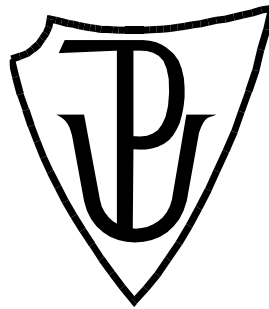


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Reakce včelího imunitního systému na patogenní  
stimul**

## **DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Markéta Krhutová</b>
Studijní program:	N0512A130009 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Jiří Danihlák, PhD.</b>
Rok:	2024

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

V Olomouci dne .....

.....

Podpis studenta

Ráda bych poděkovala vedoucímu své práce, panu doktoru Jiřímu Danihlíkovi, za poskytnutí cenných rad nejen co se vypracování diplomové práce týče, za vstřícnost, trpělivost, odborné vedení a možnost přispět ke studiu imunity včel. Dále bych ráda poděkovala paní doktorce Janě Jemelkové a paní magistře Zuzaně Žvátorové za nápomoc při vypracování experimentální části práce.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Markéta Krhutová
Název práce	Reakce včelího imunitního systému na patogenní stimul
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlík, PhD.
Rok obhajoby práce	2024

### Abstrakt

Imunitu hmyzu tvoří vrozený imunitní systém, který se skládá z fyzikálních bariér, buněčné imunity a imunity humorální. Buněčná imunita je zprostředkována buňkami cirkulujícími v hemolymfě, hemocyty, se schopností fagocytózy, nodulace či enkapsulace. Humorální imunita spočívá v produkci rozmanitých antimikrobiálních peptidů, ke které dochází díky signálním drahám, které jsou spuštěny po rozpoznání patogenních struktur příslušnými receptory. Do této úrovně imunity řadíme také fenoloxidasovou kaskádu včetně jejího klíčového enzymu, fenoloxidasu.

Po ověření specifity protilátek metodou Western blot byla optimalizována metoda ELISA a s využitím této metody bylo stanoveno relativní zastoupení tří antimikrobiálních peptidů. Apidaecin byl kvantifikován s využitím vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi spojené s hmotností spektrometrií, při které byla použita ionizace elektrosprejem a analýza kvadrupólem s analyzátozem doby letu (UHPLC-ESI-Q-TOF). Byla také optimalizována metoda spektrofotometrického měření aktivity enzymu fenoloxidasu. Veškeré parametry imunitního systému byly stanovovány ve vzorcích včelí hemolymfy tří experimentálních skupin, kontroly, dále včel, které byly krmeny směsí inaktivovaných bakterií a včel krmených lipopolysacharidem (LPS).

Byla ověřena specifita protilátek proti defensinu a abaecinu s následnou imunochemickou detekcí defensinu-1, abaecinu a hymenoptaecinu ve vzorcích. Byla prokázána indukce produkce defensinu-1 LPS a stejně tak rozdílnost v aktivaci imunitního systému včel při imunizaci krmením či injekcí. Koncentrace apidaecinu nevykazovala mezi experimentálními skupinami statisticky významné rozdíly. Byla optimalizována metoda stanovení enzymu fenoloxidasu. Měřením byla prokázána možnost měřit enzymovou aktivitu i ze zamražených vzorků.

Klíčová slova	Včela medonosná, antimikrobiální peptidy, humorální imunita, apidaecin
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Markéta Krhutová
Title	Response of the bee immune system to a pathogenic stimulus
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlák, PhD.
The year of presentation	2024

### Abstract

Insect immunity consists of the innate immune system, which is composed of physical barriers, cellular immunity and humoral immunity. Cellular immunity is mediated by cells circulating in the haemolymph, haemocytes, with the ability to phagocytose, nodulate or encapsulate. Humoral immunity consists of the production of diverse antimicrobial peptides, which occurs through signaling pathways that are triggered upon recognition of pathogenic structures by corresponding receptors. This level of immunity also includes the phenoloxidase cascade with its key enzyme, phenoloxidase.

After verifying the specificity of the antibodies by Western blotting, the ELISA method was optimized and the relative abundance of the three antimicrobial peptides was determined using this method. Apidaecin was quantified using reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry using electrospray ionization and quadrupole analysis with a time-of-flight analyzer (UHPLC-ESI-Q-TOF). A method for spectrophotometric measurement of phenoloxidase enzyme activity was also optimized. All parameters of the immune system were determined in the hemolymph samples from bees of the three experimental groups, controls, bees fed a mixture of inactivated bacteria and bees fed lipopolysaccharide (LPS).

The specificity of antibodies against defensin and abaecin was verified, followed by immunochemical detection of defensin-1, abaecin and hymenoptaecin in the samples. Induction of defensin-1 production by LPS was demonstrated, as well as differences in the activation of the immune system of bees when immunized by feeding or injection. The concentration of apidaecin did not show statistically significant differences between the experimental groups. The method for the determination of the enzyme phenoloxidase was optimized. Measurements demonstrated the possibility to measure the enzyme activity also from frozen samples.

Keywords	Honeybee, antimicrobial peptides, humoral immunity, apidaecin
Number of pages	59

Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1 ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>2</b>
2.1 Imunitní systém hmyzu .....	2
2.1.1 Fyzikální bariéry.....	2
2.1.2 Buněčná imunita.....	2
2.1.3 Humorální imunita.....	3
2.1.3.1 Antimikrobiální peptidy <i>A. mellifera</i> .....	3
2.1.3.2 Fenoloxidasová kaskáda .....	4
2.1.4 Signální dráhy zapojené do imunitní odpovědi.....	6
2.1.5 Obranné reakce hmyzu proti virovým patogenům .....	7
2.1.5.1 Dráha RNA interference (RNAi).....	7
2.1.5.2 JAK-STAT signální dráha .....	8
2.1.5.3 Autofágie .....	10
2.1.6 Významné tkáně hmyzu zapojené do imunitní odpovědi.....	10
2.1.6.1 Tukové tělísko .....	10
2.1.6.2 Střevní tkáň .....	11
2.1.6.3 Hltanové žlázy .....	12
2.1.7 Stimulace imunitního systému hmyzu patogeny.....	12
2.1.8 Immune priming .....	14
2.1.8.1 Transgenerační immune priming .....	15
2.2 Významné mikrobiální nákazy včely medonosné.....	15
2.2.1 Přehled včelích virových a bakteriálních patogenů.....	16
2.2.1.1 Reprodukční cyklus virů .....	16
2.2.1.2 Virus černání matečnicků.....	17
2.2.1.3 Virus deformovaných křídel.....	18
2.2.1.4 Virus pytlíčkovitého plodu .....	18
2.2.1.5 Viry akutní a chronické paralýzy včel .....	18
2.2.1.6 Mor včelího plodu.....	19
2.2.1.7 Hniloba včelího plodu.....	20
2.2.1.8 Kleštík včelí.....	20
2.2.1.9 Hmyzomorka včelí.....	22
2.2.2 Šíření patogenů ve včelstvu .....	22
2.2.2.1 Horizontální přenos patogenů .....	22
2.2.2.2 Vertikální přenos patogenů.....	23
2.3 Generace včel a jejich imunitní systém .....	24
2.3.1 Letní generace včel.....	24

2.3.2 Zimní generace včel .....	25
2.3.3 Imunitní systém včelích generací .....	25
<b>3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>27</b>
3.1 Materiál.....	27
3.1.1 Chemikálie .....	27
3.1.2 Roztoky.....	28
3.1.3 Biologický materiál .....	30
3.1.4 Protilátky.....	31
3.1.5 Synteticky připravené peptidy.....	31
3.1.6 Přístroje a vybavení .....	31
3.2 Metody.....	32
3.2.1 Ověření účinnosti protilátek proti antimikrobiálním peptidům metodou Western blot .....	32
3.2.1.1 Příprava optimalizačních vzorků .....	32
3.2.1.2 SDS-PAGE .....	33
3.2.1.3 Tank blot.....	34
3.2.1.4 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů .....	34
3.2.2 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů metodou ELISA .....	34
3.2.2.1 Příprava optimalizačních vzorků .....	34
3.2.2.2 Příprava experimentálních vzorků .....	35
3.2.2.3 Provedení metody ELISA .....	35
3.2.3 Kvantifikace apidaecinu v hemolymfě úlových včel pomocí LC/MS .....	36
3.2.4 Optimalizace stanovení aktivity fenoloxidasy .....	36
3.2.4.1 Příprava vzorků .....	36
3.2.4.2 Měření enzymové aktivity.....	37
3.2.4.3 Aktivace profenoloxidasy $\alpha$ -chymotrypsinem .....	37
3.2.5 Zpracování a statistické vyhodnocení dat .....	37
<b>4 VÝSLEDKY .....</b>	<b>38</b>
4.1 Ověření účinnosti protilátek proti antimikrobiálním peptidům metodou Western blot .....	38
4.2 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů metodou ELISA .....	40
4.2.1 Ověření účinnosti a správnosti metody proměřením optimalizačních vzorků .....	40
4.2.2 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů v experimentálních vzorcích .....	41
4.3 Kvantifikace apidaecinu v hemolymfě úlových včel pomocí LC/MS .....	42
4.4 Optimalizace stanovení aktivity fenoloxidasy .....	43
4.4.1 Optimalizace metody.....	43



4.4.2 Stanovení aktivity fenoloxidasy v experimentálních vzorcích .....	46
<b>5 DISKUZE .....</b>	<b>47</b>
5.1 Ověření účinnosti protilátek proti antimikrobiálním peptidům metodou Western blot .....	47
5.2 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů metodou ELISA .....	47
5.2.1 Ověření účinnosti a správnosti metody proměřením optimalizačních vzorků .....	47
5.2.2 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů v experimentálních vzorcích .....	48
5.3 Kvantifikace apidaecinu v hemolymfě úlových včel pomocí LC/MS .....	48
5.4 Optimalizace stanovení aktivity fenoloxidasy .....	49
5.4.1 Optimalizace metody .....	49
5.4.2 Stanovení aktivity fenoloxidasy v experimentálních vzorcích .....	49
<b>6 ZÁVĚR .....</b>	<b>51</b>
<b>7 LITERATURA .....</b>	<b>52</b>
<b>8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>57</b>

## **Cíle práce**

- Příprava literární rešerše o obranných reakcích hmyzu proti mikrobiálním patogenům
- Příprava literární rešerše o obranných reakcích hmyzu proti virovým nákazám
- Optimalizace a aplikace metody imunochemické detekce antimikrobiálních peptidů v hemolymfě včel
- Optimalizace metody měření aktivity enzymu fenoloxidasy v hemolymfě včel

## 1 ÚVOD

Pro mnohobuněčné organismy je důležitá imunita, tedy buněčné a molekulární obranné mechanismy v boji s patogeny. Hmyz, včetně včel, oplývá pouze imunitou vrozenou, kam řadíme fyzikální bariéry, humorální imunitu a imunitu buněčnou. Není tak schopen produkce protilátek, která je typická pro adaptivní imunitní systém (Rosales, 2017).

Buněčná imunita je charakterizována hemocyty cirkulujícími v hemolymfě. Ty jsou zodpovědné za mechanismy buněčné imunity, kam řadíme fagocytózu, nodulaci, enkapsulaci či melanizaci. Humorální imunita stojí na produkci antimikrobiálních peptidů, k čemuž dochází díky signálním drahám po rozpoznání konzervovaných patogenních motivů (Rosales, 2017). Pro humorální imunitu je důležitá také fenoloxidasová kaskáda, v čele s enzymem fenoloxidasou (Cerenius & Soderhall, 2004).

Imunitní reakce však neprobíhají pouze v hemolymfě, důležité jsou také určité tkáně. V tukovém tělísku, homologu savčích jater, probíhá mj. syntéza antimikrobiálních peptidů (Tsakas & Marmara, 2010). Významná je také střevní tkáň či hltanové žlázy (Alaux et al., 2010; Zeng et al., 2022). Zajímavým je immune priming, tedy zvýšená rezistence vůči patogenům, kterým byl jedinec již předtím vystaven v subletální dávce (Sheehan et al., 2020). Imunitní rezistence může být přenášena i mezi generacemi, tento jev byl nazván jako transgenerační immune priming (Hernández López et al., 2014).

Včely jsou kvůli svému sociálnímu způsobu života citlivé k mnoha rozmanitým patogenům (Antúnez et al., 2015). Jsou napadány bakteriálními, virovými i houbovými patogeny (Fünfhaus et al., 2018). Z hlediska šíření patogenů je významný roztoč, kleštík včelí, který šíření bakterií i virů značně napomáhá (de Miranda & Genersch, 2010).

Ve včelstvu se během roku vyskytují dvě generace včel, letní a zimní (Steinmann et al., 2015). Mimo rozdílné délky života se liší také imunitním systémem. Zimní generace včel využívá primárně humorální imunitu, oproti tomu včely letní generace kombinují mechanismy humorální i buněčné imunity (Kunc et al., 2019).

## **2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY**

### **2.1 Imunitní systém hmyzu**

Mnohobuněčné organismy si vytvořily buněčné a molekulární obranné mechanismy v boji proti infekcím. Tyto mechanismy označujeme jako imunitu. V případě obratlovců se imunita skládá z okamžité vrozené imunitní odpovědi a adaptivního imunitního systému. Adaptivní imunitu hmyz postrádá, přesto však oplývá řadou vrozených imunitních mechanismů, mezi které řadíme fyzikální bariéry, buněčnou imunitu a imunitu humorální (Rosales, 2017). Cílem je odolání infekci, eliminace infekce, či tolerance patogenů (Evans & Spivak, 2010). V následujících podkapitolách budou popsány jednotlivé úrovně imunitního systému hmyzu se zaměřením na včelu medonosnou (*Apis mellifera*), její humorální imunitu a imunitní reakce vůči virovým patogenům.

#### **2.1.1 Fyzikální bariéry**

Mezi fyzikální bariéry patří integument a peritrofická membrána. Integument tvoří vnější povrch těla hmyzu a je tvořen jednou vrstvou buněk pokrytou vícevrstvou kutikulou. Peritrofická membrána vystýlá střední část zažívacího traktu, skládá se z chitinu a glykoproteinu (Rosales, 2017). Hlavním cílem bariér je zabránit adhezi mikrobů na tělo hmyzu a vstupu do něj, jedná se o první linii obrany (Evans & Spivak, 2010; DeGrandi-Hoffman & Chen, 2015).

#### **2.1.2 Buněčná imunita**

Pokud patogen pronikne fyzikálními bariérami, dochází k aktivaci druhé linie obrany, tedy buněčné a humorální imunity. V obou případech stojí na počátku rozpoznání vysoce konzervovaných strukturních motivů na povrchu patogenů, označovaných jako molekulární struktury typické pro patogeny (PAMPs), a to pomocí motiv rozpoznávajících receptorů (PRR). Rozpoznání vede ke spuštění signálních drah, které ústí v aktivaci výše zmíněných imunitních odpovědí (DeGrandi-Hoffman & Chen, 2015).

Buněčná imunita je zprostředkována hemocyty, buňkami, které cirkulují v hemolymfě. Hemocytů existuje mnoho druhů s rozličnými funkcemi. Některé jsou schopny adheze a fagocytózy, jiné produkují profenoloxidasu (proPO), důležitý zymogen fenoloxidasové kaskády, popsané v kapitole 2.1.3.2 (Rosales, 2017).

V hmyzí říši existuje vzhledem k obrovskému množství hmyzích druhů mnoho variant buněčné imunitní odpovědi. Mezi nejčastější však patří fagocytóza, nodulace, enkapsulace a melanizace. Během fagocytózy dochází k rozpoznání, navázání a pohlcení relativně velké částice. Nodulace značí tvorbu mnohobuněčných agregátů z hemocytů,

díky kterým dojde k polapení většího množství bakterie. Oproti tomu enkapsulaci organismus využije v boji s větším patogenem (Rosales, 2017).

Melanizace zahrnuje enzymatické i neenzymatické reakce, jejíž výsledkem je tvorba melaninu, jehož prekurzorem je aminokyselina tyrosin. Proces je zodpovědný za enkapsulaci mnohobuněčných patogenů, obnovu tkání i obranu vůči dalším bakteriálním, houbovým i virovým patogenům. V případě mechanického poškození či přítomnosti parazitů dochází k ukládání melaninu kolem postižených tkání či cizích objektů. Klíčovým enzymem melanizace je L-tyrosin-L-dopa:O<sub>2</sub> oxidoreduktasa (fenoloxidasa, PO, EC 1.14.18.1), aktivovaná v rámci fenoloxidasové kaskády (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012).

### **2.1.3 Humorální imunita**

Humorální imunitní odpověď je založena na produktech imunitních genů, jejichž exprese je indukovaná po rozpoznání patogenů. Tyto geny kódují antimikrobiální peptidy (AmP), které jsou syntetizovány převážně v tukovém tělisku a následně uvolňovány do hemolymfy. Před infekcí exprese zmíněných genů buď neprobíhá, nebo je konstitutivně nízká. Humorální imunita zahrnuje také aktivaci enzymových kaskád regulujících koagulaci hemolymfy a melanizaci, stejně jako produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) (Tsakas & Marmara, 2010). Z enzymového hlediska je tedy důležitá aktivace proPO (Rosales, 2017).

Z časového hlediska je jako první aktivována buněčná imunita, humorální je zpožděna o několik hodin. Imunitní mechanismy buněčné a humorální imunity nepracují odděleně a hranice mezi nimi není ostrá. Například hemocyty mohou stimulovat tukové tělisko k produkci AmP (Rosales, 2017).

#### **2.1.3.1 Antimikrobiální peptidy *A. mellifera***

V hmyzí říši bylo izolováno a charakterizováno přes 150 AmP. Jedná se o malé molekuly obsahující 12-50 aminokyselin, které se díky své kationické povaze mohou vázat na membrány patogenů, čímž zapříčiní smrt jejich buňky. Působí jak na bakteriální, tak i houbové patogeny (Tsakas & Marmara, 2010). Cílí však pouze na buňky prokaryotní. V genomu *A. mellifera* bylo detekováno omezené množství AmP. V hemolymfě bylo detekováno 7 AmP kódovaných 19 komplementárními DNA (cDNA). AmP byly identifikovány i v mateří kašičce a včelím jedu (Daníhlík et al., 2016).

Některé AmP cílí na pouze jeden typ mikrobů, např. apidaeciny a hymenoptaecin vykazují vyšší aktivitu vůči gramnegativním (G<sup>-</sup>) bakteriím. Oproti tomu abaeciny cílí

na bakterie grampozitivní (G+) (Daníhlík et al., 2016). Jak uvádí např. studie Evanse (2004), exprese abaecinu je významně up-regulována po inokulaci včelích larev G+ bakterií *Paenibacillus larvae*. Jak uvádí studie Klaudivyho et al. (2005), defensin-I působí jak na G+ a G- bakterie, tak i na houby. Jeho isoforma, royalisin, objevena v mateří kašičce, působí efektivněji na G+ bakterie. Další AmP mateří kašičky, jelleiny, vykazují aktivitu nejen vůči G+ a G- bakteriím, ale i kvasinkám (Daníhlík et al., 2016).

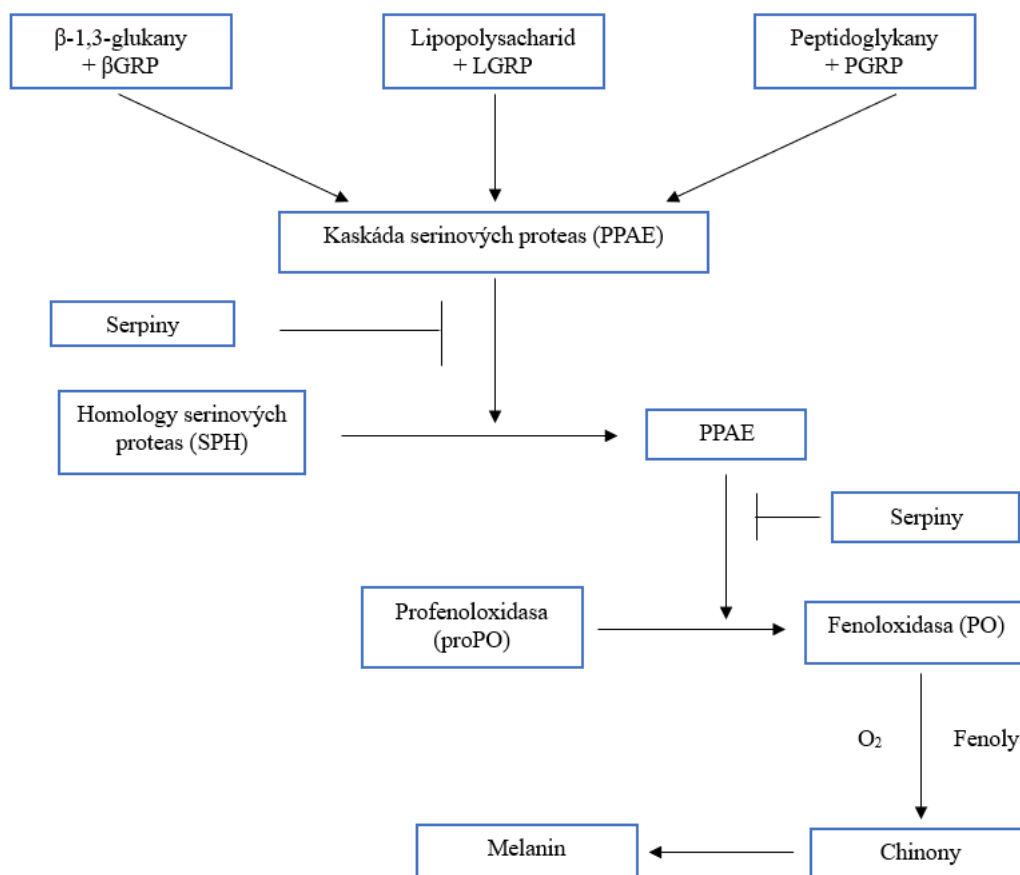
Antimikrobiální aktivita AmP je různá. Po navázání na membránu patogenní buňky dochází obvykle k vytvoření kanálu v membráně, kterým z buňky unikají ionty a esenciální metabolity, či dokonce peptidy a proteiny. Jiné AmP mohou pronikat do buňky, kde interagují s proteiny, DNA, RNA či komponenty buněčné stěny. Kupříkladu apidaeciny, AmP bohaté na prolin, pronikají do bakteriální buňky bez lytického efektu a váží se na GroEL-GroES komplex, komplex zodpovědný za správné složení prokaryotních proteinů, což vede k inhibici syntézy proteinů (Daníhlík et al., 2016).

