaster* (Lemaitre *et al.*, 1995). IMD je aktivována gramnegativními bakteriemi, které proniknou do hostitelského organismu (Silvermann *et al.*, 2000). Patogen je detekován díky vazbě jeho povrchových molekul na receptorové proteiny buněk hostitelského organismu (Janeway, 1989). Jednou z rozpoznávaných patogenních molekul může být peptidoglykan. Peptidoglykan je vázán na povrchu buněčné membrány bakterií a je rozpoznáván a vázán konzervovanými hostitelskými proteiny (PGRPs – peptidoglycan recognition protein) (Werner *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2003).

Peptidoglykan je rozpoznáván PGRP-LC (transmembránový receptor, který váže peptidoglykan) (Leulier *et al.*, 2003; Kaneko *et al.*, 2004) pro aktivaci IMD. IMD se váže na FADD (Fas-asociovaný protein smrtící domény) a DREDD (protein) za vzniku komplexu. DREDD štěpí IMD, který je poté aktivován ubikvitinací. Polyubikvitinované řetězce (žluté kruhy) pomáhají připojit TAB 2 (vazebný protein 2 spojený s TAK 1) a získávat a aktivovat TAK 1 (transformovaný růstový faktor beta aktivovaný kinasou 1). TAK 1 je zodpovědný za aktivaci komplexu IKK, který fosforyluje jaderný faktor Relish. Po štěpení a fosforylaci se může Relish translokovat do jádra, kde aktivuje transkripci specifických antimikrobiálních peptidů (Rosales 2017).

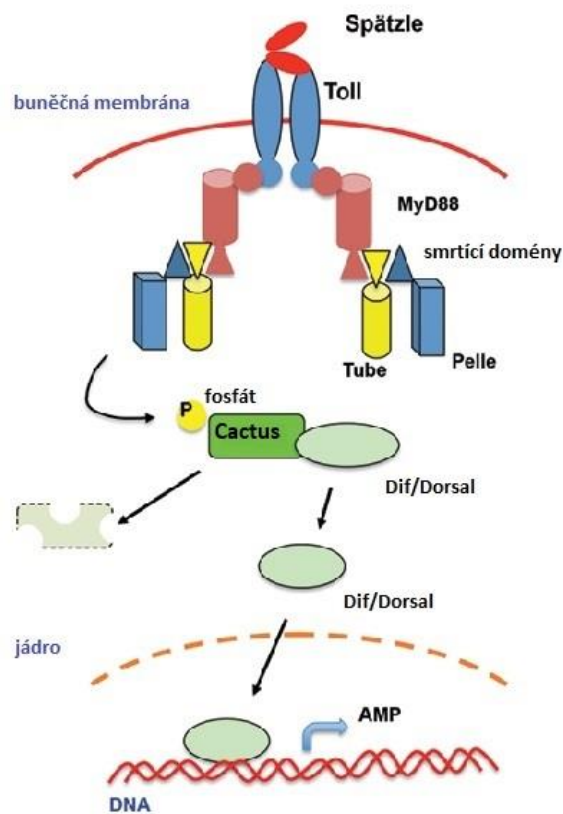


Obrázek 1 – Mechanismus signální dráhy IMD v buňce (převzato a upraveno z Rosales 2017).

2.1.3.2 Toll

Dráha Toll byla identifikována jak u savců, tak i u octomilky (Leclerc a Reichhart, 2004). Tato dráha zahrnuje signalizaci transkripčním faktoru κ B a je nezbytná pro embryonální vývoj a imunitu (Ashok, 2009; Valanne *et al.*, 2011).

Dráha Toll vyžaduje proteolyticky štěpenou formu extracelulárního cytokinu – Spätzle (Shia *et al.*, 2009). Po rozpoznání Spätzle dimerem Toll molekul se sestaví signální komplex. Toll se váže na Myd88 prostřednictvím TIR domén. Myd 88 váže Tube a Pelle přes jejich smrtelné domény. Kinasa Pelle se aktivuje autofosforylací a poté fosforyluje Cactus a označuje jej pro degradaci. Transkripční faktory NF- κ B Dorsal nebo Dif se uvolní a přemístí do jádra, kde aktivují transkripci antimikrobiálních peptidů (Rosales 2017).



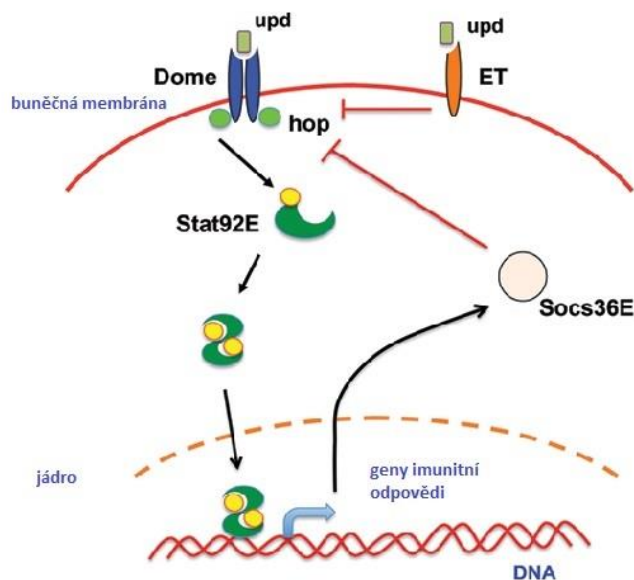
Obrázek 2 – Mechanismus signální dráhy Toll v buňce (převzato a upraveno z Rosales 2017).

2.1.3.3 JAK/STAT

Zatímco dráhy Toll a IMD byly poprvé popsány u octomilky, poté byly podobné dráhy nalezeny u savců. Naproti tomu dráha JAK/STAT byla poprvé objevena u člověka, jako důležitá dráha při regulaci kaskády imunitních reakcí (O'Shea a Plenge, 2012), jako například kontroly zánětů, aktivaci leukocytů (Myllymäki a Ramet, 2014).

JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcriptions) (Geng *et al.*, 2016) vede k produkci bílkovin tukovým tělesem, včetně cytokinů a proteinů reagujících na stres (Ekengren *et al.*, 2001).

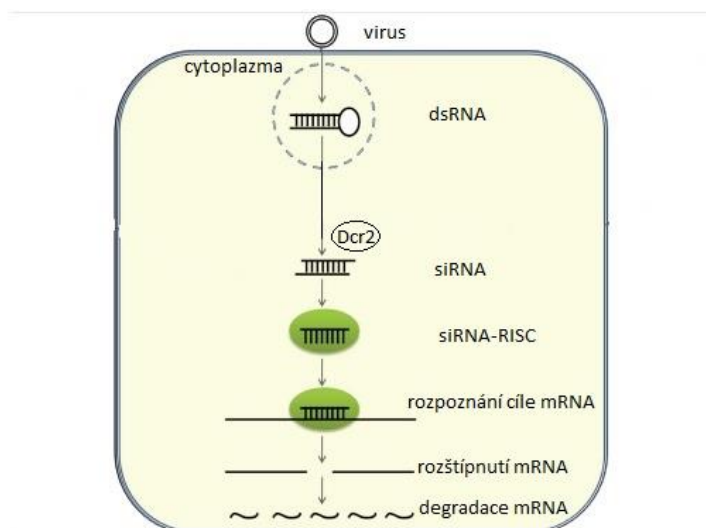
Dráha JAK/STAT je iniciována extracelulární vazbou glykosylovaného, nepárového proteinu (upd) s receptorem Domeless (Dome), který se váže na jeden JAK, hopscotch (hop). Po aktivaci receptoru hop fosforyluje sám sebe a specifické tyrosinové zbytky na cytoplazmatické části receptoru. Tyto fosforylované tyrosiny se stávají místem pro STAT transkripční faktor – Stat92E. Hopscotch také fosforyluje Stat92E na tyrosinové zbytky, což mu umožní tvořit dimery a poté se přemístit do jádra, kde se váže na promotory cílových genů. ET (eye transformer) je nesignální receptor pro upd, který je schopen spojit se s receptorovým komplexem a integrovat s Dome i s hop (Rosales 2017).



Obrázek 3 – Mechanismus signální dráhy JAK/STAT v buňce (převzato a upraveno z Rosales, 2017).

2.1.4 RNAi v imunitním systému hmyzu

RNA interference (RNAi) je hlavní antivirová vrozená imunitní odpověď u hmyzu (Wang *et al.*, 2006; Zambon *et al.*, 2006; Ding a Voinnet, 2007; Ding, 2010; Flenniken *et al.*, 2010). Tato vrozená antivirová dráha je spuštěna v cytoplazmě při detekci exogenní dvouvláknové RNA (dsRNA), což je meziproduct, který je generován během replikace RNA viru. Imunitní odpověď zahrnuje enzym podobný RNAase III – Dicer 2 (Dcr 2), který rozpoznává virovou dsRNA jako PAMP a štěpí dlouhé úseky RNA na krátké úseky RNA (siRNA) (Weinstock *et al.*, 2006). siRNA je dlouhá 21 nukleotidů, z těchto nukleotidů jich 19 tvoří duplex a 2 nukleotidy zůstávají nespárované na každém za 3' konců (Elbashir *et al.*, 2001). Výsledný duplex siRNA ve spojení s Dcr2 a protein vázající dsRNA je nanesen na RICS (proteinový komplex a molekuly RNA), čímž vzniká siRISC, což je RISC komplex, který obsahuje podjednotkovou doménu a Agronaute2 (Ago2) jako katalytické jádro tohoto komplexu. Tento komplex rozpoznává řetězec mRNA a degraduje jej. Vedoucí řetězec siRNA zůstává vázán k RISC a vede jej k rozpoznání virové RNA. Virová RNA je poté rozštěpena endonukleasami, čímž se omezuje replikace viru (Weinstock *et al.*, 2006). Nakonec se rozštěpené mRNA degradují působením buněčných exoribonukleas a RISC je recyklován pro další použití (Singhania *et al.*, 2012).



Obrázek 4 – Mechanismus působení RNA interference v buňce (převzato a upraveno z Singhania *et al.*, 2012).

2.2 Varroa destructor (kleštík včelí)

Včely jsou přirozeně zasaženy řadou parazitů, patogenů a škůdců (Di Prisco *et al.*, 2011; Wilfret *et al.*, 2016), kteří způsobují vážnější i méně vážné zdravotní komplikace.

Varroa destructor je parazit, který celosvětově způsobuje vážné zdravotní komplikace u včely medonosné (Reyes-Quintana *et al.*, 2019). Roztoč *Varroa destructor* je ektoparazit včel (Rosenkranz, 2010) a je největší hrozbou pro zdraví včel (Traynor *et al.*, 2020). Je považován za klíčový faktor pravidelných ztrát včelstev v Evropě a USA, rovněž způsobuje vážné ekonomické ztráty v oblasti včelařství (Rosenkranz, 2010). Žádný jiný patogen neměl srovnatelný dopad na včely medonosné (Traynor *et al.*, 2020), proto je studium tohoto roztoče velmi důležité.

2.2.1 Nebezpečnost

Existuje několik důvodů, proč je roztoč *Varroa destructor* největší hrozbou pro včelu medonosnou (De la Rua *et al.*, 2009).

- Relativně nový parazit včely medonosné. Chybí proto vyvážený vztah mezi hostitelem a parazitem.
- V krátké době se rozšířil téměř po celém světě. V současné době se nevyskytuje jen v Austrálii, jinak je rozšířen po všech kontinentech, kde se vyskytuje včela medonosná.
- V mírném pásu by bez pravidelného ošetření většina včelstev uhynula během 2-3 let.
- Pravidelné ošetřování ale zvyšuje náklady na včelaření. Zvyšuje se také riziko chemických reziduí ve včelích produktech (De la Rua *et al.*, 2009).
- Rychle si vyvíjí rezistenci na akaricidy (pesticidy, určené k hubené roztočů) (Rinkevich a Vontas, 2020).
- Kleštík včelí se považuje za klíčový faktor snižování počtu včelařů i včelstev v Evropě.
- Celosvětově se snižuje počet opylovatelů, kleštík včelí může tento problém ještě více prohloubit (De la Rua *et al.*, 2009).
- Je prokázáno, že roztoč *Varroa destructor* přenáší řadu včelích viróz (Di Prisco *et al.*, 2011; Wilfret *et al.*, 2016). Byl prokázán jako přenašeč kašmírského viru (KBV), viru akutní paralýzy včel (ABPV), viru izraelské akutní paralýzy (IAPV) a viru deformovaného křída (DWV) (Boecking a Genersch, 2008).

2.2.2 Původ

Kleštík včelí byl dříve považován za roztoče *Varroa jacobsoni*. Toto tvrzení bylo vyvráceno až díky výzkumu za použití genetických markerů. Bylo zjištěno, že *Varroa destructor* představuje samostatný druh (Anderson *et al.*, 2000).

Varroa destructor byl původně parazit včely východní (*Apis cerana*), která se vyskytuje na velkém území jihovýchodní Asie (Rosenkranz, 2010). Oblast jejího výskytu zahrnuje hlavně Indii, Čínu, Japonsko i část Sibíře (Veselý, 1985). Vážné poškození včel východních nebylo nikdy hlášeno. Při včelařství se včelou východní není léčba proti varroóze nutná (Rath and Drescher, 1990; Tewarson *et al.*, 1992). *Apis cerana* si jako původní hostitel roztoče vytvořila stabilní hostitelský vztah s roztoči *Varroa* během dlouhého období koevoluce (Rath, 1999).

2.2.3 Šíření

V první polovině minulého století se roztoč rozšířil v podstatě po celém světě (Rosenkranz *et al.*, 2010), a to pravděpodobně v důsledku masového obchodu (Navajas *et al.*, 2010) nebo při transportu včelstev včely medonosné do východní části Ruska nebo na Dálný východ (Oldroyd, 1999).