### **2.1.3.2 Fenoloxidasová kaskáda**

PO je enzym zodpovědný za aktivaci melanizace u bezobratlých, je však také důležitým nástrojem obrany proti různým patogenům. Patří mezi tyrosinasy, jejíž hlavním úkolem je oxidace fenolů. Jedná se o metaloenzym, v aktivním místě enzymu se nachází binukleární centrum tvořené dvěma atomy mědi, z nichž každý je obklopen třemi histidinovými zbytky. V genomu *A. mellifera* byl nalezen jediný proPO gen (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012). Zajímavé je, že teplotní optimum PO je 20 °C, přestože teplota v úlu je přibližně 34,5 °C (Daníhlík et al., 2016).

PO je exprimovaná jako inaktivní zymogen proPO, jehož syntéza probíhá převážně v hemocytech. Oproti tomu v tukovém tělísku se nevytváří. Do své aktivní formy je v případě potřeby PO konvertovaná systémem zvaným fenoloxidasová kaskáda (Obr. 1). Jedná se o komplex aktivačních a inhibičních reakcí zahrnující různé typy buněk, zymogenů, proPO inhibitorů a signálních molekul. Na počátku kaskády je stejně jako v případě jiných imunitních drah rozpoznání patogenních motivů příslušnými PRR. Lipopolysacharid (LPS) je rozpoznáván LPS-rozpoznávajícím proteinem (LGRP), peptidoglykany (PGs) PGs rozpoznávajícími proteiny (PGRPs) a  $\beta$ -1,3-glukan  $\beta$ -glukan rozpoznávajícím receptorem ( $\beta$ GRP). Signál je přenášen díky kaskádě serinových proteas, z nichž poslední je proPO aktivující serinová proteasa neboli profenoloxidasu aktivující enzym (PPAE). U některých hmyzích druhů, např. u *A. mellifera* je pro aktivaci

proPO pomocí PPAE potřeba kofaktorů, tzv. homologů serinových proteas (SPH), které PPAE aktivují (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012). Aktivovaná PO katalyzuje oxygenaci monofenolů na *o*-difenoly a jejich následnou oxidaci na *o*-chinony, ty poté polymerizují za vzniku melaninu. Pro imunitu jsou však důležité i meziproducty, které celý proces doprovázejí. Jedná se o chinony, difenoly, superoxid, peroxid vodíku či reaktivní dusíkaté radikály (Cerenius & Soderhall, 2004).



Obr. 1: Schéma fenoloxidasové kaskády. Celý proces spouští rozpoznání patogenních motivů příslušnými receptory (βGRP, LGRP, PGRP). Následuje kaskáda serinových proteas ústící v aktivaci profenoloxidasu (proPO) na aktivní fenoloxidasu (PO) pomocí profenoloxidasu aktivujícího enzymu (PPAE). V případě *A. mellifera* je nutná aktivace PPAE pomocí homologů serinových proteas (SPH). Aktivní PO katalyzuje oxidaci fenolů na chinony, které polymerizují za vzniku melaninu. Kaskádu inhibují serpiny (upraveno dle González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012).

Vzhledem k faktu, že během fenoloxidásové kaskády vznikají reaktivní molekuly, které by v případě nadbytku mohly poškodit buňky vlastního organismu, musí být kaskáda regulována. V hmyzí hemolymfě bylo nalezeno několik inhibitorů serinových proteas, které tak inhibují aktivaci PO. Patří mezi ně např. serpiny (González-Santoyo & Córdoba-Aguilar, 2012). Superrodina serpinů obsahuje značné množství proteinů, z nichž většina funguje jako inhibitor serinových proteas. Identifikovány byly v rostlinách, zvířatech i virech. Běžně obsahují okolo 370-390 aminokyselin, blízko C-konce se nachází reaktivní místo tvořící smyčku. Právě tato smyčka na povrchu molekuly interaguje s cílovou proteasou, konkrétně dochází k vytvoření vazby s aktivním místem proteasy, čímž dojde k inhibici enzymové aktivity (Jiang & Kanost, 1997). Inhibitory mohou využívat i parazité. Serpiny byly identifikovány například v jedu vosičky *Leptopilina bouvardi*. Parazit tak serpiny využívá k potlačení imunitní odezvy hostitele (Colinet et al., 2009).

#### **2.1.4 Signální dráhy zapojené do imunitní odpovědi**

Hmyz, včetně včel, oplývá třemi hlavními, vzájemně propojenými dráhami odpovědi na expozici patogenům. Jedná se o signální dráhy Toll, dráhu imunitní nedostatečnosti (Imd) a ATP:[protein]-L-tyrosin *O*-fosfotransferasa (nespecifická) (Janus kinasa, JAK, EC 2.7.10.2)-převodník signálu a aktivátor transkripce (JAK-STAT) dráhu. Dráhy se skládají z proteinů, které rozpoznávají signály z invazivních parazitů, proteinů upravujících a zesilujících signál a efektorových proteinů či metabolitů, které jsou přímo zapojené v inhibici patogenů (Evans et al., 2006).

Toll je signál transdukující transmembránový receptor hrající důležitou roli v imunitě i vývoji (Evans et al., 2006). Dráha Toll je aktivována v momentě, kdy se po rozpoznání bakteriálního či houbového patogenu proteolyticky aktivovaný Spätzle, cytokinu podobná molekula, naváže na extracelulární doménu receptoru Toll (Rosales, 2017). Navázání zapříčiní konformační změnu receptoru, tvorbu a aktivaci receptorového komplexu a ústí v degradaci Cactusu, inhibitoru transkripčního faktoru kappa B (NF-κB) Dorsal. Transkripční faktory jsou následně translokovány do jádra (Evans et al., 2006). Výsledkem je produkce AmP, například defensinu-I, peptidoglykan *N*-acetylmuramoylhydrolasy (lysozym, EC 3.2.1.17) či PO pro následnou melanizaci (Evans et al., 2006; Danihlík et al., 2016).

Stejně tak Imd aktivují bakteriální a houbové patogeny. Přenášený signál aktivuje NF-κB Relish, který tak indukuje transkripci genů AmP, např. hymenoptaecinu či



abaecinu (Evans et al., 2006; Danihlík et al., 2016). Aktivace dráhy vede také k melanizaci (Evans et al., 2006). Signální dráha JAK-STAT je zapojena do imunitní odpovědi na virové patogeny, je proto probrána v kapitole 2.1.5.2.

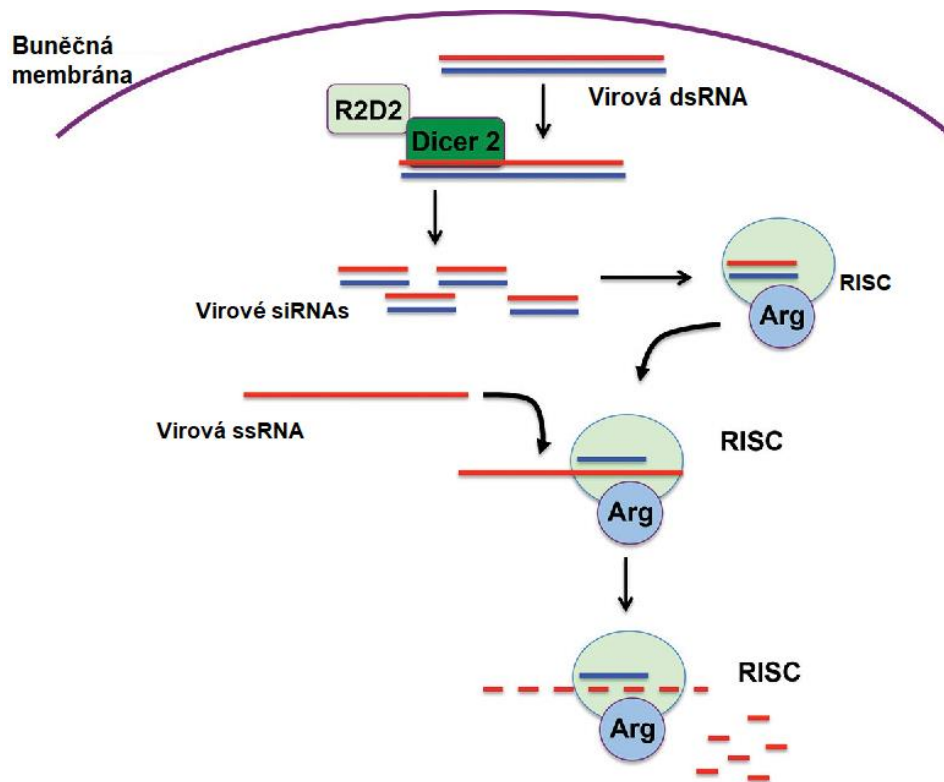
### **2.1.5 Obranné reakce hmyzu proti virovým patogenům**

Virová onemocnění patří mezi faktory, které ovlivňují zdraví a dlouhověkost včel. Proti infekci vystupují imunitní reakce hostitele (McMenamin et al., 2018). V případě *A. mellifera* se jedná primárně o dráhu RNA interference (RNAi), signální dráhu JAK-STAT a autofágii (Rosales, 2017).

#### **2.1.5.1 Dráha RNA interference (RNAi)**

RNAi je hlavní drahou, která se vypořádává s infekcí virovými patogeny. Jejím základem je rozpoznání virem produkované dvouvláknové RNA (dsRNA) s následnou produkcí malých interferujících RNA (siRNAs). Dále siRNAs zacílí virovou RNA k degradaci a tím suprimují virovou replikaci (Rosales, 2017). Jedná se o posttranskripční sekvenčně specifický mechanismus umlčení genu (McMenamin et al., 2018).

Virovou replikací produkovaná dsRNA je rozpoznána endonukleasou Dicer-2 (EC 3.1.26.3) společně s proteinem R2D2 (Obr. 2). Dicer-2 katalyzuje naštěpení dsRNA na malé, 21-nukleotidové RNA fragmenty, siRNAs (Rosales, 2017). Poté jsou siRNAs navedeny do „RNA-induced silencing complex“ (RISC), jehož součástí je i RNasa Argonaut (Arg). V RISC zůstane jedno RNA vlákno asociováno s Arg, jedná se o tzv. vedoucí řetězec, zatímco doprovodný řetězec je degradován. Vedoucí vlákno se v cytoplasmě spolu s RICS dle komplementarity bází váže na cílovou virovou jednovláknovou RNA (ssRNA), čímž zprostředkuje degradaci ssRNA katalyzovanou Arg (McMenamin et al., 2018).



Obr. 2: Schéma RNAi. Virová dsRNA je rozpoznána proteinem Dicer-2 spolu s proteinem R2D2. Dicer-2 katalyzuje naštěpení dsRNA na siRNAs, které jsou naváděny do RISC. Vedoucí vlákno (modré) se spolu s RISC dle komplementarity bází váže na virovou ssRNA, doprovodné (oranžové) je degradováno. Po navázání na cílovou ssRNA katalyzuje protein Arg degradaci virové RNA (upraveno dle Rosales, 2017).

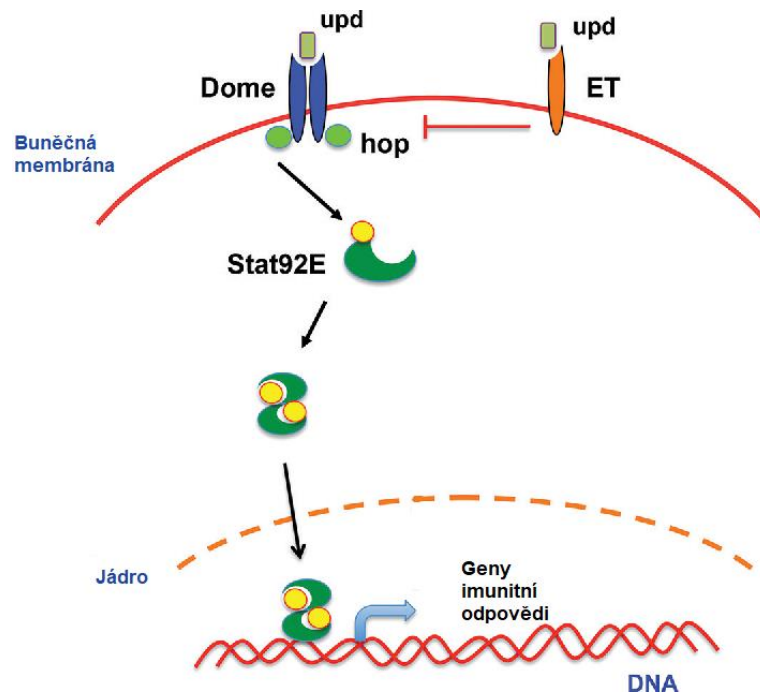
Mnoho virových patogenů kóduje supresory RNAi. Může docházet např. k blokaci RISC, případně k vazbě na virovou dsRNA, což brání navázání enzymu Dicer-2. Existují také inhibitory aktivity Arg (Rosales, 2017).

### 2.1.5.2 JAK-STAT signální dráha

Do imunitní odezvy jsou zapojeny také signální dráhy, nejlépe prostudovanou je v tomto směru dráha JAK-STAT. V antivirové imunitě je důležitá pro předcházení rozšíření infekce (Rosales, 2017). Jak ukázala např. studie Paradkara et al. (2012), JAK-STAT dráha vykazuje podobnosti se savčím systémem interferonů. Napadená buňka produkuje faktory, které aktivují dráhu ve vedlejších zdravých buňkách, čímž roste jejich rezistence k infekci.

Na počátku JAK-STAT dráhy je navázání cytokinu na receptor, který dimerizuje, čímž dojde k aktivaci Janus kinas (JAKs), které jsou nepřetržitě navázány na cytoplasmatický konec receptoru (Obr. 3). Aktivované JAKs fosforylují sebe navzájem, stejně jako specifické tyrosinové zbytky v cytoplasmatické části receptoru. Právě na tyto tyrosiny se

váží „Src-homology 2“ (SH2) domény molekul transkripčních faktorů převodníků signálu a aktivátorů transkripce (STATs). Po navázání jsou STATs pomocí JAKs fosforylovány na tyrosinech, což jim umožňuje dimerizovat a translokovat se do jádra, kde se vážou na promotory cílových genů. U octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) jsou známy 3 cytokinům podobné molekuly vážící se na receptor, pojmenovány „unpaired 1-3“ (upd). Všechny 3 molekuly signalizují přes jediný receptor, pojmenován „Domeless“ (Dome), na který je navázána jediná JAK, „hopscotch“ (hop). Byl nalezen také jediný STAT, STAT92E. Signalizace je regulována, např. na receptorové úrovni. V membránách buněk *D. melanogaster* se nachází nesignalizační „eye transformer“ (ET) protein, který váže upd, čímž inhibuje intracelulární signalizaci (Rosales, 2017).



Obr. 3: JAK-STAT signální dráha. Na počátku je navázání cytokinu-podobné molekuly (upd) na transmembránový receptor (Dome), který je asociován s JAK (hop). Výsledkem je autofosforylace JAK, stejně jako specifických tyrosinových zbytků na Dome, kam se naváže transkripční faktor (Stat92E). Výsledkem je fosforylace Stat92E pomocí hop, jeho dimerizace a translokace do jádra, kde se váže na promotor genu imunitní odpovědi. Signalizace je regulována nesignálním proteinem (ET), který vazbou s upd inhibuje intracelulární signalizaci (upraveno dle Rosales, 2017).

Signální dráha JAK-STAT je aktivovaná i v různých stresových podmínkách, ať už v případě mechanického poranění, dehydratace či tepelného šoku. Hemocyty v takovém případě produkují molekulu upd3, která interaguje s Dome receptorem buněk tukového tělíska, ve kterých tak dochází k indukci genů imunitní odpovědi (Rosales, 2017).

### **2.1.5.3 Autofágie**

Autofágie je mechanismem antivirové imunity nezávislým na signálních drahách Toll, Imd či JAK-STAT. Jedná se o proces, během kterého jsou v buňkách vytvořeny dvoumembránové vesikuly, autofagosomy. Vesikuly jsou tvořeny z nově nasyntetizovaných membrán, které inkorporují velké cytoplazmatické komponenty jako jsou poškozené organely či proteinové agregáty. Autofagosom následně fúzuje s lysozomem, kde dojde k degradaci jeho obsahu (Rosales, 2017).

Autofágie je indukovaná různými stresovými signály, jako je hladovění, infekce či buněčné opravné mechanismy. Celý degradativní proces pomáhá recyklaci živin a slouží k udržování buněčné homeostázy (Rosales, 2017).

### **2.1.6 Významné tkáně hmyzu zapojené do imunitní odpovědi**

Mimo hemolymfu, ve které probíhá řada výše zmíněných imunitních reakcí a ve které cirkulují hemocyty, jsou pro imunitní systém hmyzu důležité i určité specifické tkáně. Jedná se hlavně o tukové tělísko, střevní tkáň a v případě *A. mellifera* také o hltanové žlázy (Alaux et al., 2010; Tsakas & Marmara, 2010; Zeng et al., 2022).

#### **2.1.6.1 Tukové tělísko**

Tukové tělísko je orgán specifický pro hmyz obklopující střevo a reprodukční orgán. Jedná se o homolog savčích jater, oproti nim jde ale o volnou tkáň uspořádanou do tenkých laloků, které jsou omývány hemolymfou (Arrese & Soulages, 2010; Tsakas & Marmara, 2010). Toto uspořádání zajišťuje maximální expozici hemolymfě. Základní buňkou tělíska je adipocyt, který je typický přítomností mnoha tukových kapének. Tukové tělísko představuje hlavní zásobu živin a energie. Stejně tak v něm dochází ke mnoha biosyntetickým a metabolickým pochodům. Syntetizuje se v něm většina proteinů i metabolitů hemolymfy, do které jsou nasyntetizované látky secernovány. Jedná se například o proteiny sloužící jako rezervoár aminokyselin při morfogenezi či vitellogenin (Vg) při zrání vajíček. Procesy v tukovém tělísku jsou regulovány hormonálně (Arrese & Soulages, 2010).

Tukové tělísko je důležitým místem imunitní odpovědi. Mikrobiální infekce indukuje geny tělíska zodpovědné za produkci AmP. Ty jsou následně uvolněny do hemolymfy.

Tukové tělísko stojí za syntézou i jiných důležitých molekul, například určitých PRR, serpinů či PPAE (Tsakas & Marmara, 2010).

### 2.1.6.2 Střevní tkáň

Hmyzí střevo je tubulární struktura, která prochází skrz celou tělní dutinu a propojuje ústa s řitním otvorem. U většiny dospělých hmyzích druhů lze rozdělit na přední, střední a zadní střevo. Přední střevo slouží k polykání, žvýkání a dočasnému uskladnění potravy. Stejně tak se v něm nachází struktury, které brání průchodu bakterií a jiných částic do další části střeva. Ve středním střevě dochází k hlavnímu trávení a absorpci živin. Právě střední střevo je centrem imunitní odpovědi v hmyzí střevní tkáni. Zadní střevo je napojeno na malpighické trubice, jeho hlavní funkcí je eliminace nestrávených zbytků a recyklace vody (Zeng et al., 2022).

Přijímání potravy hmyzem představuje důležitý zdroj střevních mikroorganismů. Vzhledem k dlouhodobým interakcím mezi mikroorganismy a střevem hostitele tak došlo k vytvoření řady obranných systémů, které jsou klíčové pro udržení stability střevního mikrobiomu. Jedná se o fyzikální bariéry a samotnou imunitní odpověď. Fyzikální bariéry zde představuje semipermeabilní peritrofická membrána tvořená chitinem a proteiny a mukus, jehož důležitou součástí jsou glykosylované proteiny. Bariéry ochraňují epiteliální buňky před infekcí, dehydratací či fyzikálním i chemickým poškozením (Zeng et al., 2022).

V případě průniku patogenů první linií obrany dochází k aktivaci imunitní odpovědi. Její důležitou součástí je produkce AmP, ke které ve střevě dochází primárně Imd signální drahou. Dochází však také k produkci ROS, a to pomocí aktivace střevního enzymu NAD(P)H:O<sub>2</sub> oxidoreduktasa (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tvořící) (dvojitá oxidasa, Duox, EC 1.6.3.1). ROS mohou přímo ničit patogenní bakterie, houby i plasmodia. V rámci střevní imunitní odezvy dochází také k melanizaci. Jejím hlavním centrem, a tedy i místem výskytu PPO je zadní střevo, jedná se tak o poslední linii obrany celé střevní tkáně (Zeng et al., 2022).

Pro imunitu je důležitý také střevní mikrobiom. V případě dělnic *A. mellifera* se jedná o 9 bakteriálních druhů vyskytujících se převážně v zadním střevě. K přenosu mikroorganismů dochází fekální cestou a je podpořen sociálními interakcemi a kontaktem v rámci včelstva. Mikrobiom představuje důležitou roli v metabolismu, boji s patogeny, růstu i vývoji včely (Raymann & Moran, 2018). Jak napovídá výzkum Kwonga et al. (2017), včely inokulované běžnými střevními bakteriemi vykazují vyšší koncentrace AmP ve střevě, ale také v hemolymfě, což značí efekt mikrobiomu na systémové úrovni.

Tyto včely také vykazují větší schopnost vypořádat se s bakteriální nákazou, což napovídá, že nepatogenní mikroorganismy indukují ve svém hostiteli imunitní odpověď. Tyto organismy jsou pak vůči AmP méně citlivé. Narušení homeostázy střevního mikrobiomu vede ke zvýšené citlivosti vůči patogenům. Například působení antibiotika tetracyklinu vede ke změně množství bakterií i složení mikrobiomu, což má za následek vyšší mortalitu včel při vystavení patogenům, např. bakterii *Serratia marcescens* (Raymann et al., 2017).

### **2.1.6.3 Hltanové žlázy**

Hltanové žlázy včel jsou párový orgán umístěný frontálně v hlavě, před mozkem a mezi složenými očima. Každá žláza se skládá z tisíců sekrečních jednotek napojených na sekreční kanál. Z hlediska kast jsou nejvyvinutější u dělnic. Při přeměně úlové včely na létavku zakrňují. Jsou důležité pro sekreci proteinů mateří kašičky, což hraje podstatnou roli při výživě a diferenciaci včelích kast (Ahmad et al., 2021).

V hltanových žlázách je exprimován enzym  $\beta$ -D-glukosa:O<sub>2</sub> 1-oxidoreduktasa (glukosaoxidasa, GOX, EC 1.1.3.4). GOX je zodpovědná za oxidaci  $\beta$ -D-glukosy na glukonovou kyselinu a peroxid vodíku, který má antiseptické vlastnosti. Následně dochází k sekreci produktů do larvální potravy a medu, což vede k podpoře sterilizace potravy včelstva, a tedy přecházení kontaminace. GOX tedy umožňuje předcházet chorobám v rámci celého společenstva (Alaux et al., 2010). Vzhledem k faktu, že včely oplývají jen třetinou genů imunitní odezvy ve srovnání se solitárně žijícím hmyzem, představují jiné typy obrany na úrovni společenstva, včetně GOX, důležitou součást imunity (Evans et al., 2006; Alaux et al., 2010).

### **2.1.7 Stimulace imunitního systému hmyzu patogeny**

Na povrchu mnohých mikroorganismů jsou specifické molekuly, které při interakci s receptory hostitele spouští imunitní odpověď. Může se jednat o sacharidy či lipidy. Rozpoznávána je také cizorodá nukleová kyselina (Buchon et al., 2014).

Aktivace imunitního systému hmyzu bakteriemi souvisí s interakcí mezi PAMPs a PRR. Hlavní PAMPs představují PGs a LPS. PGs jsou důležité součásti buněčné stěny bakterií, dle struktury rozlišujeme dva typy. U G<sup>+</sup> bakterií jsou rozpoznávány PGs s lysinem, u G<sup>-</sup> bakterií diaminopimelové PGs. PGs aktivují imunitní systém silněji než LPS, který je součástí buněčné stěny G<sup>-</sup> bakterií. Do zapojených PRR patří PGRPs a LGRP (Chen & Lu, 2018). Tyto interakce stojí na počátku signálních drah. G<sup>+</sup> bakterie spouštějí primárně Toll signální dráhu, zatímco G<sup>-</sup> Imd (Evans et al., 2006).

V případě houbových infekcí dochází k rozpoznávání  $\beta$ -1,3-glukanu, komponentu buněčné stěny (Stączek et al., 2020). Po rozpoznání příslušnými PRR,  $\beta$ GRP, dochází ke spuštění převážně Toll signální dráhy a odpovědi imunitního systému (Evans et al., 2006; Stączek et al., 2020). Jak uvádí studie Stączka et al. (2020), další komponent buněčné stěny hub,  $\alpha$ -1,3-glukan, má naopak imunoinhibiční efekty, kdy dochází k inhibici fenoloxidasové kaskády.

Hmyz však není ohrožen pouze buněčnými patogeny, ale také virovými. Pro možnost viru proniknout do buňky, ale i pro imunitní systém hostitele jsou důležité proteinové struktury na povrchu částice umožňující přichycení se na receptor buňky. Například v případě viru černání matečnicků (BQCV) se jedná o homologní prstovité výběžky. Poté, co virus pronikne do hostitelské buňky, dochází k uvolnění virové genetické informace, její replikaci a translaci (Procházková et al., 2020). Právě virová dsRNA je rozpoznávána hostitelskou buňkou a stojí tak na počátku antivirové odpovědi. dsRNA je rozpoznávána enzymem Dicer-2, který patří mezi endoribonukleasy. Na tento krok navazuje RNAi (Rosales, 2017). Virová infekce však může také způsobit vyšší expresi mRNA proteinu Vago ve virem infikované buňce, který po navázání na receptor zdravé buňky spouští JAK-STAT signální dráhu. Tento receptor však nebyl ještě přesně popsán (Kingsolver et al., 2013). Imunitní systém může být také aktivován strukturami na povrchu virové částice. V případě infekce *D. melanogaster* virem vezikulární stomatidy (VSV) je rozpoznáván povrchový glykoprotein VSV-G, který funguje jako PAMPs. Rozpoznání struktur pak vede např. k autofágii (Rosales, 2017).

Obecně existují dvě cesty, kterými patogeny napadají hmyz. Můžou se nacházet v potravě a tím vstoupit do střeva. Další vstup je možný hemolymfou, a to v případě poranění povrchu těla či penetrací integumentem nebo střevní tkáně (Chen & Lu, 2018). Na výskyt patogenů ve střevě reaguje hmyz produkcí AmP a ROS (Zeng et al., 2022). Za eliminací patogenů z hemolymfy stojí buněčná i humorální složka imunity, tedy např. fagocytóza, ale i produkce AmP (Chen & Lu, 2018). Dle studie Barribeau et al. (2016), dochází při injektování bakterie *Arthobacter globiformis* čmeláku zemního (*Bombus terrestris*) ke zvýšené genové expresi AmP kódujících genů, genů zapojených do procesu melanizace či  $\beta$ GRP. Narušení celistvosti povrchu těla injekcí může však samo o sobě vést k aktivaci imunitního systému (Erler et al., 2011).

Jak uvádí studie Cornmana et al. (2013), 12 hodin staré larvy včely medonosné krmené sporami *P. larvae* vykazují po 72 hodinách od infekce zvýšenou genovou expresi genů kódujících AmP, např. apidaecinu či hymenoptaecinu. Zvýšená byla také exprese dvou

genů, které kódují proteiny peritrofické matrix. Autoři však nezaznamenali zvýšení exprese lysozymu či proPO. Hladiny lysozymu a proPO už však byly zvýšené v 5 dní starých larvách, 4 dny po infekci. Rychle rostoucí aktivita PO tak podporuje s věkem se zvyšující odolnost larev vůči nákaze (Chan et al., 2009). Jak popisuje studie Tehel et al. (2020), při infekci hemolymfou má patogen přístup k veškerým tkáním těla, zatímco orální infekce poskytuje přístup pouze ke střevu. Při inokulaci čmeláka zemního virem deformovaných křídel (fb) injekcí byly proto zjištěny vyšší titry viru než při inokulaci orální.

Experimentální nákaza nemusí být prováděna inokulací celého patogenu, může být použita jeho imunogenní struktura, např. LPS. Při injektáži LPS z *Escherichia coli* včelím dělnicím bylo zjištěno, že v mladých infikovaných včelách dochází k silnější produkci AmP, aktivita PO však byla nižší než u včel kontrolních. S rostoucím věkem se situace mění, aktivita PO roste a množství AmP klesá (Laughton et al., 2011a). Infekce LPS vede také ke zvýšení počtu cirkulujících hemocytů (Charles & Killian, 2015).

### 2.1.8 Immune priming

Imunitní systém bezobratlých je v mnohém podobný imunitě obratlovců, postrádá však systém na úrovni tvorby protilátek adaptivního imunitního systému. Pokud jsou však určité hmyzí druhy vystaveny subletální dávkou patogenu či částici z patogenu, dochází ke zvýšení imunitní odpovědi, což zapříčiní rezistenci při následné, jindy letální expozici danému patogenu. Tento jev byl nazván jako immune priming (Sheehan et al., 2020).

Zvýšením imunitní odpovědi rozumíme nárůst množství cirkulujících hemocytů v hemolymfě, stejně jako produkci AmP. Spíše, než k tvorbě nových hemocytů dochází k aktivaci buněk, které jsou normálně přichyceny na vnitřní straně kutikuly (Sheehan et al., 2020).

Jak ukázala studie Bergina et al. (2006), pokud jsou larvy zavíječe voskového (*Galleria mellonella*) inokulovány kvasinkou *Candida albicans* v subletální koncentraci, roste v larvách produkce AmP a dochází tak k ochraně larev při následné letální infekci. Zajímavé je, že k ochraně při následné infekci vedla i předchozí inokulace kvasinkou *Saccharomyces cerevisiae* či glukánem anebo laminarinem.

Priming může vykazovat určitou druhovou specifitu, a to v případě kdy existuje konkrétní patogen, který pro hmyz představuje opakované a vysoké riziko. Specifita je možná, pokud systém hostitele umožňuje rychlou identifikaci patogenu, v takovém případě můžeme i u hmyzu mluvit o určité paměti. Určitou specifitu vykazují např.



čmelák zemní. Míra přežití čmeláků byla významně vyšší v případě, že byli vystaveny infekci bakterií homologní k té, kterou byli primováni (Sadd & Schmid-Hempel, 2006).

### **2.1.8.1 Transgenerační immune priming**

Efekt primingu může být rozšířen i do další generace. Imunologická informace matky získaná během expozice patogenu a předaná potomkům, se nazývá transgenerační immune priming (TGIP). TGIP je významný u eusociálně žijícího hmyzu, jakým je např. *A. mellifera*. Potomci čelí stejným patogenům jako matka, a proto mohou benefitovat z efektu primingu. Právě u *A. mellifera* byla popsána zvýšená rezistence primovaných larev vůči *P. larvae*. Potomci matek, které byly vystaveny sporám *P. larvae* vykazovali o 26 % vyšší míru přežití při infekci danou bakterií. Jak ukázal výzkum, priming u larev podporuje diferenciaci prohemocytů na hemocyty (Hernández López et al., 2014).

TGIP spočívá v přenosu mikrobiálních fragmentů nesoucích elicitory imunity z matky na potomky. Zůstávalo záhadou, jakým způsobem mohou elicitory proniknout do vajíčka. Jak však ukázal výzkum Salmela et al. (2015), nositelem informace u *A. mellifera* je Vg, prekursor žlutkového proteinu, více popsán v kapitole 2.3.1. Vg váže G<sup>+</sup> i G<sup>-</sup> bakterie, stejně jako PAMPs, např. LPS. Vg je následně potřeba k transportu bakteriálních molekul do vajíček, čímž se stává přenašečem imunitního signálu. K expozici královny patogenům může dojít při pozření kontaminované potravy, mateří kašičky. Tato cesta by znamenala nutnost transportu fragmentů patogenů z trávicího traktu dělnic do hltanových žláz. Jak ukázala studie Harwooda et al. (2019), i zde hraje klíčovou roli Vg. Hltanové žlázy exprimují receptory pro Vg, ve žlázách pak dochází k jeho metabolizaci a produkci mateří kašičky. Pokud Vg váže imunitní elicitory, dostávají se tak do potravy, kterou pozře matka a mohou přejít až do vajíčka. Fragmenty patogenů mohou také zůstat v rámci hltanových žláz a zahájit imunitní odezvu vedoucí k produkci AmP do mateří kašičky.

## **2.2 Významné mikrobiální nákazy včely medonosné**

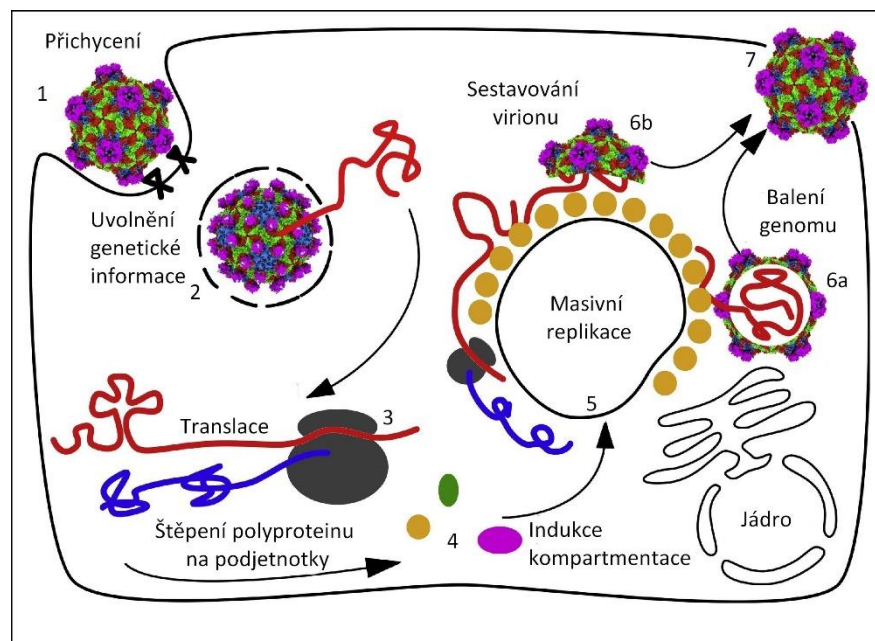
Včely jsou kvůli svému sociálnímu způsobu života citlivé k mnoha rozmanitým patogenům (Antúnez et al., 2015). Právě výskyt těchto patogenů ve včelstvu je jedním z faktorů úhynu jedinců a ztrát včelstev (Genersch, 2010). Patogeny navíc často působí v synergii. Schopnost včel odolat nálezům je omezena, pokud jsou vystaveny pesticidům nebo mají nedostatek potravy (Antúnez et al., 2015). Včely jsou napadány bakteriálními, virovými i houbovými patogeny. Mezi nejznámější bakteriální patogeny včel patří mor včelího plodu (AFB) a hniloba včelího plodu (EFB) (Fünfhaus et al., 2018).

Také viry představují jednu z hrozeb pro zdraví a kondici včel (Tantillo et al., 2015). Do dnešního dne bylo popsáno více než 20 virů, které napadají včely (Ullah et al., 2021). Většinou se jedná o ssRNA viry s pozitivní polaritou z rodin *Dicistroviridae* a *Iflaviridae*, řád *Picornavirales*. Jsou schopny napadat různá vývojová stádia včel, stejně jako dospělce. Přestože se většinou příznaky infekce klinicky neprojevují, může nákaza významně ovlivnit zdraví a délku života infikovaných včel (Tantillo et al., 2015). Zároveň mohou v některých případech způsobit závažná, až smrtelná onemocnění jednotlivých včel, nebo dokonce kolaps celého včelstva (Berényi et al., 2006).

## **2.2.1 Přehled včelích virových a bakteriálních patogenů**

### **2.2.1.1 Reprodukční cyklus virů**

Pro studium hmyzích virů se využívají např. buněčné linie bource morušového (*Bombyx mori*) či komára tropického (*Aedes aegypti*) (Grace, 1969). Poznatky o reprodukčním cyklu včel napadajících virů jsou však omezené, jelikož neexistuje buněčná linie včelí tkáně, která by podporovala jejich replikaci. Předpokládá se, že reprodukční cyklus odpovídá cyklu příbuzných virů z rodiny *Picornaviridae*. Viry se pravděpodobně dostávají do buněk cestou receptorem zprostředkované endocytosy (Obr. 4). Kyselé pH endosomu spustí uvolnění genetické informace a dochází k translaci virové RNA. Po translaci jsou výsledné polyproteiny za účasti virem kódovaných proteas naštěpeny na funkční podjednotky. Nestrukturální proteiny indukují reorganizaci intracelulárních membrán hostitele do kompartmentů, které slouží k efektivní syntéze virové RNA a sestavení virionů. Genetická informace je replikována za katalýzy virem kódované nukleosid-trifosfát:RNA nukleotidyltransferasy (RNA-dependentní-RNA polymerasa, RdRP, EC 2.7.7.28). Protomery kapsidových proteinů se seskupují do pentamerů a prázdných částic. Zatím není známo, zda jsou tyto prázdné částice prekurzorem virionů, odpadním produktem nebo zásobou kapsidových proteinů. Dochází k lýze buňky a vypuštění virionů do extracelulárního prostoru (Procházková et al., 2020).



Obr. 4: Reprodukční cyklus virů. Na buňku přichycená virová částice se dostane endocytosou do buňky (1). Dojde k uvolnění genetické informace do buňky (2) a následně k translaci RNA na polyprotein (3), který je štěpen na jednotlivé podjednotky (4). Virové proteiny indukují vytvoření centra replikace z intracelulárních membrán (5), kde je genetická informace replikována za katalýzy RdRP (žlutá kolečka). Viriony se vytvoří sbalením genomu do vytvořené kapsidy (6a) nebo seskupením kapsidy kolem genomu (6b). Nové viriony jsou lýzou uvolněny z buňky (7) (upraveno dle Procházková et al., 2020).

### 2.2.1.2 Virus černání matečnicků

BQCV je ve včelstvech jedním z nejběžnějších. Poprvé byl izolován z mrtvých larev a předkukel královny v zavíčkovaných matečnicích se zčernalými stěnami. Setrvává ve včelstvu chronicky díky přenosu mezi dospělými jedinci, přenosu z královny na potomky a z dospělců na larvy skrz výměšky žláz např. mateří kašičku (Spurny et al., 2017). Přenáší se mezi trubci i dělnicemi, klinicky ale ovlivňuje hlavně vyvíjející se larvy a kukly královen, to jsou jeho primární hostitelé (Tantillo et al., 2015). Většinou se ve včelstvu nachází v asymptomatické koncentraci, ale při zvýšení titru zabíjí vyvíjející se mateří plod. Právě uhynulé kukly, které zůstávají v matečnicích, způsobí jejich zčernání (Spurny et al., 2017).

Nejčastěji se ve včelstvech klinicky vyskytuje během období množení včelstev pomocí rojů. Titry BQCV, a tedy i mortalitu včel, zvyšují např. subletální dávky pesticidů. Virus patří mezi *Dicistroviridae* a napadá nejen různé druhy včel, ale i čmeláky (Spurny et al., 2017).

### **2.2.1.3 Virus deformovaných křídel**

DWV byl poprvé nalezen v japonských včelnicích, ve kterých se vyskytovaly včely s deformitou křídel. S výjimkou Oceánie byl již detekován po celém světě a studie uvádějí, že infekce tímto virem není geograficky limitovaná (Tantillo et al., 2015).

Frekvence nákazy vzrůstá od jara do podzimu, vyšší prevalence je u kulek než u dospělých jedinců. To je pravděpodobně způsobeno nižší účinností imunitního systému kulek oproti imunitnímu systému dospělců. Virus však napadá všechna vývojová stádia. Infikované kukly hynou, nebo mohou dokončit svůj vývoj a vylíhnout se v asymptomatické nebo symptomatické dospěléce, dle toho, zda jsou vystaveny dalším stresujícím faktorům. V obou případech mají však tyto jedinci značně zkrácenou délku života. DWV je jedním z mála včelích virů, který zapříčiňuje definované symptomy onemocnění. Mezi příznaky patří scvrklá křídla, neschopnost letu, zmenšená velikost těla a ztráta barvy dospělých včel (Tantillo et al., 2015).