Podrobnosti o změně hostitele jsou nejasné. Roztoč se rozšířil po SSSR (1952), Japonsku (1958), Číně (1959), Paraguay (1971) (Ruttner a Ritter, 1980). První záznamy o rozšíření roztoče v USA pocházejí z roku 1987 (De Guzman a Rinderer, 1999).

Z Asie se roztoč šířil velmi rychle do Evropy. Do Bulharska byl roztoč zavlečen s největší pravděpodobností roku 1967. V roce 1976 byl zavlečen na území Maďarské lidové republiky a ve stejném období pravděpodobně pronikl na území Československé socialistické republiky. A to do nejvýchodnějších okresů Slovenska. Prvního roztoče v Československé socialistické republice objevili v roce 1978 při systematické kontrole. Po zjištění varoózy ve východní oblasti Slovenska byla vyhlášena ochranná opatření, později se však ukázalo, že byla velmi málo účinná. Na jaře roku 1981 se zjistilo, že i přes všechna ochranná opatření se roztoč objevil v okrese Ústí nad Orlicí (Veselý, 1985).

2.2.4 Popis

Varroa destructor vykazuje zřetelný sexuální dimorfismus (Ifantidis, 1983). Samci jsou menší než samičky během celého ontogenetického vývoje (Donze a Guerin, 1994; Kanbar a Engels, 2003).

Tvar těla samičky se mění během jejich vývoje z podlouhlého k příčně eliptickému tvaru těla (Donze a Guerin, 1994; Kanbar a Engels, 2003) a mají hnědou barvu. Nohy samičky jsou krátké a silné, což umožňuje rychlý pohyb (De Ruijter a Kaas, 1983). Sameček roztoče má téměř kulatý tvar a je bíložlutý. Nohy samečka jsou delší k velikosti těla ve srovnání se samičkami. Nohy *Varroa destructor* jsou zakončeny přísavkami, což usnadňuje parazitaci na těle hostitele (Kirchner, 1993).

2.2.5 Množení a reprodukční cyklus

Množení parazita závisí na reprodukci plodu včely medonosné (Oldroyd, 1999). V životním cyklu jsou dvě fáze: fáze reprodukční a fáze foretická (Kuenen a Calderone, 1997).

Reprodukci zahajuje samička roztoče tím, že vstoupí do buňky dělnice nebo do buňky trubce před zavíčováním buňky. Do trubčích buněk proniká 40 hodin před zavíčováním buňky, do dělničích proniká 18 hodin před zavíčováním buňky (Bailey a Ball, 1991). Samička se schovává před dělnicemi a to tak, že se ponoří do krmné kaše nacházející se na dně buňky pod larvou. V tekutém krmivu leží samička vzhůru nohama. Roztoč má upravené peritremy, které po ponoření roztoče do mateří kašičky vyčuhují ven, což umožňuje dýchání (Donze' a Guerin, 1997). V této pozici zůstává pouze krátkou dobu, přibližně 4 hodiny poté, co je buňka uzavřena (Ifantidis, 1983).

Po zavíčování buňky roztoč začne žít parazitovat na těle larvičky. Asi 60-70 hodin po uzavření buňky roztoč naklade první vajíčko (Bailey a Ball, 1991). Samička klade vajíčka po jednom, obvykle na stěnu buňky, a to ve 30hodinových intervalech. První vajíčko je obvykle samec, další vajíčka jsou samice (Martin, 1994). Samčí roztoči se vyvíjejí z vajíčka na dospělé přibližně za 6,5-6,9 dne. Samičí roztoči se vyvinou na dospělé za 5,5-6,2 dnů (Martin, 1994; De Jong, 1997).

Samci nepřežijí mimo buňku plodu, dochází tedy k oplodnění dospělých samiček roztočů uvnitř buňky. Páření se uskutečňuje i mezi sourozenci, a to v případě, že se v buňkách vyskytuje pouze jedna matka roztočů. V případě, že je matek více se populace kříží (Donze' a Guerin, 1994).

Období mezi reprodukčními obdobími se nazývá foretická fáze. Během foretické fáze samičky roztoče zůstávají na dospělé včele (Donze' a Guerin, 1994; Donzé *et al.*, 1996). Hostitelská včela roztočům poskytuje transport mezi reprodukčními místy (Boot *et al.*, 1995).

Poté, co se včela vylíhne, opouští buňku s původním roztočem i s novými samičkami roztočů (Kraus, 1994). Samečci a vajíčka zůstávají v buňce a umírají nebo jsou odstraněni a zabiti nejmladšími dělnicemi. Samice roztočů zůstávají na dospělých včelách různě dlouhou dobu v řádu dní až týdnů (Kuenen a Calderone, 1997).

Za nepříznivých podmínek má foretická fáze zřejmě negativní dopad na plodnost roztočů *Varroa*. Bylo prokázáno, že po 5týdenní foretické fázi nebo po 7-18hodinovém hladovění se zvýšil počet neplodných roztočů dvakrát až třikrát oproti kontrole (Rosenkranz a Stürmer, 1992; Rosenkranz a Bartalszky, 1996). Po foretické fázi začínají samice znova reprodukční cyklus a napadají nové buňky plodu (Beetsma, 1992).

2.2.6 Vliv kleštíka včelího na včely a včelstva

Kleštík poškozují včelu tak, že probodne kutikulu, následně vzniká rána, která zůstává otevřena mnoho dní (Kanbar a Engels, 2003; 2005). Kleštík typicky vytváří 1 krmný otvor (Kanbar a Engels, 2004; Calderón *et al.*, 2009), který je relativně velký. Průměrná délka otvoru je 100 μm (Kanbar a Engels, 2004; Ramsey *et al.*, 2019), ale může dosáhnout délky až 300 μm (Kanbar a Engels, 2005). Nejcitlivější vývojové stádium včel ke kleštíku včelímu jsou kukly a larvy (De Jong *et al.*, 1982; Schatton-Gadelmayer a Engels, 1988). Roztoč, přítomný v larvičkách a kuklách je spojován s narušeným vývojem včel, se sníženou syntézou lipidů a se sníženými titry proteinů (Bowen-Walker a Gunn, 2001). Parazitované včely nejsou schopny nahradit chybějící bílkoviny (van Dooremalen *et al.*, 2013).

Parazitace během vývoje způsobuje výraznou ztrátu hmotnosti líhnoucí se včely. Ztráta hmotnosti závisí na počtu samic a na počtu nově vzniklých roztočů. Napadení i jedním roztočem *Varroa* vede k 7% ztrátě hmotnosti líhnoucí se včely (De Jong *et al.*, 1982; Schatton-Gadelmayer a Engels, 1988). Dělnice, které byly parazitovány během svého vývoje mají výrazně zkrácenou délku života (De Jong *et al.*, 1982; Schneider a Drescher, 1987; Amdam *et al.*, 2004) a sníženou toleranci k pesticidům (Wahl a Ulm, 1983; Schneider a Drescher, 1987).

V případě, že roztoč parazituje na kuklách trubců, snižuje se trubčí hmotnost o 11-19 %. Stejně, jako v případě líhnoucích se včel, závisí na míře napadení (Duay *et al.*, 2003). Snížení hmotnosti u trubců má za následek zkrácení doby letu (Duay *et al.*, 2002).

Dříve se mělo za to, že se roztoč živí hemolymfou včely (Tewarson a Engels, 1982; Donze a Guerin, 1994; Garedew *et al.*, 2004). Avšak odlišná škála patologií, kterou

způsobuje *Varroa destructor* byla obtížně vysvětlitelná na základě závěru, že se roztoč živí hemolymfou (Ramsey *et al.*, 2019). Odstranění hemolymfy nikdy nevysvětlilo, proč včely nejsou schopny nahradit chybějící proteiny, nebo proč vykazují sníženou schopnost syntetizovat lipidy, jelikož hemolymfa není úložištěm proteinů, ani není místem syntézy lipidů (Locke, 1980; Keeley, 1985; Bowen-Walker a Gunn, 2001). Ramsey *et al.*, (2019) zjistili, že roztoč *Varroa destructor* se primárně živí tukovým tělesem a ne hemolymfou. Díky tomuto zjištění je již možné vysvětlit rozdílnou škálu patologií (Ramsey *et al.*, 2019), jelikož tukové těleso je místem syntézy a úložištěm proteinů a lipidů (Locke, 1980; Keeley, 1985; Arrese a Soulages, 2010).

Poškození na úrovni včelstva se objevuje i při mírné infestaci včelstva roztočem *Varroa*. Napadené kolonie se méně rojí (Fries *et al.*, 2003; Villa *et al.*, 2008). Omezení růstu populace způsobuje snížený výnos medu, klinické příznaky ovšem stále nemusí být patrné a včelařem nemusí být rozpoznáno. Kroky k nevratnému poškození jsou malé, zvláště pokud populace roztočů stále roste a hostitelská populace včelstva klesá (Fries *et al.*, 2003).

2.2.6.1 Poškození tukového tělesa

Tukové těleso je orgán, který je bohatý na živiny, nachází se blízko kutikuly dospělých i ještě nevyvinutých včel (Arrese a Soulages, 2010). Je to primární místo syntézy proteinů a obsahuje relativně vysoké hladiny guaninu (Cochran, 1979; Arrese a Soulages, 2010). Základní úloha tukového tělesa je při regulaci hormonů, imunitní odpovědi. Slouží ke skladování energie, jejímu využití a také při detoxikaci pesticidů (Arrese a Soulages, 2010).

Tukové těleso u larev je velmi silně vyvinuto. Je tvořeno vrstvami buněk, jež vyplňují značnou část těla larvy. Slouží jako rezervoár zásobních živin pro larvu a následně jsou spotřebovány hlavně v dalším období celkové přestavby těla, kdy larva nepřijímá potravu. Tukové těleso u dospělých včel se nachází hlavně v zadečku kolem trávicího ústrojí a na ventrální straně pod kutikulou. Jeho velikost se mění podle fyziologického stavu včel, podle jejich výživy v larválním období i podle roční doby (Veselý, 1985).

Varroa destructor se primárně živí tukovým tělesem a ne hemolymfou. Roztoči, kteří byli krmeni hemolymfou se nijak nelišili od roztočů, kteří hladověli (Ramsey *et al.*, 2019). Hmyzí hemolymfa je relativně chudá na obsah cukrů a tuků, které by využívali

jako zdroje živin roztoči *Varroa* (Rapp, 1947; Popel *et al.*, 1994). Naopak roztoči, kteří se živili na tukovém tělese přežili déle a produkovali více vajíček (Ramsey *et al.*, 2019).

2.2.6.2 Ovlivnění obsahu proteinů a množství hemocytů v hemolymfě

Vitellogenin je nejvíce znám jako žlutkový protein. Je to glykoprotein o molekulové hmotnosti 180 kDa. Je syntetizován v buňkách tukového tělesa a uvolňován do hemolymfy (Fleig, 1995). Vitellogenin snižuje oxidační stres a podstatně prodlužuje život včel v zimním období (Amdam *et al.*, 2003).

V porovnání s létavkami (včely, které vylétávají z úlu a přinášejí do něj nektar, vodu, pyl apod.) byla u kojiček (včely, které krmí matku a plod mateří kašičkou) zjištěna vyšší hladina vitellogeninu v hemolymfě. Vitellogenin slouží jako zásobní protein, který mohou kojičky použít k produkci krmiva (Amdam *et al.*, 2003). Vysoká koncentrace vitellogeninu udržuje nízkou hladinu juvenilního hormonu, čímž zpomaluje stárnutí létavek a potenciálně zahajuje vznik dlouhověkých zimních včel (Fluri *et al.*, 1982; Döke *et al.*, 2015). Včelí kolonie přezimují s velmi omezenými zásobami pylu (hlavní zdroj aminokyselin, proteinů a lipidů pro včely), a proto je pravděpodobné, že si zásobní proteiny dělnice ukládají ve formě vitellogeninu (Fluri *et al.*, 1982; Maurizio, 2015). Bylo zjištěno, že včely napadené kleštíkem mají nižší koncentraci proteinů v hemolymfě, a to včetně vitellogeninu. Naproti tomu zdravé včely měly hladinu proteinů v hemolymfě vyšší (Amdam *et al.*, 2004).

Aby mohl kleštík včelí parazitovat na včele medonosné probodne její kutikulu. V kutikule poté vzniká rána, která zůstává nezhojena mnoho dní (Kanbar a Engels, 2003; 2005). V případě, že dojde k poškození kutikuly jsou obvykle aktivovány imunitní a hojivé reakce, jejichž cílem je zvýšení šance na přežití a zamezení ztráty hemolymfy (Theopold *et al.*, 2002; Dushay, 2009). Avšak v případě parazitace kleštíkem včelím dochází k tomu, že krmný otvor zůstává nezhojen, jelikož ve slinách, které kleštík produkuje při propíchnutí kutikuly jsou přítomny antikoagulační proteiny (Richards *et al.*, 2011). Proteiny obsažené ve slinách rovněž poškozují hemocyty cirkulující v hemolymfě. Způsobují rozklad hemocytů, inhibují jejich schopnost rozšířit pseudopody (povrchové výčnělky) a migrovat tak, aby vytvořily agregáty (Richards *et al.*, 2011).