V roce 2004 byl z mozku agresivních dělnic izolován do té doby neznámý virus, pojmenován jako Kakugo virus. Tento virus vykazuje vysokou homologii s DWV, v rámci sekvence nukleotidů z 98 %. Malé rozdíly zapříčiňují, že primárním cílem tohoto viru je mozek. Napadá regiony zodpovídající za sensorické funkce a koordinující včelí chování. Nezpůsobuje však deformity křídel (Tantillo et al., 2015).

### **2.2.1.4 Virus pytlíčkovitého plodu**

Virus pytlíčkovitého plodu (SBV) napadá stádia plodu i dospěléce, nejcitlivější k nákaze jsou dvoudenní larvy. S postupem onemocnění dochází k replikaci virových částic v těle larvy a k jejich akumulaci v ekdyšní tekutině mezi tělem a kůží, což zapříčiňuje charakteristický tekutinou naplněný váček (Wei et al., 2022). Larva nepřechází do stádia kukly, protože není schopna převléct starou kutikulu (Chen & Siede, 2007). Infikovaná larva mění barvu z perleťově bílé na světle žlutou a po zavíčkování uhynie, mrtvé tělo je tmavé ve tvaru gondoly a může být snadno odstraněno z buňky. Jedním ze symptomů choroby je nález mrtvých larev mimo včelstvo, tyto larvy byly vyhozeny ze včelstva dělnicemi (Wei et al., 2022). U dospělých včel je infekce latentní, projevuje se pouze zkrácenou délkou života (Tantillo et al., 2015).

### **2.2.1.5 Viry akutní a chronické paralýzy včel**

Virus chronické paralýzy včel (CBPV) je široce rozšířený virus, který způsobuje masivní úhyn jedinců převážně silných včelstev (Dittes et al., 2020). Vir se může ve včelstvu roky vyskytovat pouze jako skrytá infekce, ale při namnožení dojde k propuknutí onemocnění

(Tantillo et al., 2015). Projevuje se dvěma odlišnými skupinami symptomů. Na jedné straně se jedná o paralýzu, ataxii, chvění a neschopnost letu. Na straně druhé se onemocnění projevuje výskytem černých jedinců bez ochlupení a se zkráceným zadečkem. Ve včelstvu se mohou vyskytovat obě skupiny příznaků najednou. Virus napadá dospělce všech kast a koncentruje se hlavně v mozku (Dittes et al., 2020).

Virus akutní paralýzy včel (ABPV) byl objeven během provádění laboratorních testů s CBPV. Zatímco většina včel, kterým byly inokulovány CBPV částice, zemřela za 5-7 dní, včely, kterým byl injektován extrakt ze včel, které nevykazovaly příznaky napadení patogenem, ztratily schopnost létat a rychle zemřely. Z použitých extraktů byly následně vyizolovány částice viru, který byl pojmenován jako ABPV (Chen & Siede, 2007).

ABPV je běžný infekční agens včel, často detekován ve vizuálně zdravých koloniích. Infekce ale mohou být nastartovány zhoršenými enviromentálními podmínkami, např. infestací roztoči nebo používáním insekticidů. V takovém případě dochází k rychlému úhynu jedinců (Tantillo et al., 2015). Jak ukazuje studie Baileyho (1965), včely postižené ABPV vykazují stejné příznaky jako při nákaze CBPV, umírají ale během dvou dní. Oproti tomu u CBPV mohou včely žít až několik dní. Virus napadá všechna vývojová stádia včely, nejcitlivější jsou však kukly (Tantillo et al., 2015).

Geneticky i sérologicky podobný ABPV je Kašmírský včelí virus (KBV), stejně jako virus izraelské paralýzy včel, který byl poprvé izolován v roce 2004. Oba viry mohou zapříčinit masivní úhyn včel (Tantillo et al., 2015).

### **2.2.1.6 Mor včelího plodu**

AFB způsobuje G<sup>+</sup> sporulující bakterie *Paenibacillus larvae*. Spory bakterie odolávají vysokým teplotám, stejně jako dalším fyzikálně chemickým faktorům. Ve vysušených larvách či včelích plástvích mohou zůstat spory infekční až 30 let. Spory získané z vosku, propolisu či medu dokonce let 70 (Matović et al., 2023). Právě spory jsou jedinou infekční formou *P. larvae* (Fünfhaus et al., 2018).

Jedná se o vysoce nakažlivou chorobu, k níž jsou nejnáchylnější larvy mladší 36 hodin. Infekce jedné larvy může vést k infekci a úhynu celého včelstva. Po pozření spor dochází k jejich klíčení ve střevě larvy a rapidnímu množení bakterie. Bakterie poté enzymově rozruší peritrofickou membránu a epitel a postupuje do hemocoelu, což končí smrtí larvy (Al-Ghamdi et al., 2021). Dělnice, které buňku vyklízí, pak rozšiřují spory dál do oběhu (Matović et al., 2023).

Klinické příznaky většinou nejsou pozorovatelné v nezavíčkované buňce, jelikož jsou infikované larvy detekovány úlovými včelami a z úlu odstraněny. Pokud dojde k úhynu až v pozdějším stádiu po zavíčkování, dochází ke změně barvy, struktury a konzistence larvy. Z larvy se nakonec stává tmavá mazlavá hmota. Změny jsou pozorovatelné i na víčku buňky (Matović et al., 2023).

### **2.2.1.7 Hniloba včelího plodu**

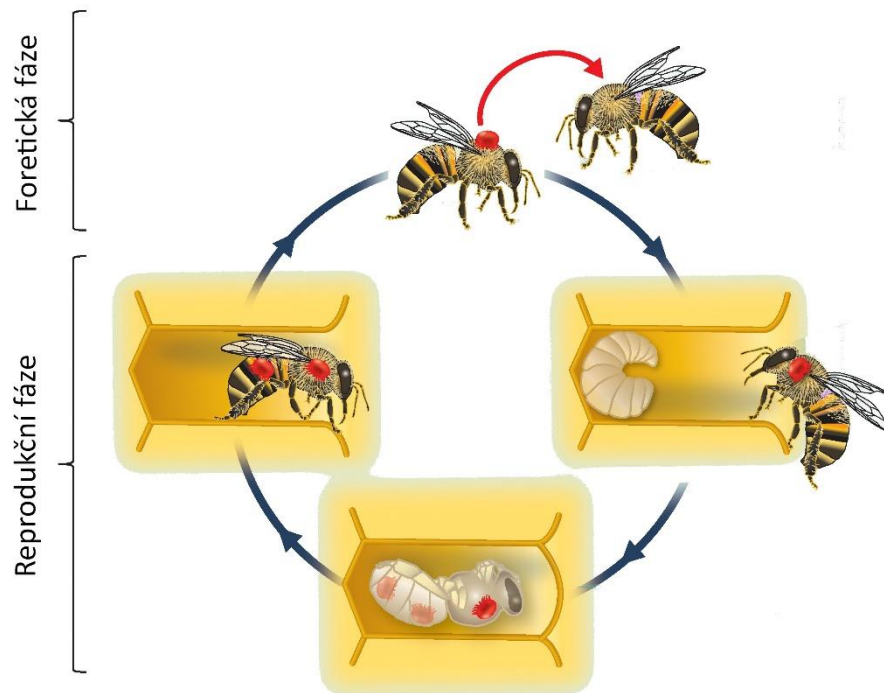
EFB způsobuje anaerobní G+ bakterie *Melissococcus plutonius*, která nevytváří spory (Fünfhaus et al., 2018). Stejně jako AFB napadá včely v larválním stádiu, s rostoucím věkem larvy se citlivost k nákaze snižuje. Larvy se nakazí při pozření infikované potravy, bakterie poté proliferuje ve střevě a spotřebovává potravu. Larva následně hyne z důvodu vyhladovění (Genersch, 2010). Uhynulé larvy zůstávají v nezavíčkovaných buňkách ve zkroucené poloze. Jejich dekompozici zajišťují saprofytické bakterie (Fünfhaus et al., 2018).

Nejčastěji dochází k úhynu 4-5 dní starých larev. Infikované larvy však mohou přežít a přejít do stádia kukly, přičemž kálejí. Výsledkem jsou kontaminované výkaly, které se nachází na stěnách buňky. Výkaly zůstávají stále infekční. Vylíhlí dospělci jsou poté zakrnělí (Genersch, 2010).

### **2.2.1.8 Kleštík včelí**

*V. destructor* je významný ektoparazit včely medonosné. Žije v teplotních i vlhkostních podmínkách, které odpovídají podmínkám ve včelstvu (Nazzi & Le Conte, 2016). Životní cyklus kleštíka se skládá ze dvou fází, foretické a reprodukční (Obr. 5). Během foretické fáze parazituje na dospělých včelách, během reprodukční fáze na včelím plodu (Ramsey et al., 2019). Foretická fáze byla definována jako fáze, během které roztoč využívá hostitele pouze k transportu a nepřijímá potravu. Jak ale ukázala studie Ramseyho et al. (2019), kleštík i v této fázi přijímá potravu ve formě tukového tělíska dospělců. Samice kleštíka se do buňky plodu dostává několik hodin před zavíčkováním larvy. Zde spotřebovává potravu larvy a vysává larvální hemolymfu, jakožto primární zdroj živin reprodukční fáze (Nazzi & Le Conte, 2016; Han et al., 2024). Zároveň klade vajíčka na stěny buňky. Nejdříve se líhne jeden samec, poté následuje několik samic. Potomci se mezi sebou páří, tudíž po vylíhnutí dospělé včely opouští buňku samice obou generací. K přenosu roztoče dochází na těle včely krmíčky, tedy v rámci foretické fáze, až dokud znovu nepronikne do buňky s larvou. Kleštík výrazně upřednostňuje trubčí buňky. Roztoč

je zároveň schopen napodobit „chemický podpis“ hostitele tak, aby jej úlové včely neidentifikovaly jako cizí organismus (Nazzi & Le Conte, 2016).



Obr. 5: Životní cyklus *V. destructor*. V rámci reprodukční fáze proniká do larvální buňky, parazituje na larvě a klade vajíčka. Vylíhli jedinci se mezi sebou páří a po vylíhnutí dospělé včely na ni buňku opouštějí. Roztoč se přesouvá na včelu krmičku, na jejíž těle prochází foretickou fází, až dokud znovu nepronikne do buňky s plodem (upraveno dle Nazzi & Le Conte, 2016).

Kleštík vysává tukové tělísko skrz ranku v kutikule, což umožňuje konzumaci potravy kleštíkem i jeho potomky, zároveň to však vytváří možnou cestu přenosu patogenů. Už samotná konzumace tukového tělíska je spojena s oslabením hostitele, útlumem jeho imunitního systému a zkrácením doby života (Tantillo et al., 2015; Ramsey et al. 2019). Proces získávání potravy z plodu je spojen s injektováním slin roztoče do těla larvy (Becchimanzi et al., 2020). Složení slin je dle studií zodpovědné za supresi imunitního systému larvy (Tantillo et al., 2015). Ramsey et al. (2018) dokázal, že je při injektování slin *V. destructor* indukována destrukce buněk tukového tělíska dospělých včel. Právě ve slinách byly nalezeny virové částice, což napovídá, že je kleštík biologickým vektorem a má tedy s patogenní částicí dlouhodobý ekologický vztah. Tomu odpovídá i nález virových částic v cytoplazmě buněk roztoče (Shen et al., 2005).

*V. destructor* je významným přenašečem mnoha virů, např. KBV. Jak uvádí studie Chena et al. (2006a), při umístění roztoče z virem infikovaných včelstev do zavíčkovaných zdravých buněk plodu dochází k nákaze včel. Čím více roztočů bylo

do buňky umístěno, tím vyšší byla incidence viru v plodu. Při umístění 4 roztočů do buňky byl přenos dokonce 100%, což značí velice efektivní přenos. Experimentem byl dokázán také horizontální přenos roztoč-roztoč, jelikož výskyt viru v roztočích přímo koreloval s jejich počtem v buňce. Kleštík je vektorem také DWV, stojí za rozšiřováním viru ve tkáních včely přes hemolymfu. V nepřítomnosti kleštíka setrvává obvykle na nízkém titru a neprojevují se jeho patologické efekty. Pokud je však včelstvo zamořeno kleštíkem, roste množství symptomatických včel (de Miranda & Genersch, 2010).

### **2.2.1.9 Hmyzomorka včelí**

*Nosema apis* způsobuje ve včelstvech onemocnění zvané nose móza, rozšířená je už také *Nosema ceranae*. Onemocnění napadá trávicí trakt, charakteristické je pokálením a úbytkem včel ve včelstvu. K infekci dochází po pozření potravy, ve které se nachází spory. Z těch se v trávicím traktu uvolní pólové vlákno, které pronikne do buňky hostitele. Následuje injekce sporoplasmy do hostitelské buňky. V buňkách se následně parazit množí (Galajda et al., 2021).

I hmyzomorka je spojována s přenosem patogenů. Ve studii Baileyho et al. (1983) bylo dokázáno, že je při koinfekci BQCV s nose mózou zvýšena mortalita včel. Nose móza zapříčiní střevní tkáň citlivější k virové nákaze (Tantillo et al., 2015). Dittes et al. (2020) zmiňuje spojitost nose mózy s CBPV.

### **2.2.2 Šíření patogenů ve včelstvu**

Včely žijí v početných koloniích, ve kterých spolu jednotlivci organizovaně spolupracují. Z toho důvodu dochází k téměř neustálým kontaktům mezi jedinci skrze potravu či chemickou komunikaci. To ze včelstva činí ideální prostor pro přenos patogenů. Proces přenosu patogenů je určující pro šíření a setrvání patogenů v populaci. K přenosu patogenů obecně dochází horizontální nebo vertikální cestou (Tantillo et al., 2015).

#### **2.2.2.1 Horizontální přenos patogenů**

K horizontálnímu přenosu patogenů dochází mezi jedinci stejné generace. V případě přímého přenosu přechází patogen z infikovaného jedince na zdravého, sem řadíme přenos vzdušnou cestou, potravní či pohlavní cestou. Dochází ale i k nepřímému přenosu, tato cesta zahrnuje biologického nebo fyzikálního přenašeče, který přenáší patogen z jednoho hostitele na druhého (Tantillo et al., 2015). S nepřímým přenosem je nejčastěji spojován kleštík včelí či hmyzomorka včelí (viz kapitoly 2.2.1.8, 2.2.1.9).

K přenosu potravní cestou dochází při pozření kontaminované potravy (orálně) a při přenosu patogenů ze střev fekáliemi (fekálně-orálně). Tato cesta hraje ve včelstvu



významnou roli, protože ve včelstvech je vysoká hustota jedinců, tím je vysoká míra fyzického kontaktu i trofalaxe (předávání potravy mezi jednotlivými členy kolonie). Tuto cestu přenosu podporuje chování včel, jako je krmení plodu, starání se o královnu či zpracovávání nektaru (Chen at al., 2006a). Důkazy podporující tuto cestu přinesly již mnohé studie, např. studie Shena et al. (2005), ve které byly nalezeny částice SBV a KBV v potravě pro plod, pylu i mateří kašičce. Infekce orální cestou může být také sledována přítomností patogenů ve tkáních včel. Studie ukázaly, že nejvyšší titry virových částic jsou ve střevě. Důležitá je také přítomnost patogenních částic ve výměšcích (Chen at al., 2006a).

Přenos pohlavní cestou se uskutečňuje mezi jedinci dvou pohlaví během páření (Chen at al., 2006a). Autoři de Miranda a Fries (2008) ve své studii uměle oplodnili zdravé královny DWV infikovaným semenem. Vysoké titry DWV nebyly naměřeny pouze ve spermatékách královen, ale i ve vaječnicích, což potvrdilo pohlavní přenos viru s následným vertikálním přenosem (viz kapitola 2.2.2.2). Vzhledem k faktu, že se královna páří s až 20 trubci, by přenos pohlavní cestou mohla být mnohem efektivnější forma horizontálního přenosu mezi koloniemi než cesta driftingu nebo krádeží mezi včelstvy (de Miranda & Fries, 2008).

Právě horizontální cestou dochází k šíření AFB, jak v rámci kolonie, tak i mezi koloniemi (Forsgren et al., 2018). Dochází k driftování včel, které nesou spory mezi koloniemi, případně ke kradení infikovaných zásob z infikovaných včelstev (Lindström et al., 2008).

Již byl popsán také přenos patogenů mezi jednotlivými hmyzími druhy, konkrétně mezi včelami a čmeláky. V rámci studie Tehel et al. (2022) byl popsán přenos DWV ze včely na čmeláka zemního, ovšem ne naopak. K přenosu docházelo přímým kontaktem (omakem), ale stejně tak i při sdílení stejného zdroje potravy (přenos potravní cestou). Dle této studie je přenos omakem efektivnější. V přírodě by však mohl být nejefektivnější nepřímý přenos vektorem.

#### **2.2.2.2 Vertikální přenos patogenů**

Při vertikálním přenosu dochází k přenosu mezi generacemi, tedy mezi královnou a jejími potomky (Chen at al., 2006a). Může k němu docházet dvěma způsoby. V prvním případě dochází přímo k oplodnění vajíček kontaminovaným semenem trubců, v případě druhém dochází nejdříve k infekci reprodukčních orgánů královny pohlavní cestou a následně přenosu patogenu do nové generace. Při uskutečnění prvního případu se budou rodit

infikovaní jedinci pouze z oplozených vajíček, tedy dělnice. Zatímco v případě druhém budou infikováni trubci i dělnice. Přenos však není 100% (de Miranda & Genersch, 2010). Ve studii Chena et al. (2006b) byl poprvé popsán vertikální přenos virů, konkrétně přenos BQCV, DWV, CBPV, KBV a SBV.

Různé cesty přenosu jsou důležité pro určení virulence viru. Dochází ke kompetici mezi horizontálním a vertikálním přenosem. Horizontální přenos je závislý na produkci většího množství patogenu, což zvyšuje virulenci. Naopak vertikální přenos je závislý na přežití a rozmnožování hostitele, hraje důležitou roli pro dlouhodobé setrvání patogenu ve včelstvu a je spojován s nižší virulencí. Obecně dochází ve zdravých včelstvech k vertikálnímu přenosu a tím udržování infekce na latentní úrovni. Jakmile jsou však včely vystaveny stresovým podmínkám, viry přechází k horizontálnímu přenosu, což vede až k úhynu včelstev (Tantillo et al., 2015).

### **2.3 Generace včel a jejich imunitní systém**

U eusociálně žijící včely medonosné se vytvořila schopnost přežít výrazné sezónní rozdíly v teplotě a dostupnosti nutričních zdrojů, a to rozdělením dělnic do dvou generací, letní a zimní, které se liší svou fyziologií a délkou života (Steinmann et al., 2015). Letní generace včel žije přibližně 15 až 48 dní, zatímco zimní generace až 8 měsíců (Kunc et al., 2019).

#### **2.3.1 Letní generace včel**

Letní generace včel se líhne od brzkého jara do pozdního léta. Jejím úkolem je hlavně shánění potravy a chov potomků v úlu (Dostálková et al., 2021). Dělnice vykonávají různé práce v úlu či mimo úl v závislosti na stáří. Mladé dělnice, úlové včely, se po dobu dvou až tří týdnů starají o plod (Steinmann et al., 2015). Starší včely, létavky, vylétávají ze včelstva a sbírají nektar a pyl pro zajištění dostatku zásob na zimu (Kunc et al., 2019). Toto behaviorální zrání je regulováno dle potřeby společenstva a je spojeno s fyziologickými změnami (Robinson, 1992; Lourenço et al., 2019). Mezi tyto změny patří zvýšení titru juvenilního hormonu (JH) a postupné snižování koncentrace Vg (Lourenço et al., 2019).

Vg je glykoprotein antioxidační a nutriční funkce. Jedná se o 180 kDa monomer syntetizovaný v tukovém tělísku a uvolňovaný do hemolymfy. Hladina Vg v hemolymfě se mění v závislosti na vývojovém stádiu včely a kastě. Čerstvě vylíhnuté včely mají Vg velmi málo, nejvíce ho obsahuje hemolymfa krmiček (Dostálková et al., 2021). Nejvyšší hladiny Vg mají královny, u kterých by právě tento protein měl svou antioxidační

schopností stát za dlouhou délkou života (3-5 let) (Corona et al., 2007). Naopak u trubců se Vg s průběhem života zcela vytrácí (Kunc et al., 2019).

Syntéza Vg je regulována JH, seskviterpenem syntetizovaným v *corpora allata* (Steinmann et al., 2015). U většiny hmyzích druhů hladina JH pozitivně koreluje s hladinou Vg, u včel je tomu však naopak. Zvýšený titr JH tak zastavuje produkci Vg. Hladina JH je tedy nejnižší u krmiček, zatímco nejvyšší je u čerstvě vylíhnutých včel a létavek. Právě interakce mezi JH a Vg stojí za regulací fyziologických procesů, jako je dělba práce v úlu, ale také dlouhověkost (Dostálková et al., 2021). I přes souvislost s věkem je však dělba práce flexibilní a při nedostatku úlových včel dochází k návratu létavek k činnostem v úlu. U těchto včel dojde ke snížení titru JH v hemolymfě a tím ke zvýšení syntézy Vg (Lourenço et al., 2019).