2.2.7 Virózy včel asociované kleštíkem včelím

Roztoč kleštík včelí působí jako přenašeč mnoha včelích viróz, kterých do dnešní doby bylo popsáno přes 20 (Grozinger a Flenniken, 2019). Jako přenašeč byl *Varroa destructor* spojen s kašmírským virem (KBV), s virem akutní paralýzy včel (ABPV), s virem izraelské akutní paralýzy (IAPV) a s virem deformovaného křída (DWV) (Boecking a Genersch, 2008). Před výskytem roztočů *Varroa* byly viry včel považovány za menší hrozbu pro zdraví včel (Allen *et al.*, 1986; Bailey a Ball, 1991; Bowen-Walker *et al.*, 1999; Yue a Genersch, 2005).

2.2.7.1 Kašmírský virus – KBV

Původ KBV viru u včelích druhů je nejasný. Poprvé byl izolován z dospělých včel medonosných, které byly experimentálně naočkované extraktem z včely východní v Kašmíru, severozápadní oblast Indie, odtud název (Bailey a Woods, 1977).

KBV je patogenní všechny vývojové fáze včel (Hornitzky, 1981; Hornitzky, 1982) a běžně přetrvává u plodu a dospělých včel jako skrytá infekce (Dall, 1985). Klinické příznaky nejsou spolehlivě definovány. Úmrtnost způsobená KBV se vyskytuje bez jasně definovaných symptomů nemoci (Bailey *et al.*, 1979).

2.2.7.2 Virus akutní paralýzy včel – ABPV

Virus ABPV byl poprvé objeven během laboratorních testů s virem chronické paralýzy včel (Bailey *et al.*, 1963). ABPV lze detekovat jak u dospělých včel, tak i ve stádiu vývoje včely. U včel v přírodě se virus ABPV vyskytuje u zjevně zdravých dospělých včel (Bailey, 1965; Bailey *et al.*, 1981).

2.2.7.3 Virus deformovaných křídel – DWV

DWV byl poprvé izolován z nakažených včel v Japonsku. Je to jeden z mála včelích virů, který způsobuje dobře definovatelné symptomy. K typickým příznakům nemoci patří zmačkaná a scvrklá křídla, menší velikost těla a změna zbarvení dospělých včel. Viriony DWV můžeme najít jak u dospělých včel, tak i v dalších stádiích vývoje včel (Kovac a Crailsheim, 1988; Bailey a Ball, 1991; Ball a Bailey, 1997).

2.2.8 Vliv na humorální imunitní systém

Vlastnosti imunity včel ovlivňuje kleštík včelí, rovněž i viry a jiné mikroby, které kleštík přenáší (Gregory *et al.*, 2005; Yang a Cox-Foster, 2007). Několik studií zabývajících se imunitní odpovědí včely medonosné ukázalo, že roztoči a viry mohou změnit hladiny transkriptů genů souvisejících s imunitou (Khongphinitbunjong *et al.*, 2015). Parazitace roztočem *Varroa* spojená s virovou infekcí vedla k významně vyššímu množství transkriptů pro antimikrobiální peptidy: abaecin, hymenoptaecin a defensin 1 (Gregorc *et al.*, 2012).

PGRPs tvoří velkou skupinu konzervovaných proteinů. Jsou přítomny u hmyzu i u savců a mají společnou doménu o 160 AMK (Kang *et al.*, 1998). Výsledky Gregorc *et al.*, 2012 prokázaly, že při napadení včely kleštíkem dojde ke zvýšení hladin transkriptů PGRP. Infestaci kleštíkem lze spojit se zvýšenou hladinou genu PGRP-SC (peptidoglykan rozpoznávající protein S1) (Gregorc *et al.*, 2012). PGRP-SC je známý pro svou funkci potlačení aktivaci dráhy Imd (Bischoff *et al.*, 2006; Richard *et al.*, 2012).

Profenoloxidasa je klíčovým enzymem v melanizační reakci, která je významným obranným mechanismem a součástí humorálního imunitního systému včely medonosné. Exprese genu profenoloxidasy hraje zásadní roli v omezení růstu a množení mikrobů (Zou *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Během krmení roztoči *Varroa* inhibují proces melanizace kolem krmného otvoru dosud neznámým mechanismem. Napadený plod má sníženou expresi genu, jež aktivuje profenoloxidasu. Toto zjištění naznačuje, že roztoči přímo inhibují regulaci fenoloxidasové kaskády, což může později zvýšit riziko mikrobiální kontaminace nebo šíření patogenů (jako například DWV) (Khongphinitbunjong *et al.*, 2015).

Exprese genů pro lysozym je silně indukována bakteriemi (Gillespie *et al.*, 1997). Avšak v případě parazitismu roztočem *Varroa* byly potlačeny geny pro lysozym (Yang a Cox-Foster, 2005).

Při infekci se z tukového tělesa a hemocytů včely uvolňují čtyři různé peptidy: apidaecin, hymenoptaecin, abaecin a defensin (Casteels *et al.*, 1993). Peptidy přítomné v hemolymfě eliminují většinu bakterií (Casteels-Josson *et al.*, 1994), avšak zatím není známá souvislost mezi expresí určitého antibakteriálního peptidu v závislosti na parazitaci kleštíkem včelím. V roce 2005 bylo zjištěno, že *Varroa* působí jako imunosupresivum pro parazitované včely, tedy že kolonie více napadené exprimují méně defensinu 2 (Yang a Cox-Foster, 2005). Naproti tomu Abbo *et al.*, 2017 zjistili pozitivní korelaci mezi expresí defensinu a úrovní parazitace. Dle nejnovějšího výzkumu není

možné stanovit vztah mezi defensinem 2 a parazitací roztočem *Varroa*. Bylo ovšem prokázáno, že při zvýšení virové zátěže DWV, jehož je *Varroa destructor* vektorem, dochází k expresi abaecinu (Flores *et al.*, 2021). Nazzi *et al.*, (2012) zjistili, že zvýšený počet roztočů *Varroa* spouští vyšší hladiny DWV.

3 METODY DETEKCE A KVANTIFIKACE ANTIMIKROBIÁLNÍCH PEPTIDŮ

Pro detekci včelích antimikrobiálních peptidů se využívá několik metod. Využívá se elektroforéza na polyakrylamidovém gelu následovaná metodou Western blot. K separaci se využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) následovaná hmotnostní spektrometrií. K purifikaci peptidů se využívá extrakce na pevné fázi. Metoda qPCR se využívá ke stanovení exprese genů.

Apidaecin, abaecin, hymenoptaecin a defensin se izolují z hemolymfy. Jsou vysoce bazické, velmi stabilní při nízkém pH a vysoké teplotě. Díky vysoké stabilitě AmP je možné ze vzorku srážet protein pomocí 0,1 % kyseliny trifluoroctové. Následně se i nesražené proteiny denaturují varem. (Casteels *et al.*, 1989; 1990; 1993; Casteels-Josson *et al.*, 1994).

Royalisin se izoluje z mateří kašičky. Royalisin je amfifilní peptid. Fujiwara *et al.*, 1990 použili k purifikaci royalisinu kyselou extrakci následovanou gelovou filtrací. Další purifikace proteinu byla provedena pomocí HPLC na reverzní fázi (Fujiwara *et al.*, 1990).

3.1 Detekce a kvantifikace AmP

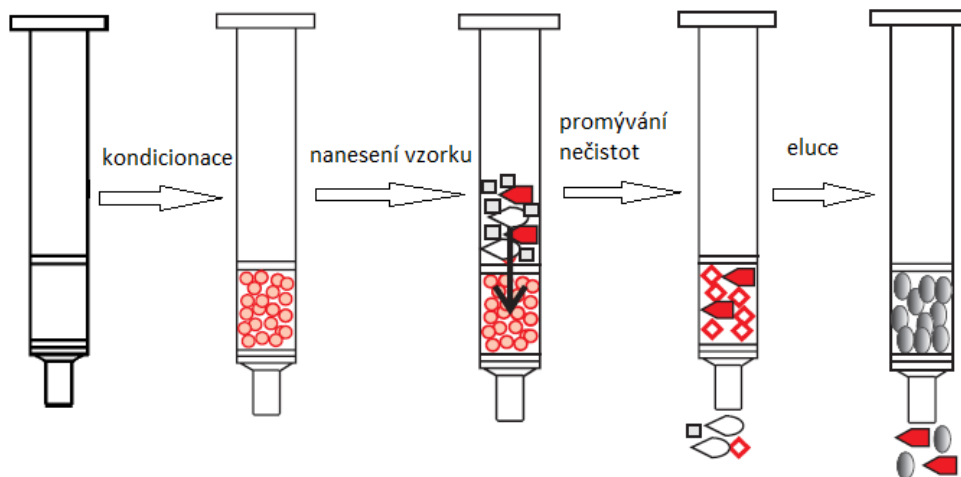
3.1.1 Extrakce na pevné fázi – SPE

Extrakce na pevné fázi je populární technika pro rychlou a selektivní přípravu vzorků. Metoda SPE se používá pro čištění vzorků a izolaci analytů z nejrůznějších matic (Biziuk, 2001). Mezi výhody této metody patří vysoká výtěžnost, účinné zakoncentrování analytu (Nováková a Douša, 2013b), získání vysoce purifikovaného extraktu či snadná možnost automatizace (Žwir-Ferenc a Biziuk, 2006).

Princip SPE je podobný principu extrakce kapalina-kapalina, ale zahrnuje rozdělení látek mezi kapalinu (matrice vzorku nebo rozpouštědlo) a pevnou fázi (stacionární fáze) (Camel, 2003). Pro úspěšnost extrakce musí mít analyt vyšší afinitu k pevné fázi než k matrici vzorku. Obecný postup je kondicionování kolonky (Nováková a Douša, 2013b), zavedení roztoku na pevnou fázi, odplavení nežádoucí složky a poté vyplavení analytů do sběrné zkumavky (Camel, 2003).

Výběr vhodné stacionární fáze závisí na mechanismu interakce mezi stacionární fází a sledovaným analytem, např. na znalosti hydrofobních, polárních a ionogenních

vlastností obou látek. Nejběžnější retenční mechanismy jsou v SPE založeny na van der Waalsových silách (nepolární interakce), vodíkových vazbách, vazbě dipól-dipól (polární interakce) a iontové interakce (Žwir-Ferenc a Biziuk, 2006).



Obrázek 5 – Schéma extrakce na pevné fázi (převzato a upraveno z Guide to Solid Phase Extraction, 1998).

Existují tři základní druhy extrakcí, které se liší polaritou jednotlivých fází: reverzní fáze, normální fáze a iontově výměnná fáze (Žwir-Ferenc a Biziuk, 2006).

3.1.1.1 Reverzní fáze

Separace na reverzní fázi zahrnuje nepolární stacionární fázi a polární matici vzorku. Cílený analyt je obvykle středně polární až nepolární. Retenčním mechanismem jsou hydrofobní interakce typu van der Waalsových sil či disperzních sil (Žwir-Ferenc a Biziuk, 2006). Retence organických analytů z polárních roztoků (vodných) je způsobena přitažlivými silami mezi vazbami uhlík-vodík v analytu taktéž nepolárními řetězci na povrchu stacionární fáze. Analyt je eluován promytím kolonky nepolárním rozpouštědlem, které narušuje interakci analytu a stacionární fáze (Guide to Solid Phase Extraction, 1998).

3.1.1.2 Normální fáze

Normální fáze SPE obvykle zahrnuje polární analyt, mírně polární až nepolární matici a polární stacionární fázi. Zadržení analytu je způsobeno interakcemi mezi polárními funkčními skupinami analytu a polárními skupinami na povrchu stacionární fáze (vodíková vazba, π - π interakce, interakce dipól-dipól nebo indukovaný dipól-dipól). Sloučenina adsorbovaná pomocí těchto mechanismů je eluována průchodem polárního rozpouštědla, které narušuje vazby. Rozpouštědlo (aceton či hexan) je obvykle polárnější než původní matrice vzorku (Guide to Solid Phase Extraction, 1998).

3.1.1.3 Iontově výměnná fáze

Separaci iontově výměnnou fází lze použít pro sloučeniny, které jsou v roztoku nabitě. Roztok obvykle bývá vodný, někdy i organický. Dochází k oddělení analytu na základě elektrostatických interakcí mezi analytem a kladně nebo záporně nabitými skupinami ve stacionární fázi. K eluci analytu z kolony se používá roztok o hodnotě pH, které neutralizuje buď funkční skupinu na povrchu stacionární fáze, anebo funkční skupinu sloučeniny. V případě, že je jedna z těchto skupin neutralizována, dojde k narušení elektrostatické síly a sloučenina je z kolony eluována. Jinou možností je použití roztoku o vysoké iontové síle. Případně roztoku, který obsahuje ionty, které vytlačují adsorbovanou sloučeninu (Guide to Solid Phase Extraction, 1998).

Danihlík *et al.*, 2014 vyvinul nový analytický postup pro izolaci a kvantifikaci peptidu apidaecinu 1. Postup je založen na kombinaci reverzní fáze slabé iontoměničové směšovací extrakce na pevné fázi a nanokapilární kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením.

SPE se nevyužívá jen k purifikaci antimikrobiálních peptidů včel, ale využívá se i pro purifikaci AmP z jiných zdrojů. León-Calvijo *et al.*, 2015 využil SPE k purifikaci Lactoferricinu (antimikrobiální peptid z mléčného proteinu). Byla využita reverzní fáze, kolony Supelclean LC-18, které byly před použitím aktivovány a ekvilibrovány.

3.2 Metody separace a detekce AmP

3.2.1 Kapalinová chromatografie-hmotnostní spektrometrie - LC-MS

Základním obecným principem chromatografických metod je nestejněměrné rozdělování složek směsi mezi stacionární a mobilní (pohyblivou) fázi. Předpokladem nestejněměrnosti rozdělení je různá afinita jednotlivých složek k mobilní a stacionární fázi nebo jejich nestejná schopnost do nich difundovat. Důsledkem toho jsou jednotlivé složky zadržovány v systému různou dobu a opouštějí tak chromatografický systém v odlišných časech – retenčních časech (Mikeš, 1980).

Hmotnostní spektrometrie je metoda analytické chemie, která je svou podstatou separační technikou. Je založena na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. Všechny hmotnostní spektrometry se skládají ze tří částí – iontový zdroj, analyzátor a detektor částic. Hmotnostní spektrometrie má široké využití, používá se v potravinářství, zemědělství nebo třeba ve farmacii (Friedecký a Lemr, 2012).

Peptidy se obvykle rozdělují vysoce účinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi (RP-HPLC) (Danihlík *et al.*, 2014). Mobilní fáze je polární, obvykle se jedná o směs vodné složky s polárními organickými rozpouštědly, která jsou mísitelná s vodou. Stacionární fáze má nepolární charakter. Nejčastěji se jako stacionární fáze používají dlouhé uhlíkaté řetězce navázané na povrch nosiče (silikagel). Nejčastěji využívanou fází je C₁₈. Retence látek vzniká na základě jejich hydrofobních interakcí se stacionární fází. Při separaci na reverzních fázích je retence látek ovlivněna množstvím nepolární fáze na nosiči (obsah uhlíku a délka alifatických řetězců a složením mobilní fáze) (Nováková a Douša, 2013a).

Kapalinová chromatografie - hmotnostní spektrometrie (LC - MS) je analytická technika používaná při identifikaci složek ve směsích. Ve své nejjednodušší podobě se směs zavede do kapalinového chromatografu, kde se oddělí (částečně nebo úplně) na její součásti. Tyto různé komponenty eluují z kapalinového chromatografu postupně. Odtok z kapalinového chromatografu se zavede do hmotnostního spektrometru, kde jsou získána hmotnostní spektra z oddělených složek. Z hmotnostních spekter můžeme zjistit molekulární hmotnosti složek a molekulární struktury složek (Buschow *et al.*, 2001).

Casteels *et al.*, 1989, 1990, 1993 použili k separaci fragmentů metodou RP-HPLC na C₄ koloně. Následně byla použita metoda RP-HPLC na C₁₈ koloně pouze pro vybrané frakce. Metoda RP-HPLC se využívá jak pro peptidy, které včela uvolňuje do hemolymfy (apidaecin, abaecin, hymenoptaecin), pro peptidy, jež včela uvolňuje do jedu (melittin), i pro peptidy z mateří kašičky (jelleiny). Marques Pereira *et al.*, 2020 využila pro separaci peptidů ze včelího jedu pouze metodu RP-HPLC na C₁₈ koloně. Fontana *et al.*, 2004 využil stejnou metodu pro separaci peptidů z mateří kašičky. Po detekci peptidů byla určena jejich aminokyselinová sekvence. Peptidy se dále mohou analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie (Casteels *et al.*, 1993; Pereira *et al.*, 2020).

3.2.2 Elektroforéza

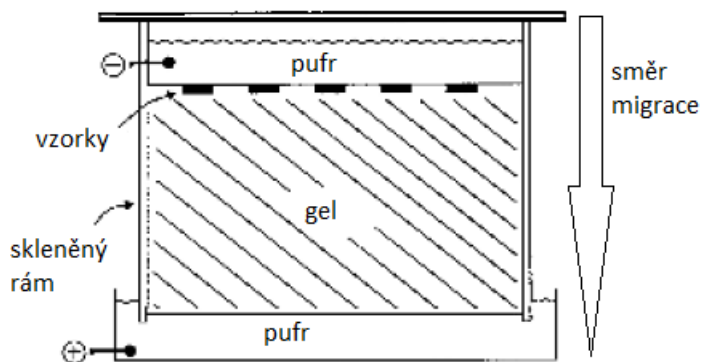
Elektroforéza je elektromigrační metoda, která rozděluje látky na základě různé pohyblivosti elektricky nabitých částic v elektrickém poli. Separací systém je složen ze dvou elektrod, které jsou umístěny do vodivého prostředí. Mezi elektrody je vložen gradient elektrického pole. Rychlost pohybu elektricky nabitých částic závisí na vloženém napětí i na odporu prostředí. Elektroforézu můžeme rozdělit dle principu na elektroforézu bez nosiče a na elektroforézu na nosiči (Lehotay, 2009).

Elektroforéza na nosiči je v praxi více používaná (Lehotay, 2009). Vzorek se pohybuje a pevném podkladu jako je například filtrační papír, celulóza nebo gel (Voet a Voetová, 1995). Nosič je nasycen tlumivým roztokem, ten zabezpečí vodivost mezi elektrodami. Mezi elektrodami se vkládá potenciál několik set voltů (Lehotay, 2009).

3.2.2.1 Gelová elektroforéza a Western blot

Gelová elektroforéza se používá pro dělení makromolekul. Nejčastěji používanými gely jsou agarosový a polyakrylamidový gel. Velké molekuly se oproti malým zpožďují, jelikož pronikají gelem obtížněji (Voet a Voetová, 1995).

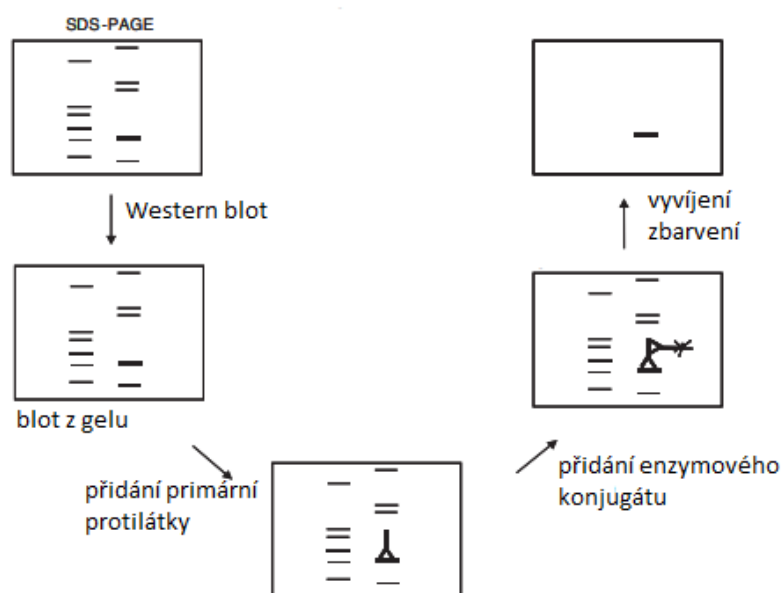
Agarosové gely obsahují ve své struktuře velké póry, z toho důvodu se využívají pro separaci a analýzu DNA. Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu je citlivá metoda poskytující vysoké rozlišení. Využívá se pro separaci proteinů, fragmentů RNA a fragmentů DNA (Mikkelsen a Cortón, 2004). SDS-PAGE je elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS). Bílkoviny jsou nejdříve denaturovány varem v přítomnosti β -merkaptoethanolu a iontového detergentu SDS, který nese záporný náboj. Denaturované bílkoviny jsou všechny „potažené“ SDS a nesou tudíž zhruba stejný specifický záporný náboj, jsou po připojení zdroje el. proudu rozděleny dle velikosti. SDS-PAGE se využívá ke stanovení molekulové hmotnosti proteinů porovnáním jejich pohyblivosti v gelu s pohyblivostí standardů o známé relativní molekulové hmotnosti (Murray, 2002).



Obrázek 6 – Schéma gelové elektroforézy (převzato a upraveno z Mikkelsen a Cortón, 2004).

Western blot je technika, která se využívá pro kvalitativní nebo semikvantitativní detekci určitého proteinu ve vzorku. Blottingové techniky byly poprvé využity v roce 1975 pro analýzu DNA (Southern blotting), později byly tyto metody aplikovány na RNA (Northern blotting) a proteiny (Western blotting). Tyto techniky se využívají, pokud chceme extrahovat proteiny nebo nukleové kyseliny z elektroforetického gelu pro další charakterizaci nebo pro mikropreparativní účely. Bandy z elektroforetického gelu jsou fixovány buď adsorpcí, nebo kovalentně (Pingoud *et al.*, 2002).

U metody Western blot jsou proteiny z SDS-PAGE elektroforeticky přeneseny na nitroceluloseovou membránu nebo na polyvinylidendifluoridovou (PVDF) membránu. Obě tyto membrány mají vysokou kapacitu pro proteiny, čehož se využívá u mikropreparativních účelů. Má-li být protein detekován imunochemicky, jsou neobsazená hydrofobní vazebná místa na membráně nejprve blokována, buď hovězím albuminem, nebo levněji odtučněným sušeným mlékem. Proteiny jsou detekovány vazbou specifické protilátky proti sledovanému proteinu (primární protilátka) a poté inkubací se sekundární protilátkou (namířenou proti první protilátce), která je spojena s enzymem, jako je alkalická fosfatasa nebo peroxidasa. Přítomnost těchto enzymů je stanovena kalorimetricky přeměnou chromogenních substrátů na barviva. (Pingoud *et al.*, 2002).



Obrázek 7 – Schematické znázornění metody Western blot a detekce (převzato a upraveno z Kurien a Scofield, 2006).

Proaño *et al.*, 2021 využil k separaci a detekci antimikrobiálních peptidů metodu SDS-PAGE a Western blot. Tyto metody využili k separaci a detekci včelího defensinu 1 z medu. Byla využita nitrocelulosová membrána, k blokování byl použit pufr, který obsahoval odtučněné sušené mléko. Jako primární protilátka byla použita králičí polyklonální protilátka proti včelímu defensinu 1. Jako sekundární se použila kozí anti-králičí protilátka spojená s křenovou peroxidasou.

Při analýze peptidů z mateří kašičky byla pro separaci využita tricínová SDS-PAGE. Pro detekci peptidu byla využita metoda Western blot, avšak na rozdíl od Proaño *et al.*, 2021 byly proteiny přeneseny na PVDF membránu. K blokování bylo využito odtučněné sušené mléko. Jako primární protilátka byla využita králičí polyklonální protilátka proti apimisinu. Jako sekundární byla využita prasečí anti-králičí protilátka spojená s peroxidasou. (Bilíková *et al.*, 2002).

3.3 Metody studia genové exprese AmP

3.3.1 Kvantitativní PCR – RT-qPCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla zavedena v roce 1985 Kary B. Mullisem. (Šmarda *et al.*, 2005). PCR je metoda zmožení určité sekvence DNA. Její specifita je založena na použití dvou výchozích nukleotidových jednotek (primerů), které hybridují do komplementárních sekvencí opačných vláken DNA a ohraničují žádanou sekvenci. Vzorek DNA je nejdříve zahříván, aby se oddělila obě vlákna (denaturace DNA), primery se nechají navázat na DNA (annealing) a každé vlákno je kopírováno DNA-polymerasou počínajíc od primeru. Dvě vlákna DNA slouží poté jako matrice pro syntézu nové DNA ze dvou primerů (extenze). Opakování cyklů denaturace, připojení primerů k jejich komplementárním sekvencím a prodlužování připojených primerů DNA polymerasou vede k exponenciálnímu množení segmentů DNA o definované délce (Murray, 2002). Pro syntézu dostatečného množství amplikonu je potřeba cyklus PCR opakovat 25-30 (Mülhardt, 2007). Výsledkem PCR je namnožená sekvence templátové DNA. K vyhodnocení je potřeba využít další techniky. Využívá se gelová elektroforéza či Southern blot (McPherson a Moller, 2006).

qPCR – kvantitativní PCR, PCR v reálném čase je variantou PCR, která umožňuje přímou kvantifikaci produktů v průběhu reakce. Cyklus qPCR je velmi podobný klasické PCR. V každé cyklu se opakují tři fáze: denaturace dvouřetězcové DNA, annealing a extenze. Do reakční směsi se přidávají fluorescenční barviva, jelikož produkty nejsou

samy od sebe schopné fluorescenčního záření. Fluorescenční barviva jsou schopny fluorescenčního záření, ale neovlivňují průběh reakce. Kvantifikace produktů se provádí prostřednictvím detekce a kvantifikace fluorescenčního signálu, protože intenzita fluorescenčního signálu je přímo úměrná množství produktu (Bustin, 2004; Šmarda *et al.*, 2005). Dle vazby fluorescenčního barviva na DNA rozlišujeme specifickou a nespecifickou detekci produktu. K nespecifické detekci produktu se využívají interkalační barviva. Interkalační barviva se vážou na dsDNA, která vzniká během PCR. Vazba barviva je reverzibilní. Často využívaným barvivem je barvivo SYBR Green (Bustin, 2004). Jednou z nevýhod interkalačních barviv je, že detekují veškerou DNA, která je přítomna v reakční směsi, tedy i nespecifické produkty (Kaltenboeck a Wang, 2005). U specifické detekce dochází ke změně fluorescence pouze při amplifikaci cílové sekvence. Využívá se sond, které jsou sekvencí komplementární k templátové DNA. V případě použití sond již nemohou být detekovány nespecifické produkty (Mülhardt, 2007).

qPCR se využívá pro kvantitativní analýzu genové exprese. Analýza genové exprese probíhá na úrovni mRNA, nikoli na úrovni DNA. Před provedením metody qPCR je potřeba přepsat RNA do komplementární cDNA pomocí reverzní transkripce. Přepis RNA do DNA probíhá s použitím enzymu reverzní transkriptasy (Valasek a Repa, 2005). RNA je ve srovnání s DNA extrémně labilní, proto musí být izolace provedena co nejpečlivěji. Pro izolaci RNA se využívá guanidinium thiokyanát-fenolchloroformová metoda. Metoda je založena na fázové separaci. Vzorek se nejdříve podrobí centrifugaci ve směsi fenolu, chloroformu a GITC (guanidinium isothiokyanát). Po centrifugaci je RNA přítomna ve vodné fázi. RNA je precipitována pomocí 2-propanolu nebo ethanolu, je vysušena a rozpuštěna ve vodě nebo tris/EDTA pufru (Chomzynski, 1987). Pro izolaci RNA se kromě fenol-chloroformové metody využívají komerčně vyráběné kity. Výhodou kitů je rychlá, spolehlivá a pohodlná izolace RNA. Při práci navíc odpadá manipulace s toxickým chloroformem a žíravým fenolem (Kočárek, 2007).