### **2.3.2 Zimní generace včel**

Včely zimní generace se líhnou od pozdního léta do časného podzimu. Musí přežít nejchladnější měsíce a udržovat ve včelstvu teplotu (Dostálková et al., 2021). Od února začíná u této generace dělba práce pro začátek vývoje plodu letní generace (Steinmann et al., 2015). Tyto včely jsou také vystaveny vyšší ekologické zátěži z pesticidů a onemocnění. Během zimy tak dochází k nejvyššímu počtu ztrát včelstev (Kunc et al., 2019).

Zimní a letní generace včel se liší v obsahu proteinů, hlavně Vg. Vyšší hladiny Vg v hemolymfě jsou u zimní generace (Dostálková et al., 2021). Tato generace má také větší tukové tělísko. Oproti tomu titr JH je vyšší u generace letní, tyto včely mají také větší hltanové žlázy (Kunc et al., 2019). Mezi generacemi je však také rozdíl na úrovni imunitního systému.

### **2.3.3 Imunitní systém včelích generací**

Se stárnutím organismu dochází ke zhoršení účinnosti imunitního systému, imunosenescenci. U savců dochází k přestavbě adaptivního imunitního systému a aktivaci vrozené imunity, což vede k častějším chronickým zánětům. Členovci adaptivní imunitu nemají, k imunosenescenci tak dochází v rámci imunity vrozené. U *D. melanogaster* se s postupem věku snižuje počet hemocytů a schopnost hemocytů fagocytovat mikroby. Zároveň dochází k upregulaci genů zapojených do imunitní odpovědi, což má za následek chronickou aktivaci imunitního systému a zkrácení délky života (Lourenço et al., 2019).

Létavky jsou vystaveny více rizikům než úlové včely, např. patogenům nacházejícím se na květinách (Lourenço et al., 2019). Studie Wilsona-Rich et al. (2008), uvádí, že ve srovnání s úlovými včelami mají létavky aktivnější PO. S věkem však klesá počet hemocytů (Butolo et al., 2021). Úlové včely mají větší tukové tělísko, což umožňuje větší produkci AmP (Lourenço et al., 2019). Jak však uvádí studie Lourença et al. (2019), imunosenescenci u včel neovlivňuje pouze stárnutí organismu, ale také jejich behaviorální status.

Včely letní generace včel kombinují mechanismy buněčné a humorální imunity, zatímco zimní generace využívá k obraně hlavně humorální imunitu (Kunc et al., 2019). Ve studii Steinmanna et al. (2015), byla porovnána genová exprese 8 genů zapojených do imunity po nákaze DWV u obou včelích generací. Vyšší titry viru byly nalezeny u zimní generace. Nákaza vedla ke snížené expresi genů zapojených do buněčné imunity a fyziologické aktivity, naopak v porovnání s letní generací včel byla vyšší exprese genů AmP. S nákazou byla také spojena snížená exprese Vg. Právě snížená funkce buněčné imunity v zimě může vést k vyšší citlivosti k DWV. Studie Dostálkové et al. (2021), uvádí aktivaci imunitního systému včelích generací po injekci teplem usmrcených bakterií u 10 dní starých úlových včel. Výsledky ukazují, že u zimní generace dochází k intenzivnější odpovědi na patogen vyšší expresí genů kódujících AmP, u těchto včel byla také vyšší antimikrobiální aktivita hemolymfy. Stejně jako v předchozí studii, i zde došlo po nákaze k poklesu Vg.

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

3-(3,4-dihydroxyfenyl)-L-alanin (DOPA) (Sigma-Aldrich, USA)

3,3',5,5'-tetramethylenbenzidin (TMB) (Carl Roth, Německo)

5-brom-4-chlor-3-indoylfosfát (BCIP) (Sigma-Aldrich, USA)

96% kyselina sírová (Lach-Ner, Česká republika)

Akrylamid (AA) (Sigma-Aldrich, USA)

Albumin (PanReac AppliChem, Německo)

Dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát (Sigma-Aldrich, USA)

Dimethylformamid (DMF) (Sigma-Aldrich, USA)

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA)

Dodecylsulfát sodný (SDS) (Sigma-Aldrich, USA)

Ethanol (Lach-Ner, Česká republika)

Glycerol (Sigma-Aldrich, USA)

Glycin (Sigma-Aldrich, USA)

Hovězí sérový albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Sigma-Aldrich, USA)

Hydrogenuhlíčitan sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich, USA)

Chlorid sodný (Penta chemicals, Česká republika)

Kyselina citrónová bezvodá (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina chlorovodíková (Penta chemicals, Česká republika)

Kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina trifluoroctová (TFA) (Sigma-Aldrich, USA)

Marker molekulové hmotnosti (SERVA Triple Color Protein Standard III, rozsah 5-245 kDa, SERVA Electrophoresis GmbH, Německo)

Methanol (Lach-Ner, Česká republika)

Močovina (Sigma-Aldrich, USA)

N,N'-metylen-bisakrylamid (bAA) (Sigma-Aldrich, USA)

N,N'-tetramethylethylendiamin (TEMED) (Carl Roth, Německo)

n-butanol (Sigma-Aldrich, USA)

Nitrotetrazoliová modř (NBT) (Sigma-Aldrich, USA)

Perborát sodný tetrahydrát (Merck KGaA, Německo)

Ponceau S (Merck KGaA, Německo)

Práškové mléko (Carl Roth, Německo)

Premixed Tricin sample buffer (Bio-Rad, USA)

- Složení: 200 mmol·dm<sup>-3</sup> Tris-HCl (pH 6,8), 40% glycerol, 2% SDS, 0,04% Coomassie Brilliant Blue R 250

Tricin (Sigma-Aldrich, USA)

Tris (Sigma-Aldrich, USA)

Tween 20 (Carl Roth, Německo)

Uhličitan sodný (Lach-Ner, Česká republika)

α-chymotrypsin (Sigma-Aldrich, USA)

β-merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)

### **3.1.2 Roztoky**

0,1 mol·dm<sup>-3</sup> kyselina citrónová

2,1 g bezvodé kyseliny citrónové bylo rozpuštěno ve 100 ml destilované vody (dH<sub>2</sub>O).

0,2 mol·dm<sup>-3</sup> hydrogenfosforečnan sodný

1,78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O bylo rozpuštěno v 50 ml dH<sub>2</sub>O.

0,5 mol·dm<sup>-3</sup> kyselina sírová

2,79 ml 96% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bylo smícháno s 97,21 ml dH<sub>2</sub>O.

2 mg·ml<sup>-1</sup> α-chymotrypsin

2 mg α-chymotrypsinu byly rozpuštěny v 1 ml HPLC vody.

10% APS

50 mg APS bylo rozpuštěno v 500 μl dH<sub>2</sub>O.

100 mmol·dm<sup>-3</sup> Na-Pi pufr, pH 7,0

V 50 ml dH<sub>2</sub>O bylo rozpuštěno 78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O. 68,99 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>· H<sub>2</sub>O bylo rozpuštěno v 50 ml dH<sub>2</sub>O. Pro přípravu pufru bylo smícháno 30,5 ml roztoku Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a 19,5 ml roztoku NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. Hodnota pH byla upravena pomocí pH metru.

100 mmol·dm<sup>-3</sup> TMB

24 mg TMB bylo rozpuštěno v 1 ml DMSO.

AB-3 zaostřovací gel monomer (49,5 % T, 3 % C)

96 g AA a 3 g bAA bylo rozpuštěno v 200 ml dH<sub>2</sub>O.

AB-6 separační gel monomer (49,5 % T, 6 % C)

93,0 g AA a 6,0 g bAA bylo rozpuštěno v 200 ml dH<sub>2</sub>O.

#### Anodový pufr (0,1 mol·dm<sup>-3</sup> Tris, pH 8,9), 10× koncentrovaný

60,57 g Trisu bylo rozpuštěno v 200 ml dH<sub>2</sub>O. Následně bylo upraveno pH roztoku na hodnotu 8,9 a roztok byl doplněn do 500 ml. Před použitím byl roztok 10× naředěn dH<sub>2</sub>O.

#### BCIP

50 mg BCIP bylo rozpuštěno v 1 ml 100% DMF.

#### Blotovací pufr, pH 8,3

4,5375 g Trisu a 21,615 g glycinu bylo rozpuštěno v 350 ml dH<sub>2</sub>O, následně bylo přidáno 300 ml methanolu. Po kontrole pH byl roztok doplněn dH<sub>2</sub>O do 1,5 l.

#### Coating pufr

1,272 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 1,512 g NHCO<sub>3</sub> bylo rozpuštěno v 250 ml dH<sub>2</sub>O a pH roztoku bylo upraveno na 9,6. Pufr byl doplněn dH<sub>2</sub>O do 300 ml a autoklávován.

#### 3 mg·ml<sup>-1</sup> DOPA

3 mg DOPA byly rozpuštěny v 1 ml Na-Pi pufru.

#### ELISA substrát

1 ml fosfo-citrátového pufru s perborátem sodným o pH 4,6 bylo smícháno s 25 µl 100 mmol·dm<sup>-3</sup> TMB.

#### Fosfo-citrátový pufr s perborátem sodným, pH 4,6

24 ml 0,2 mol·dm<sup>-3</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> bylo smícháno s 26 ml 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> kyseliny citrónové. Hodnota pH roztoku byla upravena na 4,6. Následně bylo k roztoku přidáno 0,0375 g NaBO<sub>3</sub>·4 H<sub>2</sub>O.

#### Gelový pufr (3,0 mol·dm<sup>-3</sup> Tris, 0,3% SDS, pH 8,45), 3×koncentrovaný

181,65 g Trisu a 1,5 g SDS bylo rozpuštěno v 300 ml dH<sub>2</sub>O. Hodnota pH roztoku byla upravena na hodnotu 8,45 a objem doplněn do 500 ml.

#### Katodový pufr (0,1 mol·dm<sup>-3</sup> Tris, 0,1 mol·dm<sup>-3</sup> Tricin, 0,1% SDS, pH 8,25), 10× koncentrovaný

60,55 g Trisu, 89,6 g Tricinu a 5 g SDS bylo rozpuštěno v 500 ml dH<sub>2</sub>O. Před použitím byl roztok 10× naředěn dH<sub>2</sub>O.

#### NBT

50 mg NBT bylo rozpuštěno v 1 ml 70% DMF.

#### Pracovní promývací pufr

50 ml 10× koncentrovaného promývacího pufru bylo smícháno s 500 µl Tween 20. Následně bylo přidáno 450 ml dH<sub>2</sub>O.

#### Promývací pufr 10× koncentrovaný

43,82 g NaCl, 2,08 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O a 0,93 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2 H<sub>2</sub>O bylo rozpuštěno v 400 ml dH<sub>2</sub>O. Hodnota pH roztoku byla upravena na 7,5 a roztok byl po doplnění do 500 ml autoklávován.

#### Pufr pro ALP

12,11 g Trisu, 1,016 g MgCl<sub>2</sub> a 5,84 g NaCl bylo rozpuštěno v 900 ml dH<sub>2</sub>O a pH roztoku upraveno na 9,5. Roztok byl doplněn do objemu 1 l.

#### TBS pufr, pH 7,5, 5× koncentrovaný

24,2 g Trisu a 292,2 g NaCl bylo rozpuštěno v 1,5 l dH<sub>2</sub>O. Hodnota pH roztoku byla upravena na 7,5 a roztok byl doplněn do 2 l. Před použitím byl roztok 5× naředěn dH<sub>2</sub>O.

#### TBS-T (0,1% a 0,05% Tween)

K naředěnému TBS pufru bylo pro získání 0,1% roztoku přidáno ke 100 ml pufru 0,1 ml Tween 20 (pro Def), a pro získání 0,05% 50 µl Tween 20 (pro Aba).

#### Tris-HCl

1,2114 g Trisu bylo rozpuštěno v 100 ml dH<sub>2</sub>O. Pomocí HCl bylo upraveno pH na hodnotu 6,8.

### **3.1.3 Biologický materiál**

#### Optimalizační vzorky

Optimalizační vzorky byly dodány školitelem. Byly použity vzorky lyofilizované hemolymfy mladušek, neimunizovaných včel i včel imunizovaných. Všechny včely pocházely ze včelnice v Kývalce (Česká republika). Pro optimalizaci aktivity PO byly použity vzorky hemolymfy odebrané živým včelám.

#### Experimentální vzorky

Experimentální vzorky byly dodány školitelem. Včely použité pro experiment pocházely ze včelnice v Kývalce (Česká republika).

Byly použity vzorky 3 experimentálních skupin:

- Kontrola – včely po vylíhnutí krmeny 50% sacharosou a pylovou náhražkou (7-10 dní)
- Bakterie – včely po vylíhnutí krmeny 50% sacharosou a pylovou náhražkou (7-10 dní), imunizace orálně směsí inaktivovaných G<sup>+</sup> a G<sup>-</sup> bakterií (koncentrace bakterií 10<sup>5</sup>, *Paenibacillus larvae*, *Escherichia coli*, treatment 24 nebo 48 hodin)
- LPS – včely po vylíhnutí krmeny 50% sacharosou a pylovou náhražkou (7-10 dní), imunizace orálně LPS (60 µg·ml<sup>-1</sup>, z *E. coli* treatment 24 nebo 48 hodin)



Pro detekci AmP byla hemolymfa rozpuštěna v 0,1% TFA, jeden vzorek obsahoval hemolymfu z 5 včel, z jedné včely byly odebrány 2 µl hemolymfy. Z každé skupiny byly použity vzorky z 5 klíček a z každé klíčky bylo získáno 5 vzorků. Veškeré vzorky byly lyofilizovány. Pro stanovení aktivity PO byla zamražena čistá hemolymfa včel, se stejným množstvím hemolymfy i přípravou vzorků jako v případě vzorků pro detekci AmP.

### **3.1.4 Protilátky**

#### Primární protilátky

Králičí protilátka proti abaecinu (Moravian-Biotechnology, Česká republika)

Králičí protilátka proti defensinu-1 (Moravian-Biotechnology, Česká republika)

Králičí protilátka proti hymenoptaecinu (Moravian-Biotechnology, Česká republika)

#### Sekundární protilátky

Kozí anti-králičí IgG protilátka konjugovaná s fenol:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidoreduktasou (křenová peroxidasa, HRP EC 1.11.1.7) (Sigma-Aldrich, USA)

Kozí anti-králičí IgG protilátka konjugovaná s fosfát-monoesterfosfohydrolasou (alkalická fosfatasa, ALP, EC 3.1.3.1) (Sigma-Aldrich, USA)

### **3.1.5 Synteticky připravené peptidy**

#### Peptidy pro UHPLC-ESI-Q-TOF

Apidaecin 1B (čistota > 99 %; Merck KGaA, Německo)

Izotopově [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>] značený apidaecin 1B (na C-konci, čistota > 98 %; Merck KGaA, Německo)

#### Epitopy peptidů pro Western blot a metodu ELISA

Defensin-1 (Def) (M = 1,68 kDa; Moravian-Biotechnology, Česká republika)

- Sekvence: CTKEGKSRPSLDI

Abaecin (Aba) (M = 1,48 kDa; Moravian-Biotechnology, Česká republika)

- Sekvence: CFNPKIKWPQGY

Hymenoptaecin (Hym) (M = 1,43 kDa; Moravian-Biotechnology, Česká republika)

- Sekvence: TKEGKSRPSLDI

#### Epitopy peptidů pro Western blot a metodu ELISA kaplované s BSA

Defensin-1 (M = 68,2 kDa; Moravian-Biotechnology, Česká republika)

Abaecin (M = 68 kDa; Moravian-Biotechnology, Česká republika)

Hymenoptaecin (M = 67,9 kDa; Moravian-Biotechnology, Česká republika)

### **3.1.6 Přístroje a vybavení**

96jamková mikrodětička pro VIS (Sigma-Aldrich, USA)

Analytické váhy (BioTech innovative, Česká republika)  
Aparatura pro Tank blot (Bio-Rad, USA)  
Aparatura pro elektroforézu v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS-PAGE) (Bio-Rad, USA)  
Autokláv (Tuttnauer, Nizozemsko)  
Blotovací membrána PVDF Immobilon-FL, průměr pórů 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation, USA)  
Elektromagnetická míchačka (Biosan, Lotyšsko)  
ELISA destička – Corning® 96 Well EIA/RIA Assay Microplate (Sigma-Aldrich, USA)  
Hmotnostní spektrometr Compact (Bruker Daltonics, Německo)  
HPLC systém UltiMate 3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)  
Chlazená centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)  
pH metr (XS Instruments, Itálie)  
Předvážky (Radwag, Polsko)  
Rotační třepačka (Biosan, Lotyšsko)  
Simplicity® Water Purification System (Merck KGaA, Německo)  
Spektrofotometrický reader Synergy H1 (Agilent BioTek, USA)  
Termoblok (Major Science, Taiwan)  
Termostatovaná třepačka (Biosan, Lotyšsko)  
Třepačka (Grant Instruments Ltd, UK)  
Ultrazvuková lázeň Elmasonic (Elma Schmidbauer GmbH, Německo)  
Vakuová odparka Concentrator (Eppendorf, Německo)  
Vortex (Biosan, Lotyšsko)  
Zdroj elektrického napětí (Cleaver Scientific, UK)

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Ověření účinnosti protilátek proti antimikrobiálním peptidům metodou Western blot**

#### **3.2.1.1. Příprava optimalizačních vzorků**

Pro provedení metody Western blot byly použity standardy epitopů AmP Def a Aba o koncentraci  $100 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ , stejně tak standardy epitopů kaplované s BSA o shodné koncentraci. Roztoky standardů byly připraveny v Tris-HCl pufru. Dále byly použity optimalizační vzorky lyofilizované hemolymfy imunizovaných včel, které byly rozpuštěny v 50, 75 či 100  $\mu\text{l}$  Tris-HCl pufru, na 20 minut umístěny do lednice, následně

promíchány na centrifuze a vortexovány. V případě použití vzorků hemolymfy mladušek či neimunizovaných včel došlo k rozpuštění vzorků v 75  $\mu$ l Tris-HCl pufru, následná úprava vzorků byla stejná jako v případě vzorků imunizovaných včel. Ke všem standardům i vzorkům byl následně v poměru 1:1 přidán Tricin sample buffer s 2%  $\beta$ -merkaptoethanolem. Před nanášením na gel byly zkumavky na 5 minut umístěny do termobloku o teplotě 95 °C.

### 3.2.1.2 SDS-PAGE

Pro SDS-PAGE byl použit 4% zaostřovací gel (49,5 % T, 3 % C) a 16% dělicí gel s močovinou (49,5 % T, 3 % C). Složení gelů uvádí Tab. 1. Polymerace byla zahájena přídatkem 10% APS. Dělicí gel byl po nanesení pro tuhnutí převrstven *n*-butanolem.

Tab. 1: Složení gelů pro SDS-PAGE.

Typ gelu	AB-6 [ml]	AB-3 [ml]	Gelový pufr 3 $\times$ koncentrovaný [ml]	Glycerol [g]	dH <sub>2</sub> O [ml]	TEMED [ $\mu$ l]	10% APS [ $\mu$ l]	Močovina [g]
16% dělicí	2,5	-	2,50	0,75	2,5	2,50	25	2,7
4% zaostřovací	-	0,25	0,75	-	2	2,25	22,5	-

Do jamek gelu byly pipetovány 4  $\mu\text{l}$  markeru molekulové hmotnosti a 15  $\mu\text{l}$  standardu či vzorku. Mezi skla byl nalit katodový pufr, vně pufr anodový. Pro zaostření vzorků bylo použito napětí 50 V, které bylo následně zvýšeno na 120 V.

### **3.2.1.3 Tank blot**

Blotting byl proveden metodou tank blot s použitím PVDF membrány, která byla nejdříve namočená na 5 minut do methanolu. Porézní houbičky, filtrační papíry i membrány byly následně ponořeny do blotovacího pufru s methanolem. Po seskládání blotovací kazety s gelem a membránou byl proveden blotting přes noc s konstantním napětím 32 mA na jednu membránu. Blotting byl následující den ověřen barvením membrány na proteiny pomocí Ponceau S.

### **3.2.1.4 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů**

Pro imunochemickou detekci AmP byla membrána nejdříve blokována s využitím albuminu v TBS pufru. V případě Def se jednalo o 5% roztok, v případě Aba 1%. Blokování probíhalo v lednici po dobu 2 hodin na třepačce. Membrána byla následně třikrát po 10 minutách na třepačce promyta roztokem TBS-T. Inkubace s primární protilátkou probíhala přes noc v lednici na třepačce při ředění protilátky 1:3000 či 1:5000 v TBS-T pufru.

Po inkubaci byla membrána opět třikrát po 10 minutách promyta TBS-T puftrem a následně hodinu na třepačce inkubována se sekundární protilátkou konjugovanou s ALP při ředění 1:15000 pro Def a 1:2000 pro Aba v TBS-T pufru. Následovalo další promytí membrány třikrát po 10 minutách v TBS-T pufru. Membrána byla barvena za použití BCIP a NBT v pufru pro ALP (10 ml pufru pro AP, 33  $\mu\text{l}$  BCIP a 33  $\mu\text{l}$  NBT).