Metodu qPCR pro studium AmP využil Klaudiny *et al.*, 2005 ke studiu defensinu 1. Wang *et al.* 2021 rovněž využil kvantitativní PCR za účelem stanovení exprese abaecinu u čmeláka (*Bombus lantschouensis*).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Materiál

4.1.1 Chemikálie

Albumin

Bradfordovo činidlo

4.1.2 Biologický materiál

Vzorky zdravých včel a včel ze včelstev silně napadených kleštíkem včelím. Vzorky byly získány od vedoucího práce.

4.1.3 Přístroje a vybavení

Analytické váhy

Kulový mlýn

Centrifuga

Mikrodestičkový spektrofotometr

4.2 Metody

4.2.1 Zpracování vzorku včel

Mrtvým včelám byla ustříhnuta hlavička, pinzetou byl vytáhnut trávicí trakt (uchopit žihadlo a zadečkovým článkem vytáhnout celý trávicí trakt) a poté byla ustříhnuta hrud' od zadečku. Jednotlivé části byly vloženy do mikrozkuhavek, poté byly přidány skleněné kuličky a 200 μ l vody. Jednotlivé části byly homogenizovány v kulovém mlýnu. Následně byly mikrozkuhavky centrifugovány při 16900·g 10 minut při laboratorní teplotě. Ze supernatantu bylo odebráno 20 μ l a přidáno 180 μ l vody. Z takto připravených extraktů byly stanoveny proteiny Bradfordovou metodou.

4.2.2 Stanovení proteinů metodou dle Bradforda

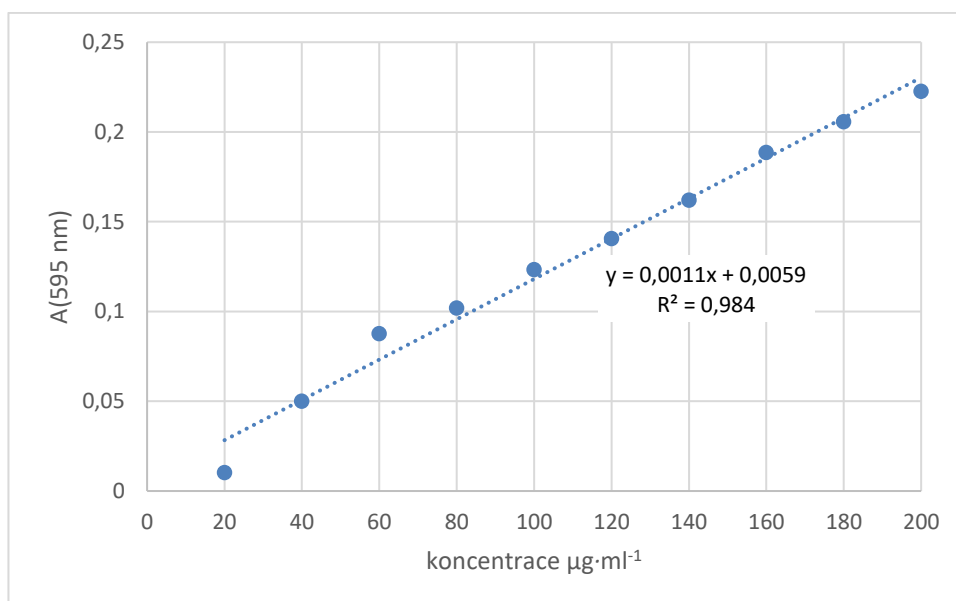
Měření probíhalo v mikrodestičkách, kam bylo postupně vneseno 45 μ l destilované vody, 5 μ l vzorku proteinu a 200 μ l pracovního roztoku Bradfordova činidla. Následně byla změřena absorbance při 595 nm (Bradford, 1976).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

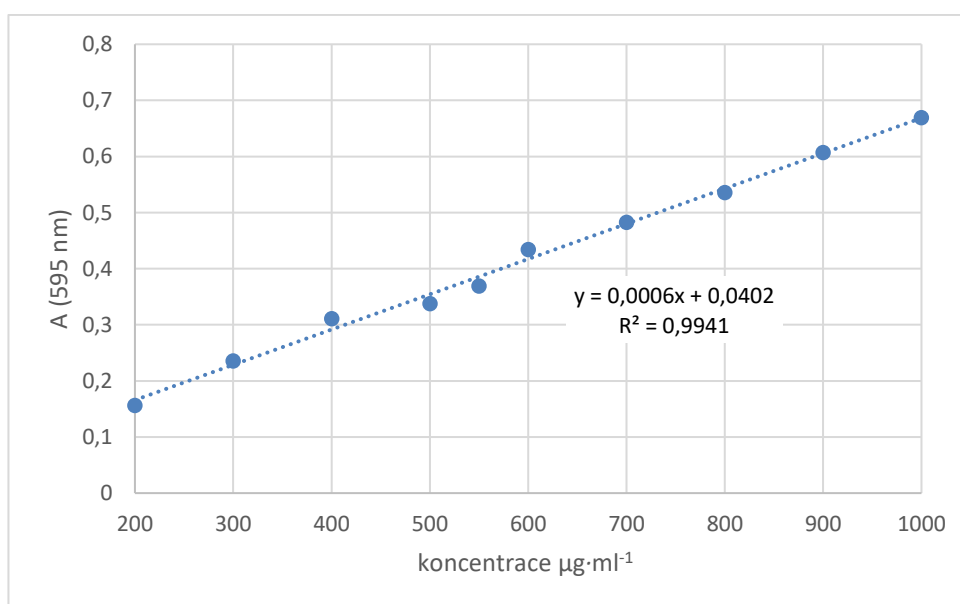
5.1 Stanovení proteinů metodou Bradforda

5.1.1 Kalibrační křivka

Pro stanovení proteinů Bradfordovou metodou byly vytvořeny dvě kalibrační křivky. 1. kalibrační křivka byla použita pro koncentraci v rozmezí 0-200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. 2. kalibrační křivka byla použita pro koncentraci 200-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Jako standard byl použit roztok albuminu.



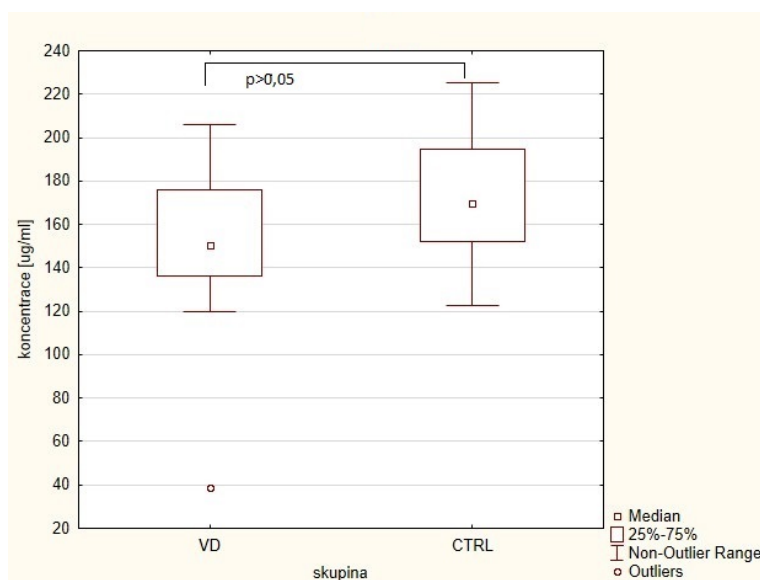
Obrázek 8 – Kalibrační křivka pro rozmezí 0-200 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Obrázek 9 – Kalibrační křivka pro rozmezí 200-1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

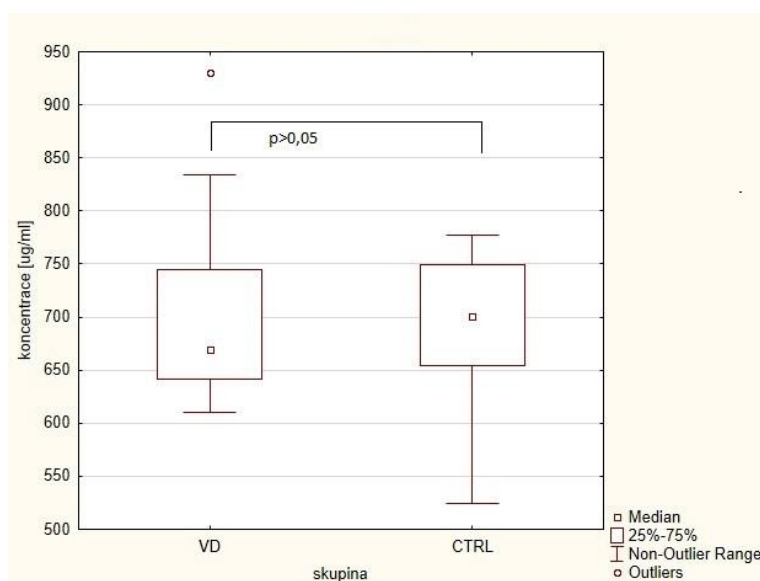
5.1.2 Stanovení proteinů ve vzorcích včel

Byla stanovena koncentrace proteinů metodou dle Bradforda ve vzorcích zdravých včel a ve vzorcích včel ze včelstev silně napadených kleštíkem včelím. Bylo zpracováno 11 vzorků zdravých včel a 11 vzorků včel ze včelstev silně napadených kleštíkem včelím. Proteiny byly stanoveny u obou skupin zvlášť v hlavě, hrudi a zadečku. Průměrná koncentrace proteinů v hlavách u zdravých včel byla $0,197 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 3,204\cdot 10^{-2}$, v hrudích od $0,450 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 5,931\cdot 10^{-2}$ a v zadečku od $0,291 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 7,321\cdot 10^{-2}$. Průměrná koncentrace proteinů v hlavách u včel ze včelstev nakažených varoózou byla $0,170 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 5,542\cdot 10^{-2}$, v hrudích $0,464 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 7,298\cdot 10^{-2}$ a v zadečku $0,325 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm 5,995\cdot 10^{-2}$. Vzorky byly vyhodnoceny T-testem na hladině významnosti 5 %. K vyhodnocení dat byl použit program Statistica.



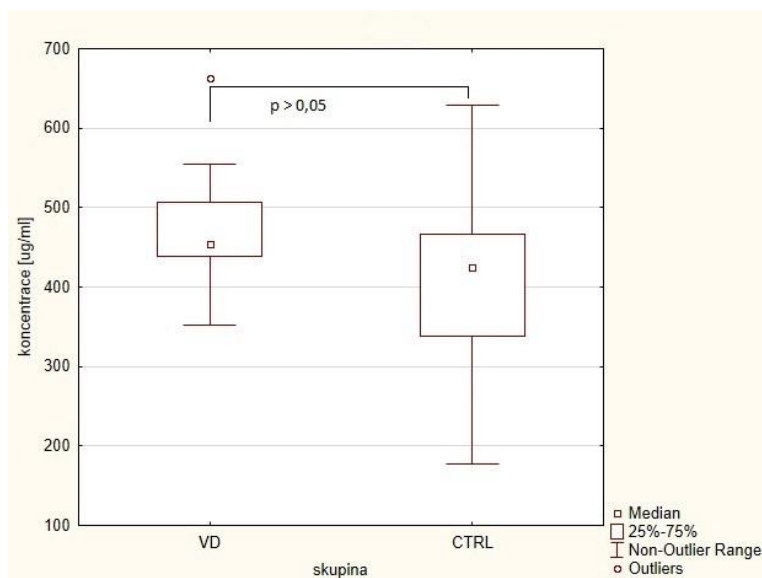
Obrázek 10 - Koncentrace proteinů v extraktu z hlav ze včel z kontrolní skupiny (n=11) (CTRL) a ve skupině včel odebraných z *Varroa* silně napadených včelstev (n=11) (VD).

Bowen-Walker a Gunn, 2001 zjistili, že u včel parazitovaných kleštíkem včelím došlo k poklesu množství proteinů v hlavě. Na hladině významnosti 5 % nebyl nalezen statisticky významný rozdíl u hlav mezi zdravými včelami a včelami ze včelstev ze silně napadených kleštíkem včelím. Výsledky odporují studii Bowen-Walker a Gunn, 2001. Vysvětlením by mohla být skutečnost, že *Varroa destructor* převážně neparazituje na hlavách včely medonosné (Ramsey *et al.*, 2019).



Obrázek 11 - Koncentrace proteinů v extraktu z hrudí ze včel z kontrolní skupiny (n=11) (CTRL) a ve skupině včel odebraných z *Varroa* silně napadených včelstev (n=11) (VD).

Na hladině významnosti 5 % nebyl nalezen statisticky významný rozdíl u hrudí mezi zdravými včelami a včelami ze včelstev silně napadených kleštíkem včelím. Výsledky potvrzují výzkum Bowen-Walker a Gunn, 2001, kteří zjistili, že k poklesu množství proteinů v hrudích po infestaci kleštíkem včelím nedochází.