## **3.2.2 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů metodou ELISA**

### **3.2.2.1 Příprava optimalizačních vzorků**

Pro ověření účinnosti a správnosti metody byl použit coating pufr jako blank, dále standard epitopu Hym, standardy epitopů Def a Aba kaplované s BSA, čisté BSA a vzorky lyofilizované hemolymfy mladušek. Hym byl na destičku nanášen v koncentraci 20  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ , Def a Aba kaplovaný s BSA v koncentracích 100  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  a 500  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . BSA bylo použito v koncentraci 100  $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Všechny roztoky byly připraveny v coating pufru.

Hemolymfa mladušek byla rozpuštěna v 650 µl coating pufru. Následně byly vzorky na 20 minut umístěny do lednice, poté promíchány na centrifuze a vortexovány. V případě detekce Def a Aba byly pro nanesení na ELISA destičku ředěny 1:100 v coating pufru, v případě detekce Hym 1:10 v tomtéž pufru. Na ELISA destičku bylo vždy v duplikátu naneseno 100 µl vzorku. Poté byla destička obtažena parafilmem a inkubována přes noc v lednici.

### **3.2.2.2 Příprava experimentálních vzorků**

Vzorky lyofilizované hemolymfy experimentálních vzorků byly rozpuštěny v 650 µl coating pufru. Následně byly na 20 minut umístěny do lednice, poté promíchány na centrifuze a vortexovány. Pro detekci Def a Aba byly naředěny 1:100 v coating pufru, pro detekci Hym 1:10 v tomtéž pufru. Na ELISA destičku byly vzorky pipetovány v duplikátu, vždy po 100 µl s použitím coating pufru jako blanku. Po napipetování vzorků byla destička potažena parafilmem a přes noc inkubována v lednici.

### **3.2.2.3 Provedení metody ELISA**

Následující den byly vzorky z jamek vytřepány a destička vysušena poklepáním na ubrousek. Následně byla destička promyta. Pro promytí bylo do každé jamky napipetováno 200 µl pracovního promývacího pufru a jamka byla 7× promíchána pomocí pipety. Po vytřepání pufru z jamek byl postup ještě 2× zopakován. Následně bylo do každé jamky přidáno 200 µl 0,5% mléka v pracovním promývacím pufru, destička byla obtažena parafilmem a 2 hodiny při 37 °C inkubována na třepačce za mírného třepání. Po skončení inkubace bylo mléko vytřepáno z jamek a destička standardním způsobem promyta.

Do každé jamky bylo následně přidáno 100 µl primární protilátky. V případě Def a Aba byly protilátky ředěny 1:5000, v případě Hym 1:500, vždy v pracovním promývacím pufru. Inkubace probíhala po dobu 1 hodiny při 37 °C na třepačce za mírného třepání. Po skončení inkubace byla protilátka vytřepána z jamek a destička standardním způsobem promyta. Poté bylo do každé jamky přidáno 100 µl sekundární protilátky konjugované s HRP v ředění 1:3000 v pracovním promývacím pufru. Destička byla inkubována 1 hodinu při 37 °C na třepačce za mírného třepání. Protilátka byla následně vytřepána z destičky a destička stejně v předchozích krocích promyta. Poté bylo do každé jamky napipetováno 200 µl pracovního promývacího pufru, který byl z jamek ihned vytřepán a destička vysušena poklepáním na ubrousek. Proces byl ještě jednou opakován a poté byly zbývající bubliny v jamkách odstraněny pomocí špendlíku.

Do každé jamky bylo následně přidáno 100  $\mu\text{l}$  ELISA substrátu a destička byla 1 hodinu inkubována při 37 °C na třepačce za mírného třepání ve tmě. Po skončení inkubace bylo pro zastavení reakce do každé jamky připipetováno 50  $\mu\text{l}$  0,5 mol·dm<sup>-3</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Následně byla změřena absorbance na spektrofotometrickém readeru při 450 nm.

### **3.2.3 Kvantifikace apidaecinu v hemolymfě úlových včel pomocí LC/MS**

Všechny experimentální vzorky byly rozpuštěny ve 100  $\mu\text{l}$  5% FA. Vzorky byly následně vortexovány, 10 minut sonikovány v ultrazvukové lázni a centrifugovány (4 °C, 16 100×g, 10 minut). Do MS vialky bylo pipetováno 10  $\mu\text{l}$  5% FA, 20  $\mu\text{l}$  rozpuštěného vzorku a 10  $\mu\text{l}$  interního standardu izotopově značeného apidaecinu. Vzorky byly následně proměřeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi spojené s hmotností spektrometrií, při které byla použita ionizace elektrosprejem a analýza kvadrupólem s analyzátozem doby letu (UHPLC-ESI-Q-TOF), nástřik 5  $\mu\text{l}$ .

UHPLC separace byla provedena na koloně Kinetex 1,7  $\mu\text{m}$  EVO C18, 100 Å, 150×2,1 mm, C18 s předkolonou. Kolona byla umístěna do termostatu s teplotou 40 °C. Mobilní fáze byly (A) 0,5% FA ve vodě a (B) 0,5% FA v acetonitrilu. Separace byla provedena s průtokovou rychlostí 0,2 ml·min<sup>-1</sup> s gradientem: 0–3 min 2% B, 3–12 min 2–45% B, 12–14 min 45–95% B, 14–17 min 95% B, 17–18 min 95–2% B, 19–20 min 2% B (Dostálková et al., 2021).

Data z MS byla získána při nastavení: hmotnostní rozsah 100–2800 Da, spektrální rychlost 4 Hz, napětí koncové desky 500 V, napětí na kapiláře 4500 V, tlak rozprašovače 2,5 bar, přívod sušícího plynu 6 l·min<sup>-1</sup>, sušící teplota 200 °C, HPC interní kalibrace mravenčanem sodným (Dostálková et al., 2021).

Veškeré zpracování dat bylo provedeno pomocí softwarů Bruker Compass HyStar (Bruker, verze 5.0.37.0), DataAnalysis (Bruker, version 4.4) Compass otofControl (Bruker, verze 5.2) a TASQ2.2 (Bruker Daltonics).

### **3.2.4 Optimalizace stanovení aktivity fenoloxidasy**

#### **3.2.4.1 Příprava vzorků**

Optimalizační vzorky byly nachystány odběrem hemolymfy živým včelám. Jeden vzorek obsahoval celkem 10  $\mu\text{l}$  hemolymfy, 2  $\mu\text{l}$  z jedné včely. K optimalizačním i experimentálním vzorkům bylo přidáno 390  $\mu\text{l}$  Na-Pi pufru. Vzorky byly následně po dobu 5 minut zamrazeny v -60 °C. Poté byly vzorky propipetováním promíchány a centrifugovány (4 °C, 12 000×g, 15 minut). Supernatant byl odebrán pro měření enzymové aktivity.

### 3.2.4.2 Měření enzymové aktivity

Pro měření enzymové aktivity PO bylo do jamky mikrodestičky napipetováno na ledu 40  $\mu$ l supernatantu, veškerá stanovení probíhala v duplikátu. Destička byla následně inkubována 10 minut na třepačce za laboratorní teploty. Destička byla po inkubaci vložena do spektrofotometrického readeru s dávkováním substrátu, který do každé jamky napipetoval 160  $\mu$ l DOPA. Kinetické měření probíhalo po dobu 30 minut při teplotě 30 °C s odečtem absorbance při vlnové délce 492 nm v intervalu 2 a půl minuty. Před každým odečtením absorbance byla destička 5 sekund promíchávána. Pro ověření absorpčního maxima bylo proměřeno absorpční spektrum produktu v rozsahu 300-600 nm.

### 3.2.4.3 Aktivace profenoloxidasy $\alpha$ -chymotrypsinem

Do jamky mikrotitrační destičky bylo napipetováno na ledu 40  $\mu$ l supernatantu, veškerá stanovení probíhala v duplikátu. Do každé jamky byly následně přidány 2  $\mu$ l  $\alpha$ -chymotrypsinu. Destička byla poté inkubována 10 minut na třepačce za laboratorní teploty. Destička byla po inkubaci vložena do spektrofotometrického readeru s dávkováním substrátu, který do každé jamky napipetoval 160  $\mu$ l DOPA. Kinetické měření probíhalo po dobu 30 minut při teplotě 30 °C s odečtem absorbance při vlnové délce 492 nm v intervalu 2 a půl minuty. Před každým odečtením absorbance byla destička 5 sekund promíchávána. Sběr dat ze všech spektrofotometrických měření proběhl v softwaru Gen5 (Agilent BioTek, USA, verze 3.06).

### 3.2.5 Zpracování a statistické vyhodnocení dat

Zpracování dat a tvorba grafů byla provedena softwarem Microsoft Excel 365 (Microsoft). Veškeré statistické vyhodnocení bylo provedeno pomocí softwaru JASP (University of Amsterdam, verze 0.18.3).

Získaná data byla v softwaru JASP otestována na normalitu (Shapiro-Wilk test) a následně vyhodnocena parametrickým testem ANOVA či logaritmována a následně opět testována na normalitu. Dle výsledku byl následně proveden parametrický či neparametrický test ANOVA (Kruskal-Wallis test), případně dvoucestná ANOVA.

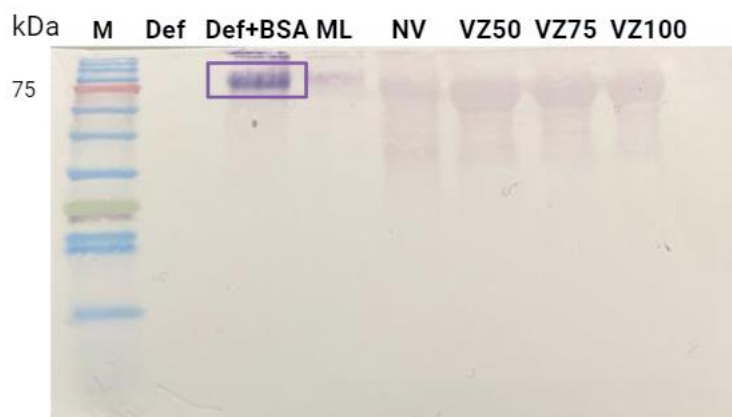
Pro srovnání výsledků byly definovány úrovně statistické významnosti dle p hodnot statistických testů:

- $p < 0,05 \rightarrow *$
- $p < 0,01 \rightarrow **$
- $p < 0,001 \rightarrow ***$

## 4 VÝSLEDKY

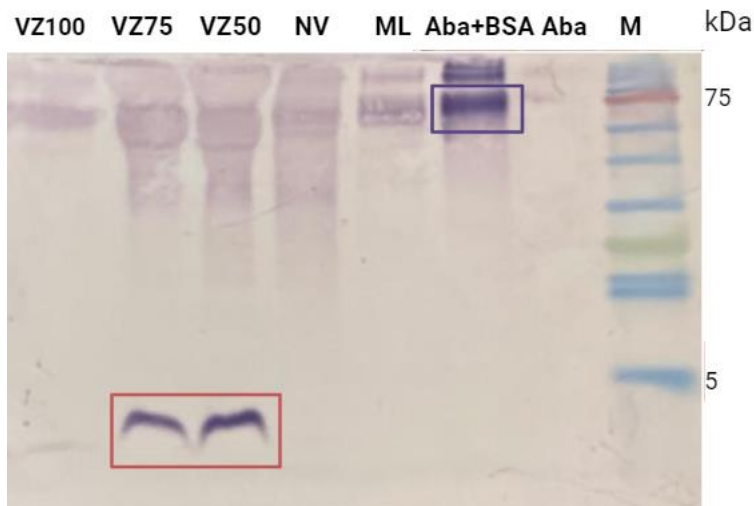
### 4.1 Ověření účinnosti protilátek proti antimikrobiálním peptidům metodou Western blot

Fotografie membrán zobrazují výsledek Western blotu při testování frakce 1.1 protilátky proti Def (Obr. 6) a frakce 1.1 protilátky proti Aba (Obr. 7).



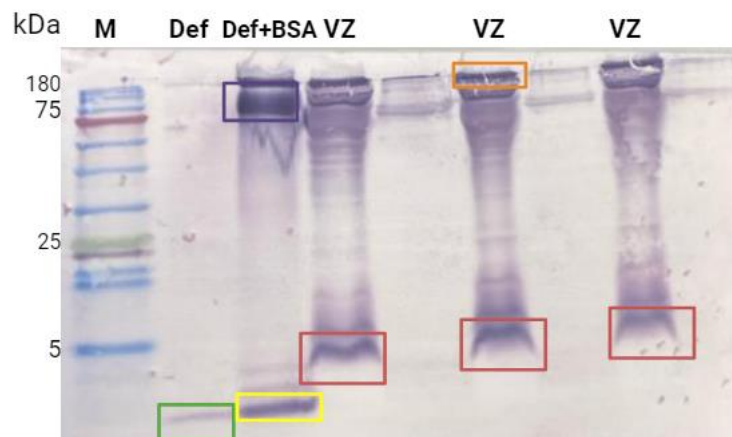
Obr. 6: Výsledek imunochemické detekce Def při použití frakce protilátky 1.1 králíka č. 23, ředění protilátky 1:5000 v TBS pufru, velikost pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Písmena popisují jednotlivé vzorky: M-marker, Def-epitop, Def-epitop kaplovaný s BSA, ML-hemolymfa mladušky, NV-hemolymfa neimunizované včely, VZ-vzorek hemolymfy včely imunizované. Číslo za VZ vyjadřují objem Tris-HCl pufru v  $\mu\text{l}$ , ve kterém byla hemolymfa rozpuštěna. Číslo vlevo značí molekulovou hmotnost v kDa. V případě Def byl pozorovatelný pouze band odpovídající Def kaplovanému s BSA (fialový rámeček).





Obr. 7: Výsledek imunochemické detekce Aba při použití frakce protilátky 1.1 králíka č. 25, ředění protilátky 1:5000, velikost pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Písmena vyjadřují jednotlivé vzorky: M-marker, Aba-epitop, Aba-epitop kaplovaný s BSA, ML-hemolymfa mladušky, NV-hemolymfa neimunizované včely, VZ-vzorek hemolymfy včely imunizované. Čísla za VZ vyjadřují objem Tris-HCl pufru v  $\mu\text{l}$ , ve kterém byla hemolymfa rozpuštěna. Čísla vpravo značí molekulovou hmotnost v kDa. Byly pozorovatelné bandy odpovídající Aba ve dvou koncentrovanějších vzorcích hemolymfy imunizovaných včel (červený rámeček) a Aba kaplovanému s BSA (fialový rámeček).

Další fotografie membrány zobrazuje účinnost frakce 1.6 protilátky proti Def (Obr. 8).



Obr. 8: Výsledek imunochemické detekce Def při použití frakce protilátky 1.6 králíka č. 24, ředění protilátky 1:5000, velikost pórů 0,45  $\mu\text{m}$ . Písmena vyjadřují jednotlivé vzorky: M-marker, Def-epitop, Def+BSA-epitop kaplovaný s BSA, VZ-vzorek hemolymfy včely imunizované. Čísla vlevo značí molekulovou hmotnost v kDa. Byly pozorovatelné bandy odpovídající samotnému Def jak ve vzorku samotného epitopu (zelený rámeček), tak ve vzorku epitopu kaplovanému s BSA (žlutý rámeček), Def kaplovaný s BSA (fialový rámeček) a Def v hemolymfě imunizovaných včel (červené rámečky). Byl pozorován také Def navázan pravděpodobně na vitellogenin (oranžový rámeček).

## 4.2 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů metodou ELISA

### 4.2.1 Ověření účinnosti a správnosti metody proměřením optimalizačních vzorků

Metodou ELISA byl nejdříve proměřen blank a standardy epitopů peptidů, epitopů peptidů kaplovaných s BSA, BSA či vzorky hemolymfy mladušek. Tab. 2 zobrazuje ukázkou tohoto měření při detekci Aba. Naměřenými hodnotami absorbance bylo ověřeno správné vázání protilátky pouze na epitopy AmP.

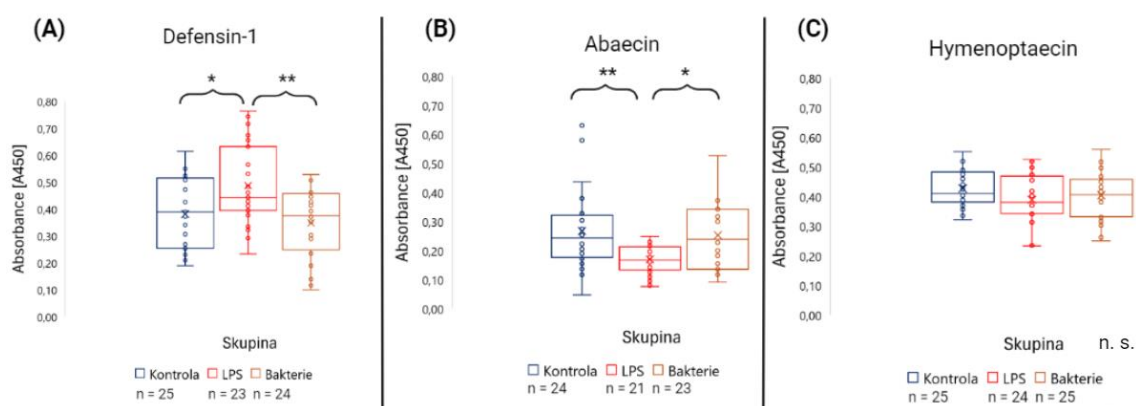
Tab. 2: Naměřené absorbance optimalizačních vzorků pro imunochemickou detekci Aba metodou ELISA při spektrofotometrickém proměření při 450 nm. Hodnota absorbance byla získána zprůměrováním hodnot absorbancí při měření v duplikátu. Jako blank byl použit coating pufr.

Vzorek	Absorbance [A450]
Blank	0,285
Aba+BSA (c = 100 ng·ml <sup>-1</sup> )	0,587
Aba+BSA (c = 500 ng·ml <sup>-1</sup> )	0,898
BSA	0,227
Mladuška	0,577

## 4.2.2 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů v experimentálních vzorcích

Výsledky imunochemické detekce AmP v hemolymfě včel ukazují relativní zastoupení tří AmP ve třech experimentálních skupinách (Obr. 9). V případě Def byly statistickým vyhodnocením zjištěny statisticky významné rozdíly v hladinách AmP mezi skupinou LPS a kontrolou (ANOVA,  $p = 0,024$ ,  $df = 2$ ), stejně tak mezi skupinou LPS a skupinou bakterie (ANOVA,  $p = 0,002$ ,  $df = 2$ ). Nebyly zjištěny významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a skupinou bakterie (ANOVA,  $p = 0,668$ ,  $df = 2$ ).

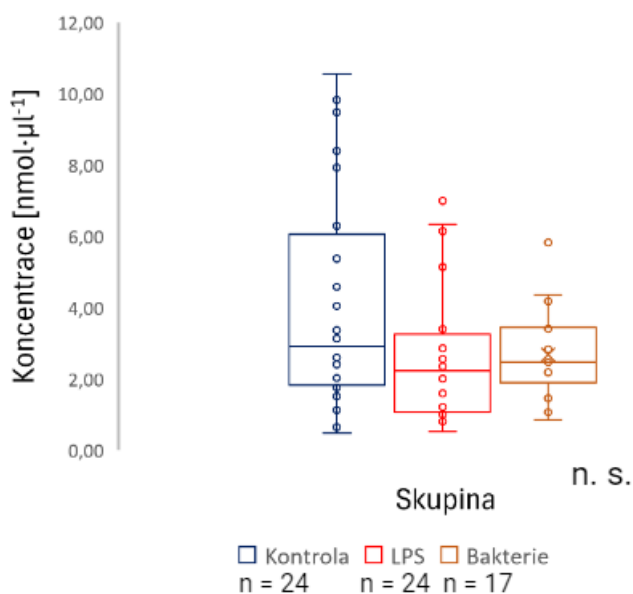
Po statistickém vyhodnocení zastoupení Aba ve vzorcích byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi skupinou LPS a kontrolou (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p = 0,007$ ,  $df = 2$ ), stejně tak mezi skupinou LPS a skupinou bakterie (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p = 0,018$ ,  $df = 2$ ). Mezi kontrolou a skupinou bakterie nebyly zjištěny významné rozdíly (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p = 0,746$ ,  $df = 2$ ). V případě Hym nebyly detekovány statisticky významné rozdíly mezi skupinou LPS a kontrolou (ANOVA,  $p = 0,191$ ,  $df = 2$ ), LPS a skupinou bakterie (ANOVA,  $p = 0,763$ ,  $df = 2$ ) ani kontrolou a skupinou bakterie (ANOVA,  $p = 0,538$ ,  $df = 2$ ).