Obrázek 12 - Koncentrace proteinů v extraktu ze zadečků ze včel z kontrolní skupiny (n=11) (CTRL) a ve skupině včel odebraných z *Varroa* silně napadených včelstev (n=11) (VD).

Kleštík je spojován se sníženými titry proteinů u parazitovaných včel v zadečku (Bowen-Walker a Gunn, 2001). Hlavním zdrojem potravy kleštíka včelího je tukové těleso (Ramsey *et al.*, 2019), které je mimo jiné hlavním místem syntézy proteinů (Arrese a Soulages, 2010). Očekávaným výsledkem proto měla být výrazně nižší hladina proteinů u včel ze včelstev silně napadených kleštíkem včelím. Na hladině významnosti 5 % nebyl nalezen statisticky významný rozdíl u zadečku mezi zdravými včelami a včelami ze včelstev ze silně napadených kleštíkem včelím. Surlis *et al.*, 2018 stanovovali obsah proteinů u kukel včely medonosné. V tomto výzkumu byla zjištěna rozdílná hladina proteinů u zdravých kukel včely medonosné a u kukel, které byly parazitovány kleštíkem včelím. V tomto výzkumu ovšem nebyla stanovována celková koncentrace proteinů, ale byly stanovovány konkrétní proteiny: proteiny související s kutikulou, transportem lipidů, vrozenou imunitou a proteiny podílející se na metabolických procesech. Bylo zjištěno, že při parazitaci dochází ke snížení koncentrace proteinů, které souvisejí s kutikulou, transportem lipidů a vrozenou imunitou. Na druhou stranu došlo ke zvýšení proteinů, které se podílejí na metabolických procesech. Důvodem, proč nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl, by mohlo být stanovování koncentrace celkových proteinů v tělních částech, nikoli stanovení koncentrace jednotlivých proteinů.

6 ZÁVĚR

Byla vypracována bakalářská práce s názvem Vliv kleštíka včelího na humorální imunitní systém včely medonosné. Bylo dosaženo těchto výsledků:

1. Byla zpracována literární rešerše o imunitním systému hmyzu.
2. Byla zpracována literární rešerše o vlivu kleštíka včelího a jím přenášených sekundárních nákaz na humorální imunitní systém včely medonosné.
3. Byl vypracován přehled metod používaných ke studiu změn hladin nebo genové exprese antimikrobiálních peptidů hmyzu a včel.
4. Bylo provedeno prvotní měření koncentrace proteinů v tělních částech včel odebraných ze včelstev infestovaných roztoči a včel zdravých.

7 LITERATURA

- ABBO, Pendo M., Joshua K. KAWASAKI, Michele HAMILTON, Steven C. COOK, Gloria DEGRANDI-HOFFMAN, Wen Feng LI, Jie LIU a Yan Ping CHEN, 2017. Effects of Imidacloprid and Varroa destructor on survival and health of European honey bees, *Apis mellifera*. *Insect Science*. 24(3), 467-477.
- ALBERTS, Bruce, 1998. *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Ústí nad Labem: Espero. ISBN 80-902-9060-4.
- ALLEN, M.F., B.V. BALL, R.F. WHITE a J.F. ANTONIW, 1986. The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA. *Journal of Apicultural Research*. 25, 100-105.
- AMDAM, G. V., K. NORBERG, A. HAGEN a S. W. OMHOLT, 2003. Social exploitation of vitellogenin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(4), 1799-1802.
- AMDAM, G.V., K. HARTFELDER, K. NORBERG, A. HAGEN a S.W. OMHOLT, 2004. Altered physiology in worker honey bees (Hymenoptera: Apidae) infested with the mite *Varroa destructor* (Acari: Varroidae): a factor in colony loss during overwintering? *Journal of Economic Entomology*. 97(3), 741-747.
- ANDERSON, D. a J.W.H. TRUEMAN, 2000. *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species. *Experimental and Applied Acarology*. 24, 165-189.
- ARRESE, E.L. a J.L. SOULAGES, 2010. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology*. 55, 207-225.
- ASHOK, Y., 2009. *Drosophila* toll pathway: the new model. *Science Signaling*.
- BAILEY, L., A.J. GIBBS a R.D. WOODS, 1963. Two viruses from adult honey bees (*Apis mellifera* Linnaeus). *Virology*. 21, 390-395.
- BAILEY, L., 1965. The occurrence of chronic and acute bee paralysis viruses in bees outside Britain. *Journal of Invertebrate Pathology*. 7, 167-169.
- BAILEY, L. a R.D. WOODS, 1977. Two more small RNA viruses from honey bees and further observations on sacbrood and acute bee-paralysis viruses. *Journal of General Virology*. 37, 175-182.
- BAILEY, L., J. M. CARPENTER a R. D. WOODS, 1979. Egypt Bee Virus and Australian Isolates of Kashmir Bee Virus. *Journal of General Virology*. 43(3), 641-647.
- BAILEY, L., B.V. BALL a J.N. PERRY, 1981. The prevalence of viruses of honey bees in Britain. *Annals of Applied Biology*. 97, 109-118.
- BAILEY, L. a B.V. BALL, 1991. *Honey bee pathology*. Second edn. London, UK: Academic Press.
- BALL, B.V. a L. BAILEY, 1997. *Viruses*. In "Honey Bee Pest, Predators, & Diseases". (R. A. Morse and K. Flottum, eds.). The A. I. Root Co., Medina, OH.
- BEETSMA, J. a K. ZONNEVELD, 1992. Observations on the initiation and stimulation of oviposition of the varroa mite. *Experimental and Applied Acarology*. 16, 303-312.
- BÍLIKOVÁ, K, J HANES, E NORDHOFF, W SAENGER, J KLAUDINY a J ŠIMÚTH, 2002. Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS Letters*. 528(1-3), 125-129.
- BISCHOFF, Vincent, Cécile VIGNAL, Bernard DUVIC, Ivo G BONECA, Jules A HOFFMANN, Julien ROYET a David SCHNEIDER, 2006. Downregulation of the *Drosophila* Immune Response by Peptidoglycan-Recognition Proteins SC1 and SC2. *PLoS Pathogens*. 2(2). ISSN 1553-7374.

- BIZIUK, M., 2001. *Pesticides, occurrence, determination, and disposal*. WNT: Warsaw.
- BOECKING, O. a E. GENERSCH, 2008. Varroosis – the ongoing crisis in bee keeping. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*. **3**(2), 221-228.
- BOOT, W.J., J.N.M. CALIS a J. BEETSMA, 1995. Does time spent on adult bees affect reproductive success of Varroa mites? *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **75**(1), 1-7.
- BOWEN-WALKER, P.L., S.J. MARTIN a A. GUNN, 1999. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera*) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. *Journal of Invertebrate Pathology*. **73**, 101-106.
- BOWEN-WALKER, Peter L. a Alan GUNN, 2001. The effect of the ectoparasitic mite, Varroa destructor on adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **101**(3), 207-217.
- BRADFORD, Marion 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.
- BROGDEN, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*. **3**(3), 238-250.
- BRUTSCHER, Laura M, Katie F DAUGHENBAUGH a Michelle L FLENNIKEN, 2015. Antiviral defense mechanisms in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*. **10**, 71-82. ISSN 22145745.
- BULET, P., C. HETRU, J.L. DIAMRICO a D. HOFFMANN, 1999. Antimicrobial peptides in insect; structure and function. *Developmental & Comparative Immunology*. **23**, 329-344.
- BUSCHOW, K.H.J., R.W. CAHN, M.C. FLEMINGS, B. ILSCHNER, E.J. KRAMER, S. MAHAJAN a P. VEYSSIÈRE, 2001. *Encyclopedia of materials: science and technology*. Second. New York: Elsevier. ISBN 978-0-08-043152-9.
- BUSTIN, Stephen, 2004. *A to Z of quantitative PCR*. International University Line.
- CALDERÓN, Rafael A., Natalia FALLAS, Luis G. ZAMORA, Johan W. VAN VEEN a Luis A. SÁNCHEZ, 2009. Behavior of varroa mites in worker brood cells of Africanized honey bees. *Experimental and Applied Acarology*. **49**(4), 329-338.
- CAMEL, V., 2003. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochimica Acta Part B*. **58**(1177).
- CASTEELS, P., C. AMPE, F. JACOBS, M. VAECK a P. TEMPST, 1989. Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal*. **8**(8), 2387-2391. ISSN 02614189.
- CASTEELS, Peter, Christophe AMPE, Lise RIVIERE, Jose DAMME, Christopher ELICONE, Mark FLEMING, Frans JACOBS a Paul TEMPST, 1990. Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*. **187**(2), 381-386. ISSN 0014-2956.
- CASTEELS, P., C. AMPE, F. JACOBS a P. TEMPST, 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.
- CASTEELS, P. a P. TEMPST, 1994. Apidaecin-Type Peptide Antibiotics Function through a Nonporeforming Mechanism Involving Stereospecificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **199**(1), 339-345.
- CASTEELS-JOSSON, K., W. ZHANG, T. CAPACI, P. CASTEELS a P. TEMPST, 1994. Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required posttranslational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry*. **269**(46), 28569-28575.

- CERENIUS, Lage a Kenneth SÖDERHÄL, 2004. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*. (198), 116-126.
- COCHRAN, D.G., 1979. Uric acid accumulation in young American cockroach nymphs. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **25**, 153-157.
- COOPER, E.L., 2006. Comparative immunology. *Integrative zoology*. **1**, 32-43.
- DALL, D.J., 1985. Inapparent infection of honeybee pupae by Kashmir and sacbrood bee viruses in Australia. *Annals of Applied Biology*. **106**, 461-468.
- DANIHLÍK, Jiří, Marek ŠEBELA, Marek PETŘIVALSKÝ a René LENOBEL, 2014. A sensitive quantification of the peptide apidaecin 1 isoforms in single bee tissues using a weak cation exchange pre-separation and nanocapillary liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **1374**, 134-144.
- DANIHLÍK, J. a M. PETŘIVALSKÝ, 2015. Aktuální vědecké poznatky o imunitě a zdraví včel. *Veterinářství*. **65**, 434-441.
- DANIHLÍK, J., K. ARONSTEIN a M. PETŘIVALSKÝ, 2016. Antimicrobial peptides: A key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*. 1-14.
- DE GUZMAN, L.I. a T.E. RINDERER, 1999. Identification and comparison of Varroa species infesting honey bees. *Apidologie*. **30**, 85-95.
- DE JONG, D., 1997. *Varroa and other parasites of brood*. In: Morse R, Flottum K (eds) *Honey bee pest, predators, and diseases*. Third edn. Ohio, USA: A.I. Root Company.
- DE JONG, D., P.H. DE JONG a L.S. GONCALVES, 1982. Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *V. jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*. **21**, 165-216.
- DE LA RUA, P., R. JAFFE, R. DALL'OLIO, I. MUNOZ a J. SERRANO, 2009. Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees. *Apidologie*. **40**, 263-284.
- DE RUIJTER, A. a J.P. KAAS, 1983. *The anatomy of the Varroa mite*. In: Cavalloro, R. (Ed.), *Varroa jacobsoni Oud Affecting Honey Bees: Present Status and Needs*. A.A. Balkema, Rotterdam, 45-47.
- DING, S.W. a O. VOINNET, 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*. 413-426.
- DING, SW, 2010. RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology*. **10**, 632-644.
- DI PRISCO, G., F. PENNACCHIO, E. CAPRIO, H.F., Jr. BONCRISTIANI, J.D. EVANS a Y. CHEN, 2011. Varroa destructor is an effective vector of Israeli acute paralysis virus in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of General Virology*. (92), 151-155.
- DOCKRELL, H.M., 1995. Immunology—a comparative approach. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **89**(3), 343-344. ISSN 00359203. Dostupné z: doi:10.1016/0035-9203(95)90579-0
- DÖKE, Mehmet Ali, Maryann FRAZIER a Christina M GROZINGER, 2015. Overwintering honey bees: biology and management. *Current Opinion in Insect Science*. **10**, 185-193.
- DONZE', G. a P.M. GUERIN, 1994. Behavioral attributes and parental care of Varroa mites parasitizing honeybee brood. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. (34), 305-319.
- DONZÉ, G., M HERMANN, B. BACHOFEN a P.R.M GUERIN, 1996. Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*. *Ecological Entomology*. **21**(1), 17-26.
- DONZE', G. a P. GUERIN, 1997. Time-activity budgets and spacing structure by the different life stages of *Varroa jacobsoni* in capped brood of the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Behavior*. (10), 371-393.

- DUAY, P., D. DE JONG a W. ENGELS, 2002. Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development. *Genetics and Molecular Research*. **1**, 227-232.
- DUAY, P., D. DE JONG a W. ENGELS, 2003. Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites. *Apidologie*. **34**, 61-65.
- DUSHAY, Mitchell S., 2009. Insect hemolymph clotting. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **66**(16), 2643-2650.
- EKENGREN, S., Y. TRYSELIUS, M.S. DUSHAY, G. LIU, H. STEINER a D. HULTMARK, 2001. A humoral stress response in *Drosophila*. *Current Biology*. **11**, 714-718.
- ELBASHIR, S.M., W. LENDECKEL a T. TUSCHL, 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development*. **15**(2), 188-200.
- EVANS, J.D., K. ARONSTEIN, Y.P. CHEN, C. HETRU, J.L. IMLER a H. JIANG, 2006. Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*. **15**(5), 645-656.
- EVANS, J.D. a M. SPIVAK, 2010. Evans JD, Spivak M: Socialized medicine: individual and communal disease barriers in honey bees. *J Invertebr Pathol* 2010, 103(Suppl. 1):S62-S72. *Journal of Invertebrate Pathology*. **103**(1), 62-72.
- FLEIG, Richard, 1995. Role of the follicle cells for yolk uptake in ovarian follicles of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*. **24**(4), 427-433.
- FLENNIKEN, M.L., K.M. TASSETTO a M.R. ANDINO, 2010. *Insect Virology — The Antiviral Role of RNA Interference*. Caister Academic Press, 367-388.
- FLORES, José M., Victoria GÁMIZ, Ángeles JIMÉNEZ-MARÍN, Alicia FLORES-CORTÉS, Sergio GIL-LEBRERO, Juan J. GARRIDO a María Dolores HERNANDO, 2021. Impact of *Varroa destructor* and associated pathologies on the colony collapse disorder affecting honey bees. *Research in Veterinary Science*. **135**, 85-95.
- FLURI, P., M. LÜSCHER, H. WILLE a L. GERIG, 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.
- FONTANA, Renato, Maria Anita MENDES, Bibiana Monson de SOUZA, Katsuhiko KONNO, Lílian Mari Marcondes CÉSAR, Osmar MALASPINA a Mario Sergio PALMA, 2004. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*. **25**(6), 919-928.
- FRIEDECKÝ, D. a LEMR K., 2012. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. **20**(41), 152-157.
- FRIES, I., I HANSEN, A. IMDORF a P. ROSENKRANZ, 2003. Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden. *Apidologie*. **34**, 389-398.
- FUJIWARA, S., J. IMAI, M. FUJIWARA, T. YAESHIMA, T. KAWASHIMA a K. KOBAYASHI, 1990. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of Biological Chemistry*. **265**(19), 11333-11337.
- GAREDEW, A., E. SCHMOLZ a I. LAMPRECHT, 2004. The energy and nutritional demand of the parasitic life of the mite *Varroa destructor*. *Apidologie*. **35**, 419-430.
- GENG, T., D. LV, Y. HUANG, Ch. HOU, G. QIN a X. GUO, 2016. JAK/STAT signaling pathway-mediated immune response in silkworm (*Bombyx mori*) challenged by *Beauveria bassiana*. *Gene*. **595**, 69-76.

- GILLESPIE, Jeremy P., Michael R. KANOST a Tina TRENCZEK, 1997. BIOLOGICAL MEDIATORS OF INSECT IMMUNITY. *Annual Review of Entomology*. **42**(1), 611-643.
- GLIŃSKI, Z., 2001. Infection and immunity in the honey bee *Apis mellifera*. *Apiacta*. **36**(1), 12-24.
- GREGORC, Aleš, Jay D. EVANS, Mike SCHARF a James D. ELLIS, 2012. Gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) larvae exposed to pesticides and Varroa mites (*Varroa destructor*). *Journal of Insect Physiology*. **58**(8), 1042-1049.
- GREGORY, Pamela G., Jay D. EVANS, Thomas RINDERER a Lilia DE GUZMAN, 2005. Conditional immune-gene suppression of honeybees parasitized by Varroa mites. *Journal of Insect Science*. **5**(7), 1-5.
- GROZINGER, Christina M. a Michelle L. FLENNIKEN, 2019. Bee Viruses: Ecology, Pathogenicity, and Impacts. *Annual Review of Entomology*. **64**, 205-226.
- GUANÍ-GUERRA, E., T. SANTOS-MENDOZA, S.O. LUGO-REYES a L.M. TERAN, 2010. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology*. (135), 1-11.
- HOFFMANN, J.A., 2003. The immune response of *Drosophila*. *Nature*. **426**, 33-38.
- HONGYU, Wu, 2019. *LAMP2: An update to LAMP database linking antimicrobial peptide* [online]. [cit. 2021-2-23]. Dostupné z: <http://biotechlab.fudan.edu.cn/database/lamp>
- HORNITZKY, M., 1981. The examination of honey bee virus in New South Wale. *Australasian Beekeeper*. **82**, 261-262.
- HORNITZKY, M., 1982. Bee diseases research. *Australasian Beekeeper*. **84**, 7-10.
- HOŘEJŠÍ, Václav a Jiřina BARTUŇKOVÁ, 2009. *Základy imunologie*. 4. vyd. Praha: Triton. ISBN 978-80-7387-280-9.
- HULTMARK, Dan, 2003. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology*. **15**(1), 12-19.
- CHAN, Queenie W.T., Charles G. HOWES a Leonard J. FOSTER, 2006. *Quantitative Comparison of Caste Differences in Honeybee Hemolymph*. **5**(12), 2252-2262.
- CHARALAMBIDIS, N.D., C.G. ZERVAS, M. LAMBROPOULOU, P.G. KATSORIS a V.J. MARMARAS, 1995. Lipopolysaccharide-stimulated exocytosis of nonself recognition protein from insect hemocytes depend on protein tyrosine phosphorylation. *European Journal of Cell Biology*. **67**, 32-41.
- CHOMZYNSKI, P., 1987. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry*. **162**(1), 156-159.
- IFANTIDIS, M.D., 1983. Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honey bee brood cells. *Journal of Apicultural Research*. (22), 200-206.
- ILYASOV, R., L. GAIFULLINA, E. SALTYSKOVA, A. POSKRYAKOV a A. NIKOLENKO, 2012. Review of the Expression of Antimicrobial Peptide Defensin in Honey Bees *Apis Mellifera* L. *Journal of Apicultural Science*. **56**(1), 115-124.
- JANEWAY, C.A.Jr., 1989. Pillars article: approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.: Cold spring harb symp quant biol. *The Journal of Immunology*. **54**, 1-13.
- KALTENBOECK, Bernhard a Chengming WANG, 2005. *Advances in Real-Time PCR: Application to Clinical Laboratory Diagnostics*. Elsevier, 2005, 219-259. *Advances in Clinical Chemistry*. ISBN 9780120103409.
- KANBAR, G. a W. ENGELS, 2003. Ultrastructure and bacterial infection of wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae punctured by Varroa mites. *Parasitology Research*. **90**(5), 349-354.

- KANBAR, Ghazwan a Wolf ENGELS, 2004. Visualisation by vital staining with trypan blue of wounds punctured by *Varroa destructor* mites in pupae of the honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie*. **35**(1), 25-29.
- KANBAR, G. a W. ENGELS, 2005. Communal use of integumental wounds in honey bee (*Apis mellifera*) pupae multiply infested by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. *Genetics and Molecular Research*. **4**, 465–472.
- KANEKO, T., W.E. GOLDMAN, P. MELLROTH, et al., 2004. Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity*. **20**, 637-349.
- KANG, D., G. LIU, A. LUNDSTROM, E. GELIUS a H. STEINER, 1998. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **95**(17), 10078-10082.
- KANOST, M.R. a M.J. GORMAN, 1993. *Insect immunology*. In: *Phenoloxidases in insect immunity*,. San Diego: Academic Press, 69-96.
- KEELEY, L.L., 1985. Physiology and biochemistry of the fat body. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Oxford: Pergamon Press, (3), 211-248.
- KHONGPHINITBUNJONG, Kitiphong, Lilia I. DE GUZMAN, Matthew R. TARVER, Thomas E. RINDERER, Yanping CHEN a Panuwan CHANTAWANNAKUL, 2015. Differential viral levels and immune gene expression in three stocks of *Apis mellifera* induced by different numbers of *Varroa destructor*. *Journal of Insect Physiology*. **72**, 28-34.
- KIRCHNER, W.H., 1993. Lichtsinn und Vibrationssinn der *Varroa*-Milbe. *Apidologie*. (24), 490-491.
- KLAUDINY, J, S ALBERT, K BACHANOVA, J KOPERNICKY a J SIMUTH, 2005. Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **35**(1), 11-22.
- KOČÁREK, Eduard, 2007. *Molekulární biologie v medicíně*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně. ISBN 978-80-7013-450-4.
- KOVAC, H. a K. CRAILSHHEIM, 1988. Life span of *Apis mellifera* Carnica Pollm. Infested by *Varroa jacobsoni* in relation to season and extent of infestation. *Journal of Apicultural Research*. **27**, 230-238.
- KRAUS, B., 1994. Factors influencing host choice of the honey bee parasite *Varroa jacobsoni*. *Experimental and Applied Acarology*. **18**, 435-443.
- KUENEN, L.P.S. a N.W. CALDERONE, 1997. Transfers of *Varroa* mites from newly emerged bees: preferences for age- and function-specific adult bees. *Journal of Insect Behavior*. **10**, 213–228.
- KUCHARSKI, R. a R. MALESZKA, 2003. Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science*. **3**(27), 1-8.
- KURIEN, B.T. a R.H. SCOFIELD, 2006. Western blotting. *Methods*. **38**, 283–293.
- LAUGHTON, Alice M., Michael BOOTS a Michael T. SIVA-JOTHY, 2011. The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology*. **57**(7), 1023-1032.
- LAVINE, M.D. a M.R. STRAND, 2002. Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **32**, 1295-1309.
- LECLERC, V. a J. REICHHART, 2004. The immunune response of *Drosophila melanogaster*. *Immunological Reviews*. **198**, 59-71.

- LEHOTAY, Jozef, 2009. *Separáčné metódy v analytickej chémii*. Bratislava: Nakladateľstvo STU. Edícia vysokoškolských učebníc. ISBN 978-80-227-3036-5.
- LEMAITRE, B.E., L. KROMER-METZGER, E. MICHAUT, M. NICOLAS, M. MEISTER, P. GEORGEL, J.M. REICHHART a J.A. HOFFMANN, 1995. A recessive mutation, immune deficiency (imd), defines two distinct control pathways in the Drosophila host defense. *PNAS. USA*, **92**, 9465-9469.
- LEÓN-CALVIJO, María A., Aura L. LEAL-CASTRO, Giovanni A. ALMANZAR-REINA, Jaiver E. ROSAS-PÉREZ, Javier E. GARCÍA-CASTAÑEDA a Zuly J. RIVERA-MONROY, 2015. Antibacterial Activity of Synthetic Peptides Derived from Lactoferricin against Escherichia coli ATCC 25922 and Enterococcus faecalis ATCC 29212. *BioMed Research International*. **2015**, 1-8.
- LEULIER, F., C. PARQUET, S. PILI-FLOURY, J.H. RYU, M. CAROFF, W.J. LEE, D. MENGIN-LECREULX a B. LEMAITRE, 2003. The Drosophila immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nature Immunology*. **4**, 478-484.
- LI, Wei-Fen, Guo-Xia MA a Xu-Xia ZHOU, 2006. Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure–function relationships and mode of action. *Peptides*. **27**(9), 2350-2359.
- LI, Y., Q. XI ANG, Q. ZHANG, Y. HUANG a Z. SU, 2012. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. **37**(2), 207-215.
- LOCKE, M., 1980. The cell biology of fat body development. *Insect Biology in the Future*. New York: Academic, 227-252.
- MARMARAS, V.J. a M. LAMPROPOULOU, 2009. Regulators and signalling in insect haemocyte immunity. *Cell Signal*. **21**, 186-195.
- MARÓTI, G., A. KERESZT, E. KONDOROSI a P. MERGAERT, 2011. Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Microbiology*. (162), 363-374.
- MARQUES PEREIRA, Ana Flávia, Mariana ALBANO, Fernanda Cristina BÉRGAMO ALVES, et al., 2020. Influence of apitoxin and melittin from Apis mellifera bee on Staphylococcus aureus strains. *Microbial Pathogenesis*. **141**.
- MARTIN, S.J., 1994. Ontogenesis of the mite Varroa jacobsoni Oud. in worker brood of the honeybee Apis mellifera L. under natural conditions. *Experimental and Applied Acarology*. (18), 87-100.
- MAURIZIO, Anna a F. E. D. HODGES, 2015. The Influence of Pollen Feeding and Brood Rearing on the Length of Life and Physiological Condition of the Honeybee Preliminary Report. *Bee World*. **31**(2), 9-12.
- MCPHERSON, Michael J. a Simon Geir MOLLER, 2006. *PCR*. 2nd ed. New York. ISBN 04-153-5547-8.
- MEISTER, M. a M. LAGUEUX, 2003. Drosophila blood cells. *Cellular Microbiology*. **5**, 573-580.
- MIKEŠ, Otakar, 1980. *Laboratorní chromatografické metody*. Praha: SNTL. Technický průvodce (SNTL).
- MIKKELSEN, Susan R. a Eduardo CORTÓN, 2004. *Bioanalytical chemistry*. Hoboken: Wiley-Interscience. ISBN 04-715-4447-7.
- MÜLHARDT, Cornel, 2007. *Molecular biology and genomics*. Amsterdam: Elsevier. ISBN 9780120885466.
- MURRAY, Robert K., 2002. *Harperova Biochemie*. Jinočany. Lange medical book. ISBN 80-731-9013-3.