Obr. 9: Relativní zastoupení (A) defensinu-1, (B) abaecinu, (C) hymenoptaecinu ve vzorcích hemolymfy včel. Svorky s hvězdičkami značí příslušné statisticky významné rozdíly mezi skupinami, n.s. označuje statisticky nevýznamné rozdíly mezi skupinami. n vyjadřuje počet biologických opakování.

### 4.3 Kvantifikace apidaecinu v hemolymfě úlových včel pomocí LC/MS

Výsledky měření apidaecinu v hemolymfě včel ukazují koncentraci peptidu ve třech experimentálních skupinách (Obr. 10). Hodnoty byly získány s využitím kalibrační křivky s lineární závislostí vyjádřenou rovnicí  $y = 0,7586x + 2,044$ ,  $R^2 = 0,99638$ . Statistickým vyhodnocením nebyly zjištěny významné rozdíly v množství apidaecinu mezi skupinou LPS a kontrolou (ANOVA,  $p = 0,126$ ,  $df = 2$ ), LPS a skupinou bakterie (ANOVA,  $p = 0,752$ ,  $df = 2$ ) ani kontrolou a skupinou bakterie (ANOVA,  $p = 0,529$ ,  $df = 2$ ).

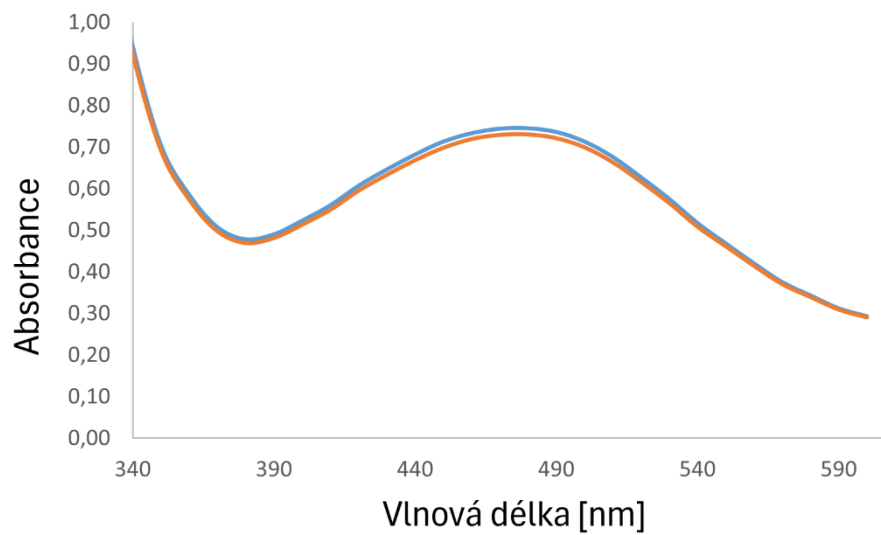


Obr. 10: Naměřené koncentrace apidaecinu v hemolymfě ve třech experimentálních skupinách. n.s. označuje statisticky nevýznamné rozdíly mezi skupinami. n vyjadřuje počet biologických opakování.

## 4.4 Optimalizace stanovení aktivity fenoloxidasy

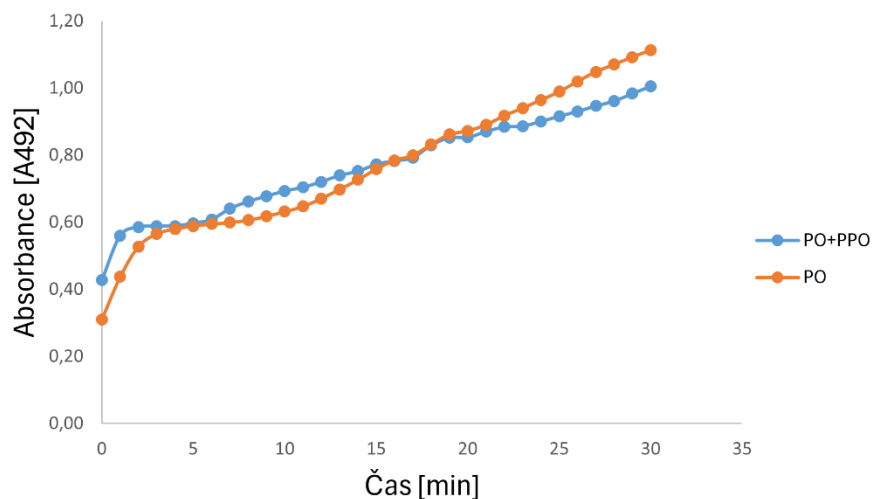
### 4.4.1 Optimalizace metody

Proměření absorpčního spektra produktu enzymové reakce fenoloxidasy udává jeho absorpční maximum 492 nm (Obr. 11).



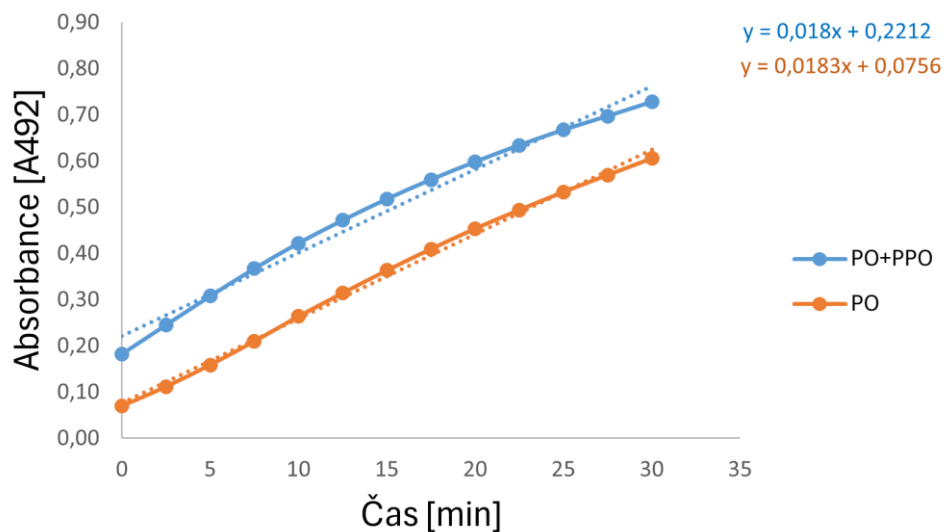
Obr. 11: Absorpční spektrum produktu reakce katalyzované fenoloxidasou ze substrátu L-DOPA.

Kinetický záznam průběhu enzymové reakce na počátku procesu optimalizace stanovení enzymové aktivity je vyjádřen rostoucí absorbcí vzorku s časem, nicméně variabilita rychlosti reakce neukazuje na stabilní přírůstek měřeného produktu, proto musel být postup měření optimalizován. (Obr. 12).



Obr. 12: Záznam kinetického měření aktivity fenoloxidas optimalizačního vzorku hemolymfy. Hodnoty absorbance byly získány zprůměrováním hodnot absorbancí při měření v duplikátu. PO+PPO vyjadřuje vzorek, ve kterém došlo k aktivaci profenoloxidas (PPO)  $\alpha$ -chymotrypsinem, PO vzorek, ve kterém byla měřena aktivita čisté fenoloxidas (PO).

Ukázka kinetického záznamu průběhu enzymové reakce po optimalizaci je vyjádřena rostoucí absorbancí optimalizačního vzorku čerstvé hemolymfy s časem (Obr. 13).

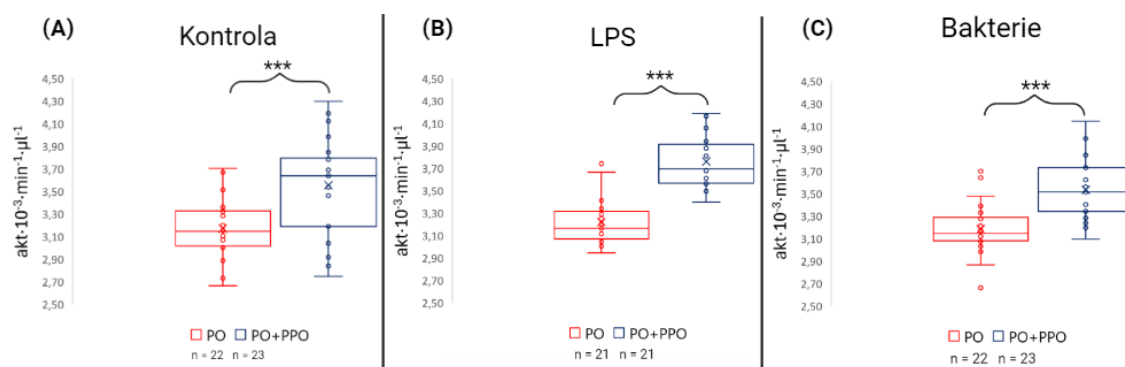


Obr. 13: Záznam kinetického měření aktivity fenoloxidasu optimalizačního vzorku hemolymfy. Hodnoty absorbance byly získány zprůměrováním hodnot absorbancí při měření v duplikátu. PO+PPO vyjadřuje vzorek, ve kterém došlo k aktivaci profenoloxidasu (PPO)  $\alpha$ -chymotrypsinem, PO vzorek, ve kterém byla měřena aktivita čisté fenoloxidasu (PO). Body byly proloženy přímkou, jejichž rovnice jsou barevně označeny v pravém horním rohu grafu.

#### 4.4.2 Stanovení aktivity fenoloxidasy v experimentálních vzorcích

Výsledky stanovení aktivity PO zobrazují relativní aktivitu tohoto enzymu v hemolymfě včel ve třech experimentálních skupinách, a to v případě stanovení aktivity čisté PO, stejně jako v případě aktivace PPO  $\alpha$ -chymotrypsinem (Obr. 14). Statistickým vyhodnocením dat nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v aktivitě PO mezi skupinou LPS a kontrolou (dvoucestná ANOVA,  $p = 0,985$ ,  $df = 2$ ), LPS a skupinou bakterie (dvoucestná ANOVA,  $p = 0,997$ ,  $df = 2$ ), ani skupinou bakterie a kontrolou (dvoucestná ANOVA,  $p = 1,000$ ,  $df = 2$ ). Stejně tak nebyly zjištěny rozdíly v aktivitě PO při aktivaci PPO mezi skupinou LPS a kontrolou (dvoucestná ANOVA,  $p = 0,144$ ,  $df = 2$ ), LPS a skupinou bakterie (dvoucestná ANOVA,  $p = 0,0124$ ,  $df = 2$ ) ani skupinou bakterie a kontrolou (dvoucestná ANOVA,  $p = 1,000$ ,  $df = 2$ ).

Po statistickém vyhodnocení byly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi aktivitou samotné PO a PO po aktivaci PPO  $\alpha$ -chymotrypsinem v jednotlivých experimentálních skupinách, konkrétně v kontrolní skupině (dvoucestná ANOVA,  $p < 0,001$ ,  $df = 2$ ), skupině LPS (dvoucestná ANOVA,  $p < 0,001$ ,  $df = 2$ ) i skupině bakterie (dvoucestná ANOVA,  $p < 0,001$ ,  $df = 2$ ).



Obr. 14: Relativní aktivita fenoloxidasy (PO) ve třech experimentálních skupinách, (A) kontrolní skupině, (B) skupině LPS, (C) skupině bakterie. PO+PPO vyjadřuje vzorky, ve kterých došlo k aktivaci profenoloxidasy (PPO)  $\alpha$ -chymotrypsinem, PO vzorky, ve kterých byla měřena aktivita čisté fenoloxidasy (PO). Svorky s hvězdičkami značí příslušné statisticky významné rozdíly mezi skupinami. n vyjadřuje počet biologických opakování.



## **5 DISKUZE**

### **5.1 Ověření účinnosti protilátek proti antimikrobiálním peptidům metodou Western blot**

Protilátky jsou hojně používané nástroje nejen v oblasti výzkumu, rutině se s nimi pracuje v rámci Western blotu, metody ELISA či např. imunohistochemie. Pro používání protilátky je důležitá její validace, čímž se rozumí ověření, že je protilátka specifická, selektivní a reprodukovatelná pro námi potřebné metody (Bordeaux et al., 2010).

V rámci provedení Western blotu byla ověřena specifičnost protilátek proti Def a Aba získáním konkrétního bandu, který molekulovou hmotností odpovídal cílenému peptidu, a to ve vzorku standardu či imunizované včely, případně peptidu kaplovanému s BSA. Nejprve bylo přistoupeno k testování frakce 1.1 protilátek. V případě Def nebyla detekce peptidu úspěšná (Obr. 6), jelikož nebyl detekován hledaný peptid v žádném vzorku hemolymfy imunizovaných včel. V případě Aba bylo testování frakce úspěšné (Obr. 7), band odpovídající peptidu byl pozorovatelný u dvou koncentrovanějších vzorků. Peptid nebyl dle předpokladu detekován v hemolymfě mladušek, které bez stimulace patogenem mnoho AmP neprodukují, stejně jako v případě neimunizovaných včel (Wilson-Rich et al., 2008).

Úspěšnější bylo testování frakce 1.6 protilátky proti Def (Obr. 8), kdy již byly pozorovatelné hledané bandy, mj. byl pozorován také band, který by molekulovou hmotností mohl odpovídat Def navázanému na Vg (180 kDa). Díky výsledkům mohla být protilátka použita v dalších experimentech. Specifičnost protilátky může být potvrzena s využitím laserové ionizace za účasti matrice (MALDI) MS.

### **5.2 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů metodou ELISA**

#### **5.2.1 Ověření účinnosti a správnosti metody proměřením optimalizačních vzorků**

Jak uvádí Bordeaux et al. (2010), je potřeba ověřit, že protilátky fungují správně ve všech námi používaných metodách. Proto byly protilátky a metoda nejprve vyzkoušeny na vzorcích blanku (coating pufr), standardech epitopů AmP, BSA a vzorcích hemolymfy mladušek. Standardy epitopů byly kaplovány s BSA pro imunizaci produkčního zvířete – králíka.

Jak uvádí Tab. 2, hodnota absorbance v případě blanku byla nízká, těmito hodnotám odpovídala také absorbance samotného BSA, čímž byla dokázána specifická vazba

protilátky na epitop peptidu, a ne na samotné BSA. Absorbance byla úměrná zvyšující se koncentraci standardů. Oproti očekávání byla naměřena vyšší absorbance u vzorků mladušek. Např. studie Bulla et al. (2012) však uvádí intenzivní imunitní odpověď mladušek při napadení patogenem. Mladušky tak maskují svou zvýšenou citlivost k nákaze. Lze proto předpokládat, že použité mladušky byly v době odběru napadeny patogenem.

### **5.2.2 Imunochemická detekce antimikrobiálních peptidů v experimentálních vzorcích**

Metodou ELISA bylo sledováno relativní zastoupení tří AmP ve vzorcích včelí hemolymfy. Jak vyplývá z výsledků (Obr. 9), u vzorků skupiny, která byla krmena směsí inaktivovaných bakterií nedošlo ke statisticky významně zvýšené produkci žádného z AmP vzhledem ke kontrole. Je možné, že byla koncentrace bakterií příliš nízká, nebo že krmení inaktivovanými bakteriemi není dostatečný stimul pro aktivaci imunitní odezvy v hemolymfě. Ve studii Dostálkové et al. (2021), byl pro imunizaci použit stejný mix bakterií o shodné koncentraci, imunizace však proběhla injekcí bakterií do hemolymfy. Ve zmíněné studii k indukci produkce AmP došlo, což ukazuje rozdílnost možných cest imunizace, tedy imunizace krmením či injekcí.

V případě skupiny, která byla krmena LPS došlo ke statisticky významně vyšší produkci Def oproti kontrole. LPS je nereplikující se stimulant imunitního systému, jeho vliv na indukci produkce Def při imunizaci krmením byl popsán např. ve studii Richarda et al. (2008). Oproti tomu však došlo k významně nižší produkci Aba. Produkci tohoto peptidu indukují G<sup>+</sup> bakterie, jeho produkce v případě použití fragmentu bakteriální stěny G<sup>-</sup> bakterií proto nebyla očekávána. Zajímavým výsledkem je statisticky nevýznamná produkce Hym. Tento AmP je nejčastěji produkován pomocí Imd signální dráhy, je proto možné, že v tomto případě došlo ke spuštění drah jiných, např. Toll, které vedly pouze k produkci Def. Na tento experiment by bylo vhodné navázat experimenty dalšími, kdy by kromě imunitní odezvy v hemolymfě byla pro lepší pochopení orální imunizace sledována imunitní odezva v jednotlivých tělních tkáních se zaměřením na střevní imunitu.

### **5.3 Kvantifikace apidaecinu v hemolymfě úlových včel pomocí LC/MS**

Pomocí LC/MS byla provedena absolutní kvantifikace AmP apidaecinu v hemolymfě včel. Jak vyplývá z výsledků (Obr. 10), v žádné z experimentálních skupin nedošlo ke statisticky významné změně v produkci tohoto peptidu. Výsledky značí, že stejně jako

v případě peptidů sledovaných metodou ELISA, ani zde nebyla imunizace krmením inaktivovanými bakteriemi dostatečná pro indukci produkce AmP. Výsledky také ukazují, že ani LPS neindukuje produkci tohoto peptidu.

Naměřené hodnoty ve všech skupinách odpovídají hodnotám, které byly získány např. ve studii Danihlíka et al. (2014), kde byla měřena koncentrace apidaecinu v neimunizovaných úlových včelách. Zajímavým zjištěním je vysoká variabilita hodnot v kontrolní skupině, což značí všeobecnou biologickou variabilitu.

## **5.4 Optimalizace stanovení aktivity fenoloxidasy**

### **5.4.1 Optimalizace metody**

Pro měření aktivity PO bylo nejprve proměřeno absorpční spektrum produktu, dopachromu, pro určení vhodné vlnové délky pro kinetické měření. Většina dřívějších experimentů, např. Laughton a Siva-Jothy (2011b), měřila při 492 nm, existují však i takové, např. studie Deckera a Rimkeho (1998), kdy bylo měřeno při 475 nm. Z absorpčního spektra (Obr. 11) bylo potvrzeno absorpční maximum při 492 nm, následná kinetická měření proto vždy probíhala při této vlnové délce.

Při optimalizaci metody, tedy volbě vhodného poměru vzorek:pufr, koncentrace  $\alpha$ -chymotrypsinu, čase inkubace či koncentrace DOPA bylo vycházeno ze studie Laughton a Siva-Jothy (2011b). Oproti původní studii však byla za ideální koncentraci  $\alpha$ -chymotrypsinu určena koncentrace  $5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Výsledkem byla úspěšná optimalizace, kdy byla z nestabilního přírůstku produktu a příliš prudkého nárůstu absorbance (Obr. 12.) získána lineárnější křivka kinetického měření (Obr. 13), z jejíž směrnice lze určit relativní aktivitu enzymu v  $\mu\text{l}$  hemolymfy. Směrnice rovnice pro vzorek, ve kterém došlo k aktivaci PPO by měla být vyšší než v případě, kdy k aktivaci nedošlo. To v případě optimalizačních vzorků nenastalo, což lze vysvětlit tím, že byly použity čerstvě vylíhnuté jarní včely. U včel zahrnutých v imunizačním experimentu již vychází vyšší aktivita PO po aktivaci jejího zymogenu  $\alpha$ -chymotrypsinem.

### **5.4.2 Stanovení aktivity fenoloxidasy v experimentálních vzorcích**

Zymogen PPO je aktivován, jakmile je v hemolymfě detekováno cizí těleso, což vede k zahájení procesu melanizace, pro který je činnost PO nutná (Wilson-Rich et al., 2008). Při orální imunizaci proto nebyl předpoklad nárůstu aktivity PO v imunizovaných včelách. To také potvrdily výsledky experimentu (Obr. 14), kdy nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly mezi skupinami. Byly však zjištěny rozdíly mezi vzorky, kde byla stanovována aktivita čisté PO a vzorky, kde došlo k aktivaci PPO pomocí

$\alpha$ -chymotrypsinu, což značí, že v letních včelách dochází k úspěšné aktivaci proenzymu PPO tímto proteolytickým enzymem. Jednalo se o vzorky lyofilizované zamražené hemolymfy, což pro další experimenty dává možnost zpracovávat zamražený materiál.

## 6 ZÁVĚR

V rámci teoretické části diplomové práce byly zpracovány literární rešerše se zaměřením na imunitní systém hmyzu, konkrétně včely medonosné a její obranné reakce proti mikrobiálním a virovým patogenům, nejčastější nákazy včel a generace včel vyskytující se ve včelstvu a jejich imunitní systém.

V rámci experimentální části byla optimalizována a aplikována metoda imunochemické detekce antimikrobiálních peptidů v hemolymfě včel. Experimenty byly potvrzen rozdíly v aktivaci imunitního systému používanými imunizačními přístupy. Orální imunizace inaktivovanými bakteriemi nebyla dostatečná k indukci imunitní odpovědi, oproti tomu krmení fragmentem bakteriální buněčné stěny, LPS, vedlo k indukci produkce defensinu-1.

Byla optimalizována metoda měření aktivity fenoloxidasy v hemolymfě včel, včetně experimentu zahrnujícího aktivaci neaktivního proenzymu proteolytickým enzymem  $\alpha$ -chymotrypsinem. Byla potvrzena možnost stanovit aktivitu enzymu v zamražených vzorcích lyofilizované hemolymfy. Výsledky stanovení aktivity fenoloxidasy ve vzorcích hemolymfy včel, které byly orálně imunizovány neprokázaly zvýšenou aktivitu enzymu v imunizovaných včelách.

## 7 LITERATURA

- Al-Ghamdi, A., Al-Ghamdi, M., Ahmed, A., Mohamed, A., Shaker, G., Ansari, M., Dorrah, M., Khan, K., & Ayaad, T. (2021). Immune investigation of the honeybee *Apis mellifera jemenitica* broods: A step toward production of a bee-derived antibiotic against the American foulbrood. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(3), 1528-1538. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.12.026>
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., & Le Conte, Y. (2010). Diet effects on honeybee immunocompetence. *Biology Letters*, 6(4), 562-565. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0986>
- Ahmad, S., Khan, S. A., Khan, K. A., & Li, J. (2021). Novel Insight Into the Development and Function of Hypopharyngeal Glands in Honey Bees. *Frontiers in Physiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.615830>
- Antúnez, K., Anido, M., Branchiccela, B., Harriet, J., Campa, J., Invernizzi, C., Santos, E., Higes, M., Martín-Hernández, R., & Zunino, P. (2015). Seasonal Variation of Honeybee Pathogens and its Association with Pollen Diversity in Uruguay. *Microbial Ecology*, 70(2), 522-533. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0594-7>
- Arrese, E. L., & Soulages, J. L. (2010). Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Annual Review of Entomology*, 55(1), 207-225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>
- Bailey, L. (1965). Paralysis of the honey bee, *Apis mellifera* Linnaeus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 7(2), 132-140. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(65\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0022-2011(65)90024-8)
- Bailey, L., Ball, B. V., & Perry, J. N. (1983). Association of viruses with two protozoal pathogens of the honey bee. *Annals of Applied Biology*, 103(1), 13-20. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1983.tb02735.x>
- Barribeau, S. M., Schmid-Hempel, P., Sadd, B. M., & Fugmann, S. D. (2016). Royal Decree: Gene Expression in Trans-Generationally Immune Primed Bumblebee Workers Mimics a Primary Immune Response. *PLOS ONE*, 11(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159635>
- Becchimanzi, A., Tatè, R., Campbell, E., Gigliotti, S., Bowman, A., Pennacchio, F., & Foster, L. (2020). A salivary chitinase of *Varroa destructor* influences host immunity and mite's survival. *PLOS Pathogens*, 16(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009075>
- Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H., & Nowotny, N. (2006). Occurrence of Six Honeybee Viruses in Diseased Austrian Apiaries. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), 2414-2420. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.4.2414-2420.2006>
- Bergin, D., Murphy, L., Keenan, J., Clynes, M., & Kavanagh, K. (2006). Pre-exposure to yeast protects larvae of *Galleria mellonella* from a subsequent lethal infection by *Candida albicans* and is mediated by the increased expression of antimicrobial peptides. *Microbes and Infection*, 8(8), 2105-2112. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.03.005>
- Bordeaux, J., Welsh, A. W., Agarwal, S., Killiam, E., Baquero, M. T., Hanna, J. A., Anagnostou, V. K., & Rimm, D. L. (2010). Antibody validation. *BioTechniques*, 48(3), 197-209. <https://doi.org/10.2144/000113382>
- Buchon, N., Silverman, N., & Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster* — from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature Reviews Immunology*, 14(12), 796-810. <https://doi.org/10.1038/nri3763>
- Bull, J. C., Ryabov, E. V., Prince, G., Mead, A., Zhang, C., Baxter, L. A., Pell, J. K., Osborne, J. L., Chandler, D., & Schneider, D. S. (2012). A Strong Immune Response in Young Adult Honeybees Masks Their Increased Susceptibility to Infection Compared to Older Bees. *PLoS Pathogens*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003083>
- Butolo, N. P., Azevedo, P., Alencar, L. D., Malaspina, O., & Nocelli, R. C. F. (2021). Impact of low temperatures on the immune system of honeybees. *Journal of Thermal Biology*, 101. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2021.103082>
- Cerenius, L., & Soderhall, K. (2004). The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews*, 198(1), 116-126. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00116.x>
- Colinet, D., Dubuffet, A., Cazes, D., Moreau, S., Drezen, J. -M., & Poirié, M. (2009). A serpin from the parasitoid wasp *Leptopilina boulardi* targets the *Drosophila* phenoloxidase

- cascade. *Developmental & Comparative Immunology*, 33(5), 681-689. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2008.11.013>
- Cornman, R. S., Lopez, D., Evans, J. D., & Pas, M. F. W. te. (2013). Transcriptional Response of Honey Bee Larvae Infected with the Bacterial Pathogen *Paenibacillus larvae*. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065424>
- Corona, M., Velarde, R. A., Remolina, S., Moran-Lauter, A., Wang, Y., Hughes, K. A., & Robinson, G. E. (2007). Vitellogenin, juvenile hormone, insulin signaling, and queen honey bee longevity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 7128-7133. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701909104>
- Danihlík, J., Šebela, M., Petřivalský, M., & Lenobel, R. (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. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.041>
- Danihlík, J., Aronstein, K., & Petřivalský, M. (2016). Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 123-136. <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>
- de Miranda, J., & Fries, I. (2008). Venereal and vertical transmission of deformed wing virus in honeybees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(2), 184-189. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.02.004>
- de Miranda, J., & Genersch, E. (2010). Deformed wing virus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S48-S61. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.012>
- Decker, H., & Rimke, T. (1998). Tarantula Hemocyanin Shows Phenoloxidase Activity. *Journal of Biological Chemistry*, 273(40), 25889-25892. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.40.25889>
- DeGrandi-Hoffman, G., & Chen, Y. (2015). Nutrition, immunity and viral infections in honey bees. *Current Opinion in Insect Science*, 10, 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.05.007>
- Dittes, J., Schäfer, M., Aupperle-Lellbach, H., Mülling, C., & Emmerich, I. (2020). Overt Infection with Chronic Bee Paralysis Virus (CBPV) in Two Honey Bee Colonies. *Veterinary Sciences*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/vetsci7030142>
- Dostálková, S., Dobeš, P., Kunc, M., Hurychová, J., Škrabišová, M., Petřivalský, M., Titěra, D., Havlík, J., Hyršl, P., & Danihlík, J. (2021). Winter honeybee (*Apis mellifera*) populations show greater potential to induce immune response than summer ones after immune stimuli. *Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1242/jeb.232595>
- Erlor, S., Popp, M., Lattorff, H., & Cordaux, R. (2011). Dynamics of Immune System Gene Expression upon Bacterial Challenge and Wounding in a Social Insect (*Bombus terrestris*). *PLoS ONE*, 6(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018126>
- Evans, J. D. (2004). Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(2), 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.02.004>
- Evans, J., Aronstein, K., Chen, Y., Hetru, C., Imler, J., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G., Zou, Z., & Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 645-656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>
- Evans, J. D., & Spivak, M. (2010). Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S62-S72. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.019>
- Forsgren, E., Locke, B., Sircoulomb, F., & Schäfer, M. O. (2018). Bacterial Diseases in Honeybees. *Current Clinical Microbiology Reports*, 5(1), 18-25. <https://doi.org/10.1007/s40588-018-0083-0>
- Fünfhaus, A., Ebeling, J., & Genersch, E. (2018). Bacterial pathogens of bees. *Current Opinion in Insect Science*, 26, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.008>
- Galajda, R., Valenčáková, A., Sučík, M., & Kandráčová, P. (2021). Nosema Disease of European Honey Bees. *Journal of Fungi*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/jof7090714>
- Genersch, E. (2010). Honey bee pathology: current threats to honey bees and beekeeping. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(1), 87-97. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2573-8>

- González-Santoyo, I., & Córdoba-Aguilar, A. (2012). Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, *142*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2011.01187.x>
- Grace, T. D. C. (1969). Insect Tissue Culture and Its Use in Virus Research. In *Advances in Virus Research Volume 14* (pp. 201-220). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60560-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60560-6)
- Han, B., Wu, J., Wei, Q., Liu, F., Cui, L., Rueppell, O., & Xu, S. (2024). Life-history stage determines the diet of ectoparasitic mites on their honey bee hosts. *Nature Communications*, *15*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-44915-x>
- Harwood, G., Amdam, G., & Freitak, D. (2019). The role of Vitellogenin in the transfer of immune elicitors from gut to hypopharyngeal glands in honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, *112*, 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2018.12.006>
- Hernández López, J., Schuehly, W., Crailsheim, K., & Riessberger-Gallé, U. (2014). Trans-generational immune priming in honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *281*(1785). <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0454>
- Chan, Q., Melathopoulos, A., Pernal, S., & Foster, L. (2009). The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *BMC Genomics*, *10*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-387>
- Charles, H., & Killian, K. (2015). Response of the insect immune system to three different immune challenges. *Journal of Insect Physiology*, *81*, 97-108. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.005>
- Chen, K., & Lu, Z. (2018). Immune responses to bacterial and fungal infections in the silkworm, *Bombyx mori*. *Developmental & Comparative Immunology*, *83*, 3-11. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.12.024>
- Chen, Y., Evans, J., & Feldlaufer, M. (2006a). Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *92*(3), 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.03.010>
- Chen, Y. P., Pettis, J. S., Collins, A., & Feldlaufer, M. F. (2006b). Prevalence and Transmission of Honeybee Viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*(1), 606-611. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.606-611.2006>
- Chen, Y., & Siede, R. (2007). Honey Bee Viruses. In *Advances in Virus Research Volume 70* (pp. 33-80). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(07\)70002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(07)70002-7)
- Jiang, H., & Kanost, M. R. (1997). Characterization and Functional Analysis of 12 Naturally Occurring Reactive Site Variants of Serpin-1 from *Manduca sexta*. *Journal of Biological Chemistry*, *272*(2), 1082-1087. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.2.1082>
- Kingsolver, M., Huang, Z., & Hardy, R. (2013). Insect Antiviral Innate Immunity: Pathways, Effectors, and Connections. *Journal of Molecular Biology*, *425*(24), 4921-4936. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.006>
- Klaudiny, J., Albert, Š., Bachanová, K., Kopernický, J., & Šimúth, J. (2005). Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *35*(1), 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.09.007>
- Kunc, M., Dobeš, P., Hurychová, J., Vojtek, L., Poiani, S. B., Danihlík, J., Havlík, J., Titěra, D., & Hyršl, P. (2019). The Year of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) with Respect to Its Physiology and Immunity: A Search for Biochemical Markers of Longevity. *Insects*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/insects10080244>
- Kwong, W. K., Mancenido, A. L., & Moran, N. A. (2017). Immune system stimulation by the native gut microbiota of honey bees. *Royal Society Open Science*, *4*(2). <https://doi.org/10.1098/rsos.170003>
- Laughton, A., Boots, M., & Siva-Jothy, M. (2011a). The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology*, *57*(7), 1023-1032. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.04.020>
- Laughton, A. M., & Siva-Jothy, M. T. (2011b). A standardised protocol for measuring phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, *42*(2), 140-149. <https://doi.org/10.1051/apido/2010046>



- Lindström, A., Korpela, S., & Fries, I. (2008). Horizontal transmission of *Paenibacillus* larvae spores between honey bee (*Apis mellifera*) colonies through robbing. *Apidologie*, *39*(5), 515-522. <https://doi.org/10.1051/apido:2008032>
- Lourenço, A. P., Martins, J. R., Torres, F. A. S., Mackert, A., Aguiar, L. R., Hartfelder, K., Bitondi, M. M. G., & Simões, Z. L. P. (2019). Immunosenescence in honey bees (*Apis mellifera* L.) is caused by intrinsic senescence and behavioral physiology. *Experimental Gerontology*, *119*, 174-183. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2019.02.005>
- Matović, K., Žarković, A., Debeljak, Z., Vidanović, D., Vasković, N., Tešović, B., & Ćirić, J. (2023). American Foulbrood—Old and Always New Challenge. *Veterinary Sciences*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/vetsci10030180>
- McMenamin, A., Daughenbaugh, K., Parekh, F., Pizzorno, M., & Flenniken, M. (2018). Honey Bee and Bumble Bee Antiviral Defense. *Viruses*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/v10080395>
- Nazzi, F., & Le Conte, Y. (2016). Ecology of *Varroa destructor*, the Major Ectoparasite of the Western Honey Bee, *Apis mellifera*. *Annual Review of Entomology*, *61*(1), 417-432. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010715-023731>
- Paradkar, P. N., Trinidad, L., Voysey, R., Duchemin, J. -B., & Walker, P. J. (2012). Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(46), 18915-18920. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205231109>
- Procházková, M., Škubník, K., Füzik, T., Mukhamedova, L., Přidal, A., & Plevka, P. (2020). Virion structures and genome delivery of honeybee viruses. *Current Opinion in Virology*, *45*, 17-24. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.06.007>
- Ramsey, S., Gulbranson, C. J., Mowery, J., Ochoa, R., vanEngelsdorp, D., & Bauchan, G. (2018). A Multi-Microscopy Approach to Discover the Feeding Site and Host Tissue Consumed by *Varroa destructor* on Host Honey Bees. *Microscopy and Microanalysis*, *24*(S1), 1258-1259. <https://doi.org/10.1017/S1431927618006773>
- Ramsey, S. D., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J. D., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J. M., Ellis, J. D., Hawthorne, D., & vanEngelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(5), 1792-1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>
- Raymann, K., Shaffer, Z., Moran, N. A., & Gore, J. (2017). Antibiotic exposure perturbs the gut microbiota and elevates mortality in honeybees. *PLOS Biology*, *15*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001861>
- Raymann, K., & Moran, N. A. (2018). The role of the gut microbiome in health and disease of adult honey bee workers. *Current Opinion in Insect Science*, *26*, 97-104. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.02.012>
- Richard, F. -J., Aubert, A., & Grozinger, C. M. (2008). Modulation of social interactions by immune stimulation in honey bee, *Apis mellifera*, workers. *BMC Biology*, *6*(1). <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-50>
- Robinson, G. E. (1992). Regulation of Division of Labor in Insect Societies. *Annual Review of Entomology*, *37*(1), 637-665. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.003225>
- Rosales, C. (2017). Cellular and Molecular Mechanisms of Insect Immunity. In V. Shields (ed.), V. Shields, *Insect Physiology and Ecology*. InTech. <https://doi.org/10.5772/67107>
- Sadd, B. M., & Schmid-Hempel, P. (2006). Insect Immunity Shows Specificity in Protection upon Secondary Pathogen Exposure. *Current Biology*, *16*(12), 1206-1210. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.04.047>
- Salmela, H., Amdam, G. V., Freitag, D., & Schneider, D. S. (2015). Transfer of Immunity from Mother to Offspring Is Mediated via Egg-Yolk Protein Vitellogenin. *PLOS Pathogens*, *11*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005015>
- Shen, M., Cui, L., Ostiguy, N., & Cox-Foster, D. (2005). Intricate transmission routes and interactions between picorna-like viruses (Kashmir bee virus and sacbrood virus) with the honeybee host and the parasitic varroa mite. *Journal of General Virology*, *86*(8), 2281-2289. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80824-0>

- Sheehan, G., Farrell, G., & Kavanagh, K. (2020). Immune priming: the secret weapon of the insect world. *Virulence*, *11*(1), 238-246. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1731137>
- Spurny, R., Přidal, A., Pálková, L., Kiem, H., de Miranda, J., Plevka, P., & Williams, B. (2017). Virion Structure of Black Queen Cell Virus, a Common Honeybee Pathogen. *Journal of Virology*, *91*(6), e02100-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.02100-16>
- Stączek, S., Zdybicka-Barabas, A., Pleszczyńska, M., Wiater, A., & Cytryńska, M. (2020). *Aspergillus niger*  $\alpha$ -1,3-glucan acts as a virulence factor by inhibiting the insect phenoloxidase system. *Journal of Invertebrate Pathology*, *171*. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2020.107341>
- Steinmann, N., Corona, M., Neumann, P., Dainat, B., & Martin, S. J. (2015). Overwintering Is Associated with Reduced Expression of Immune Genes and Higher Susceptibility to Virus Infection in Honey Bees. *PLOS ONE*, *10*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129956>
- Tantillo, G., Bottaro, M., Di Pinto, A., Martella, V., Di Pinto, P., & Terio, V. (2015). Virus infections of honeybees *Apis Mellifera*. *Italian Journal of Food Safety*, *4*(3). <https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.5364>
- Tehel, A., Streicher, T., Tragust, S., & Paxton, R. J. (2020). Experimental infection of bumblebees with honeybee-associated viruses: no direct fitness costs but potential future threats to novel wild bee hosts. *Royal Society Open Science*, *7*(7). <https://doi.org/10.1098/rsos.200480>
- Tehel, A., Streicher, T., Tragust, S., & Paxton, R. J. (2022). Experimental cross species transmission of a major viral pathogen in bees is predominantly from honeybees to bumblebees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *289*(1969). <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.2255>
- Tsakas, S., & Marmara, V. J. (2010). Insect immunity and its signaling: an overview. *ISJ-Invertebrate Survival Journal*, *7*, 228-238. [https://www.researchgate.net/publication/47565279\\_Insect\\_immunity\\_and\\_its\\_signaling\\_an\\_overview](https://www.researchgate.net/publication/47565279_Insect_immunity_and_its_signaling_an_overview)
- Ullah, A., Tlak Gajger, I., Majoros, A., Dar, S., Khan, S., Kalimullah, ., Haleem Shah, A., Nasir Khabir, M., Hussain, R., Khan, H., Hameed, M., & Anjum, S. (2021). Viral impacts on honey bee populations: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *28*(1), 523-530. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.10.037>
- Wei, R., Cao, L., Feng, Y., Chen, Y., Chen, G., & Zheng, H. (2022). Sacbrood Virus: A Growing Threat to Honeybees and Wild Pollinators. *Viruses*, *14*(9). <https://doi.org/10.3390/v14091871>
- Wilson-Rich, N., Dres, S. T., & Starks, P. T. (2008). The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, *54*(10-11), 1392-1399. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>
- Zeng, T., Jaffar, S., Xu, Y., & Qi, Y. (2022). The Intestinal Immune Defense System in Insects. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(23). <https://doi.org/10.3390/ijms232315132>

## 8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	akrylamid
Aba	abaecin
ABPV	virus akutní paralýzy včel
AFB	mor včelího plodu
ALP	alkalická fosfatasa
AmP	antimikrobiální peptid/y
Arg	argonaut
bAA	N,N'-methylen-bisakrylamid
BCIP	5-brom-4-chlor-3-indoylfosfát
BQCV	virus černání matečnicků
BSA	hovězí sérový albumin
CBPV	virus chronické paralýzy včel
cDNA	komplementární DNA
Def	defensin-1
dH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
Dome	receptor „Domeless“
DOPA	3-(3,4-dihydroxyfenyl)-L-alanin
dsRNA	dvouvláknová RNA
Duox	dvojitá oxidasa
DWV	virus deformovaných křídel
EFB	hniloba včelího plodu
ESI	ionizace elektrosprejem
ET	protein „Eye transformer“
G <sup>-</sup>	gramnegativní
G <sup>+</sup>	grampozitivní
GOX	glukosaoxidasa
hop	JAK „hopscotch“
HRP	křenová peroxidasa
Hym	hymenoptaecin
Imd	dráha imunitní nedostatečnosti

JAK(s)	Janus kinasa/y
JAK-STAT	Janus kinasa-převodník signálu a aktivátor transkripce
JH	juvenilní hormon
KBV	Kašmírský včelí virus
LGRP	LPS-rozpoznávající protein
LPS	lipopolysacharid
MALDI	laserová ionizace za účasti matrice
NBT	nitrotetrazoliová modř
NF- $\kappa$ B	transkripční faktor kappa B
PAMPs	molekulární struktury typické pro patogeny
PGRPs	PGs rozpoznávající proteiny
PGs	peptidoglykany
PO	fenoloxidasa
PPAE	profenoloxidasu aktivující enzym
proPO	profenoloxidasu
PRR	motivy rozpoznávající receptory
Q	kvadrupólový analyzátor
RdRP	RNA-dependentní-RNA polymeráza
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	dráha RNA interference
ROS	reaktivní formy kyslíku
SBV	virus pytlíčkovitého plodu
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
SH2	domény „Src-homology“ 2
siRNAs	malé interferující RNA
SPH	homology serinových proteas
ssRNA	jednovláknová RNA
STATs	transkripční faktory převodníků signálu a aktivátorů transkripce
TEMED	N,N'-tetramethylethylendiamin
TFA	kyselina trifluoroctová
TGIP	transgenerační immune priming
TMB	3,3',5,5'-tetramethylenbenzidin

TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
upd	cytokinům podobné molekuly „unpaired“ 1-3
Vg	vitellogenin
VSV	virus vezikulární stomatidy
βGRP	β-glukan rozpoznávající receptory