- MYLLYMÄKI, H. a M. RAMET, 2014. JAK/STAT pathway in *Drosophila* immunity. *Scandinavian Journal of Immunology*. **79**, 377-385.
- MYLLYMÄKI, H., S. VALANNE a M. RÄMET, 2014. The *Drosophila* Imd Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*. **192**, 3455-3462.
- NAVAJAS, M., D.L. ANDERSON, L.I. DE GUZMAN, Z.Y. HUANG, J. CLEMENT, T. ZHOU a Y. LE CONTE, 2010. *New Asian types of Varroa destructor: a potential new threat for world apiculture*. (41), 181-193. ISSN Apidologie.
- NAZZI, Francesco, Sam P. BROWN, Desiderato ANNOSCIA, et al., 2012. Synergistic Parasite-Pathogen Interactions Mediated by Host Immunity Can Drive the Collapse of Honeybee Colonies. *PLoS Pathogens*. **8**(6).
- NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA, 2013a. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková. ISBN 978-80-260-4243-3.
- NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA, 2013b. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková. ISBN 978-80-260-4244-0.
- OLDROYD, B.P., 1999. Coevolution while you wait: *Varroa jacobsoni*, a new parasite of western honeybees. *Trends Ecology Evolution*. (14), 312-315.
- O'SHEA, J. a R. PLENGE, 2012. JAK and STAT signaling molecules in immunoregulation and immunemediated disease. *Immunity*. **36**, 542-550.
- OTVOS, L.O.I., M.E. ROGERS, P.J. CONSOLVO, B.A. CONDIE, S. LOVAS a P. BULET, 2000. Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry*. **39**(46), 14150-14159.
- PANASIUK, B., W. SKOWRONEK, M. BIENKOWSKA a D. GERULA, 2010. Process of cleaning dead brood from cells in a honeybee colony. *Journal of Apicultural Science*. **54**(1), 5-11.
- PINGOUD, A., C. URBANKE, J. HOGGETT a A. JELTSCH, 2002. *Biochemical methods: a concise guide for students and researchers*. Weinheim: Wiley-VCH. ISBN 35-273-0299-9.
- POPEL, A.S., P.C. JOHNSON, M.V. KAMENEVA a M.A. WILD, 1994. Capacity for red blood cell aggregation is higher in athletic mammalian species than in sedentary species. *Journal of Applied Physiology*. **77**(1985), 1790-179.
- PROAÑO, Adrián, Dayana COELLO, Irina VILLACRÉS-GRANDA, Isabel BALLESTEROS, Alexis DEBUT, Karla VIZUETE, Andrea BRENCIANI a José M. ÁLVAREZ-SUAREZ, 2021. The osmotic action of sugar combined with hydrogen peroxide and bee-derived antibacterial peptide Defensin-1 is crucial for the antibiofilm activity of eucalyptus honey. *LWT*. **136**.
- PŘIDAL, A., 2014. Stanovení počtu samiček kleštíka včelího (*Varroa destructor*) v zimní měli nemůže být spolehlivým podkladem pro včasnou diagnostiku varroózy. *Veterinářství*. **64**, 373-375.
- RAMSEY, S.D., R. OCHOA, G. BAUCHAN, et al., 2019. *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **5**(116), 1792-1801.
- RAPP, J.L., 1947. Insect hemolymph: A review. *Journal of the New York Entomological Society*. **55**, 295-308.
- RATH, W a W DRESCHER, 1990. Response of *Apis cerana* Fabr. colonies toward brood infested with *Varroa jacobsoni* Oud. and infestation rate of colonies in Thailand. *Apidologie*. (21), 311-321.
- RATH, W, 1999. Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie*. **30**, 97-110.

- REYES-QUINTANA, Mariana, Daniel PRIETO-MERLOS, Gun KOLEOGLU, Tatiana PETUKHOVA, Adriana CORREA-BENÍTEZ a Ernesto GUZMAN-NOVOA, 2019. Impact of Varroa destructor and deformed wing virus on emergence, cellular immunity, wing integrity and survivorship of Africanized honey bees in Mexico. *Journal of Invertebrate Pathology*. **164**, 43-48.
- RICHARD, Freddie-Jeanne, Holly L HOLT a Christina M GROZINGER, 2012. Effects of immunostimulation on social behavior, chemical communication and genome-wide gene expression in honey bee workers (*Apis mellifera*). *BMC Genomics*. **13**(1).
- RICHARDS, E. H., BENJAMIN JONES a ALAN BOWMAN, 2011. Salivary secretions from the honeybee mite, Varroa destructor: effects on insect haemocytes and preliminary biochemical characterization. *Parasitology*. **138**(5), 602-608.
- RINKEVICH, Frank D. a John VONTAS, 2020. Detection of amitraz resistance and reduced treatment efficacy in the Varroa Mite, Varroa destructor, within commercial beekeeping operations. *PLOS ONE*. **15**(1), 1-12.
- ROSALES, C., 2017. Cellular and Molecular Mechanisms of Insect Immunity. *Insect Physiology and Ecology*. 179-209. Dostupné z: doi:10.5772/67107
- ROSENKRANZ, P. a M. STÜRMER, 1992. *Ernährungsabhängige Fertilität der Varroa-Weibchen in Arbeiterinnenbrut von Apis mellifera carnica und Apis mellifera capensis*. Vol. 47. Lublin-Poland: Univ. Mariae Curie, Skłodowska.
- ROSENKRANZ, P. a H. BARTALSZKY, 1996. Reproduction of Varroa females after long broodless periods of the honey bee colony during summer. *Apidologie*. **27**, 288-289.
- ROSENKRANZ, Peter, Pia AUMEIER a Bettina ZIEGELMANN, 2010. Biology and control of Varroa destructor. *Journal of Invertebrate Pathology*. **103**, S96-S119.
- RUTTNER, F. a W. RITTER, 1980. Das Eindringen von Varroa jacobsoni nach Europa im Rückblick. *Allg Deut Imkerz.* **14**, 130-134.
- SHIA, A.K., M. GLITTENBERG, G. THOMPSON, A.N. WEBER, J.M. REICHHART a P. LIGOXYGAKIS, 2009. Toll-dependent antimicrobial responses in Drosophila larval fat body require Spätzle secreted by haemocytes. *Journal of Cell Science*. **122**, 4505-4515.
- SCHATTON-GADELMAYER, K. a W. ENGELS, 1988. Blood proteins and body weight of newly-emerged worker honeybees with different levels of parasitization of brood mites. *Entomologia Generalis*. **14**, 93-101.
- SCHNEIDER, P. a W. DRESCHER, 1987. Einfluss der Parasitierung durch die Milbe Varroa jacobsoni auf das Schlupfgewicht, die Gewichtsentwicklung, die Entwicklung der Hypopharynxdrüsen und die Lebensdauer von Apis mellifera. *Apidologie*. **18**, 101-106.
- SILVERMANN, N., R. ZHOU, S. STÖVEN, N. PANDEY, D. HULTMARK a T. MANIATIS, 2000. A Drosophila I κ B kinase complex required for Relish cleavage and antibacterial immunity. *Genes and Development*. **14**, 2461-2471.
- SINGHANIA, R., N. KHAIRUDDIN, D. CLARKE a N.A.J. MCMILLAN, 2012. RNA Interference for the Treatment of Papillomavirus Disease. *The Open Virology Journal*. **6**, 204-215.
- SURLIS, Carla, James C. CAROLAN, Mary COFFEY a Kevin KAVANAGH, 2018. Quantitative proteomics reveals divergent responses in Apis mellifera worker and drone pupae to parasitization by Varroa destructor. *Journal of Insect Physiology*. **107**, 291-301.
- ŠMARDA, J., J. DOŠKAŘ, R. PANTŮČEK, V. RŮŽIČKOVÁ a J. KOPTÍKOVÁ, 2005. *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.
- TEWARSON, N.C. a W ENGELS, 1982. Undigested uptake of non-host proteins by Varroa jacobsoni. *Journal of Apicultural Research*. **21**, 222-225.

- TEWARSON, NC, A SINGH a W ENGELS, 1992. Reproduction of *Varroa jacobsoni* in colonies of *Apis cerana indica* under natural and experimental conditions. *Apidologie*. (23), 161-171.
- THEOPOLD, U., D. LI, M. FABBRI, C. SCHERFER a O. SCHMIDT, 2002. The coagulation of insect hemolymph. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*. **59**(2), 363-372.
- TRAYNOR, Kirsten S., Fanny MONDET, Joachim R. DE MIRANDA, Maeva TECHER, Vienna KOWALLIK, Melissa A.Y. ODDIE, Panuwan CHANTAWANNAKUL a Alison MCAFEE, 2020. *Varroa destructor*: A Complex Parasite, Crippling Honey Bees Worldwide. *Trends in Parasitology*. **36**(7), 592-606.
- TURNER, R.J., 1994. *Immunology - A comparative Approach*.
- VALANNE, S., J.H. WANG a M. RÄMET, 2011. The *Drosophila* Toll signaling pathway. *The Journal of Immunology*. **186**, 649-656.
- VALASEK, Mark A. a Joyce J. REPA, 2005. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*. **29**(3), 151-159.
- VAN DOOREMALEN, C., E. STAM, L. GERRITSEN, B. CORNELISSEN, J. VAN DER STEEN, F. VAN LANGEVELDE a T. BLACQUIÈRE, 2013. Interactive effect of reduced pollen availability and *Varroa destructor* infestation limits growth and protein content of young honey bees. *Journal of Insect Physiology*. **59**(4), 487-493.
- VESELÝ, Vladimír, 1985. *Včelařství*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství.
- VILLA, J.D., D.M. BUSTAMANTE, J.P. DUNKLEY a L.A. ESCOBAR, 2008. Changes in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony swarming and survival pre- and postarrival of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Louisiana. *Annals - Entomological Society of America*. **101**(5), 867-671.
- VILMOS, P. a E. KURUZC, 1998. Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters*. **62**(2), 59-66.
- VOET, Donald a Judith G. VOETOVÁ, 1995. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing. ISBN 80-856-0544-9.
- WAHL, Oscar a Kurt ULM, 1983. Influence of pollen feeding and physiological condition on pesticide sensitivity of the honey bee *Apis mellifera carnica*. *Oecologia*. **59**(1), 106-128. Dostupné z: doi:10.1007/BF00388082
- WANG, X.H., R. ALIYARI, W.X. LI, H.W. LI, K. KIM, R. CARTHEW, P. ATKINSON a S DING, 2006. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science*. **312**, 452-454.
- WANG, Ying, Hongxing HAO, Zong-wen QIU, Wen-yue XU, Jian ZHANG, Tao-li ZHOU, Xi-lin ZHANG a Fu-Sheng HUANG, 2009. Involvement of prophenoloxidas in the suppression of *Plasmodium yoelii* development by *Anopheles dirus*. *Experimental Parasitology*. **123**(1), 6-10.
- WANG, Leiyu, Kun DONG, Shaoyu HE, Jilian LI, Wu JIE a Jiaying HUANG, 2021. Cloning and characteristics of the antibacterial peptide gene abaecin in the bumblebee *Bombus lantschouensis* (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*. **24**(1), 369-375.
- WEINSTOCK, G., G. ROBINSON a R. GIBBS, 2006. Honeybee Genome Sequencing C: Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*. **443**, 931-949.
- WERNER, T., G. LIU, D. KANG, S. EKENGREN, H. STEINER a D. HULTMARK, 2000. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *PNAS USA*, **97**, 13772-13777.

- WERNER, T., K. BORGE-RENBORG, P. MELLROTH, H. STEINER a D. HULTMARK, 2003. Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *The Journal of Biological Chemistry*. **278**, 26319–26322.
- WILFRET, L., G. LONG, H.C. LEGGETT, P. SCHMID-HEMPEL, R. BUTLIN, S.J.M. MARTIN a M. BOOTS, 2016. Deformed wing virus is a recent global epidemic in honeybees driven by *Varroa* mites. *Science*. (351), 594-597.
- WILSON-RICH, N., M. SPIVAK, N.H. FEFFERMAN a P.T. STARKS, 2009. Genetic, individual, and group facilitation of disease resistance in insect societies. *Annual Review of Entomology*. **54**, 405-423.
- WIMLEY, W.C. a A. HRISTOVA, 2011. Antimicrobial peptides: Successes, challenges and unanswered questions. *The Journal of Membrane Biology*. **239**(1-2), 27-34.
- XU, Peng, Min SHI a Xue-xin CHEN, 2009. Antimicrobial Peptide Evolution in the Asiatic Honey Bee *Apis cerana*. *PLoS ONE*. **4**(1), e4239.
- YANG, P., A. RAMAMOORTHY a Z. CHEN, 2011. Membrane orientation of MSI-78 measured by sum frequency generation vibrational spectroscopy. *Langmuir*. (27), 7760-7767.
- YANG, X. a D. L. COX-FOSTER, 2005. Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **102**(21), 7470-7475. ISSN 0027-8424.
- YANG, X. a D. COX-FOSTER, 2007. Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge. *Parasitology*. **134**, 405-412.
- YUE, C. a E. GENERSCH, 2005. RT-PCR analysis of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology*. **86**, 3419-3424.
- ZAMBON, R.A., V.N. VAKHARIA a L.P. WU, 2006. RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*. *Cellular Microbiology*. **8**, 880-889.
- ZOU, Z., S. W. SHIN, K. S. ALVAREZ, G. BIAN, V. KOKOZA a A. S. RAIKHEL, 2008. Mosquito RUNX4 in the immune regulation of PPO gene expression and its effect on avian malaria parasite infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **105**(47), 18454-18459.
- ŻWIR-FERENC, A. a M. BIZIUK, 2006. Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*. **15**(5), 677-690.
- Guide to Solid Phase Extraction* [online], 1998. [cit. 2020-1-18]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABPV	virus akutní paralýzy včel
AMK	aminokyselina
AmP	antimikrobiální peptidy
Da	jednotka Dalton
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DWV	virus deformovaných křídel
EDTA	kyselina etylendiaminotetraoctová
GITC	guanidium isothiokyanát
IAPV	virus izraelské akutní paralýzy
KBV	kašmírský virus
LC-MS	kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
PAMP	struktury charakteristické pro patogenní mikroorganismy
PCR	polymerásová řetězová reakce
PGRP	peptidoglykan rozpoznávající proteiny
PGRP-LC	transmembránový receptor, který váže peptidoglykan
PGRP-SC	peptidoglykan rozpoznávající proteiny S1
PVDF	polyvinylidendifluorid
qPCR	kvantitativní PCR
RNA	ribonukleová kyselina
RNAi	RNA interference
RP-HPLC	vysokoúčinná chromatografie na reverzní fázi
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová elektroforéza s použitím SDS
SPE	extrakce na pevné fázi
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan