

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Studie antimikrobiálního účinku včelího jedu na druhy borelie z komplexu
B. burgdorferi sensu lato: izolace genu kódujícího antimikrobiální peptid
melitin z jedové žlázy včely medonosné (*Apis mellifera*)**

Bakalářská práce

Marie Davidová

Školitelka: Maryna Golovchenko, MSc.

Vedoucí práce: Nataliia Rudenko, Ph.D.

Fakultní garant: Prof. RNDr. Libor Grubhoffer CSc.

České Budějovice 2016

Davidová M., 2016: Studie antimikrobiálního účinku včelího jedu na druhy borelie z komplexu *B. burgdorferi* sensu lato: izolace genu kódujícího antimikrobiální peptid melitin z jedové žlázy včely medonosné (*Apis mellifera*). [Study of antimicrobial effect of bee venom on borrelia species from *B. burgdorferi* sensu lato complex: isolation of gene encoding antimicrobial melittin peptide from venom gland of honey bee (*Apis mellifera*). Bc. Thesis, in Czech.] – 34. p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Bakalářská práce byla financována z grantu FP7 projekt ANTIGONE, projektové číslo 278976.

Anotace:

The incidence of tick – borne diseases has drastically increased over the past few years. Control of tick – borne pathogens, especially spirochetes from *B. burgdorferi* sensu lato complex, is complicated due to a lack of vaccines against them. The emergence of bacterial strains to well established and widely used antibiotics has become a serious public – health concern. Analysis of new classes of antimicrobial peptides became the subject of new investigation due to their efficacy against disease – causing pathogens. Among possible candidates, melittin from honey bee venom is of particular interest. The aim of this work was to study the effect of whole bee venom on Lyme borreliosis spirochetes. The minimum concentration of the venom that possessed the inhibitory effect on borrelia growth was identified. The gene encoding melittin was isolated from bee venom gland and recombinant melittin was produced in bacterial expression system. The effect of recombinant melittin on live borrelia culture was studied.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 22. 4. 2016

.....

Marie Davidová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Maryně Golovchenko MSc. a vedoucí práce Natalii Rudenko Ph.D. za cenné rady, obrovskou trpělivost a podporu při vypracování této bakalářské práce. Na tomto místě bych také ráda poděkovala paní Heleně Langhansové, RNDr. Lucii Tiché a Bc. Nelly Keplové za pomoc a ochotu při realizaci některých laboratorních metod.

V neposlední řadě děkuji svým rodičům za porozumění a všestrannou podporu.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. <i>Apis mellifera</i>	1
1.1.1. Taxonomie včely medonosné	1
1.1.2. Včela medonosná.....	1
1.2. Jedová žláza včely medonosné	2
1.3. Včelí jed.....	3
1.3.1. Biologické účinky složek včelího jedu: aplikace v lékařství.....	4
1.4. Melitin	5
1.5. Lymfská borelióza a její původci.....	6
1.5.1. Borelie	6
1.5.2. Druhy borelií.....	7
2. Cíl práce	8
3. Materiály a metody	9
3.1. Použité materiály a chemikálie.....	9
3.2. Metody.....	12
3.2.1. Izolace RNA z jedové žlázy včely medonosné	12
3.2.2. Syntéza jednovláknové cDNA.....	12
3.2.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	12
3.2.4. Purifikace PCR produktu.....	13
3.2.5. Klonování PCR produktu do vektoru PCR [®] 4- TOPO	13
3.2.6. Transformace One Shot TOP 10 <i>E. coli</i> kompetentních buněk	13
3.2.7. Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu (screening).....	13
3.2.8. Klonování PCR produktu do expresního vektoru Champion pET 101/D- TOPO [®]	14
3.2.9. Produkce rekombinantního proteinu	14
3.2.10. SDS – PAGE	14
3.2.11. Western Blot a detekce rekombinantního proteinu	15
3.2.12. Částečná „purifikace“ (rozdělení) buněčného lyzátu na koloně.....	15
3.2.13. Stanovení koncentrace rekombinantního proteinu podle Bradfordovy metody	15

3.2.14.	Příprava BSK – II media pro kultivace borelie	16
3.2.15.	Kultivace borelie.....	16
3.2.16.	Mikroskopie temného pole a počítání spirochét.....	17
3.2.17.	Měření působení včelího jedu na borelie.....	17
3.2.18.	Průtoková cytometrie.....	17
4.	Výsledky	18
4.1.	Pitvání jedové žlázy včely	18
4.2.	Izolace RNA a syntéza cDNA	18
4.3.	PCR.....	18
4.4.	Produkce rekombinantního konstrukt.....	20
4.5.	Exprese rekombinantního proteinu: Western Blot analýza	21
4.6.	Částečná „purifikace“ (rozdělení) hrubého lyzátu na koloně	22
4.7.	Měření koncentrace částečně „purifikovaného“ rekombinantního proteinu	22
4.8.	Vliv nativního včelího jedu na spirochéty <i>B. afzelii</i> , kmen CB 43.	22
4.9.	Ověření účinku částečně „purifikovaného“ rekombinantního melitinu na borelie	23
5.	Diskuze	24
6.	Závěr.....	29
7.	Literatura	30

1. Úvod

Zástupci rodu *Apis* se hojně vyskytují po celém světě a jsou známy zejména z hlediska produkce medu, vosku a důležitou rolí, kterou hrají při rozmnožování některých druhů rostlin. Méně známým produktem těchto živočichů je jed, zejména jeho hlavní složka melitin (z řeckého meli, melitos, med), který je toxický, avšak má mírné antibakteriální a fungicidní účinky. Z tohoto důvodu je důležité zkoumat účinky tohoto produktu na bakteriích, které ohrožují zdraví člověka a pomoci tak k získání více informací o jiném způsobu léčby některých bakteriálních onemocnění.

1.1. *Apis mellifera*

1.1.1. Taxonomie včely medonosné

Tab. I: Taxonomie včely medonosné (Přidal A., 2001).

Kmen	<i>Arthropoda</i> (členovci)
Třída	<i>Insecta</i> (hmyz)
Řád	<i>Hymenoptera</i> (blanokřídlí)
Podřád	<i>Apocrita</i> (štíhlopasí)
Nadčeleď	<i>Apoidea</i> (včely)
Čeleď	<i>Apidae</i> (včelovití)
Rod	<i>Apis</i>

1.1.2. Včela medonosná

Včela medonosná je blanokřídílí hmyz, který žije ve společenstvech. Její tělo se skládá z hlavy, hrudi a zadečku.

Drobné zúžení umožňuje pohyb hlavy, na které se nachází dvě složené oči po stranách a 3 jednoduché oči na temeni. Na hlavě včely se také vyskytují 2 článkovaná tykadla, na nichž se nachází zejména smyslové orgány, které umožňují včele vnímat hmatová a čichová podráždění.

Hrud' má důležitou funkci jako nosič křídel a nohou. Hrud' dospělého jedince se skládá ze 4 článků (předohrud', středohrud', zadohrud' a přesunutý kroužek). Charakteristickým znakem jsou 3 páry nohou, které slouží k pohybu, sběru a ukládání pylu, k řetízování mezi včelami a ke sběru voskových šupinek. Včela má 2 páry blanitých křídel, kde přední křídla jsou větší než zadní a na jejichž povrchu se vyskytují chloupky.

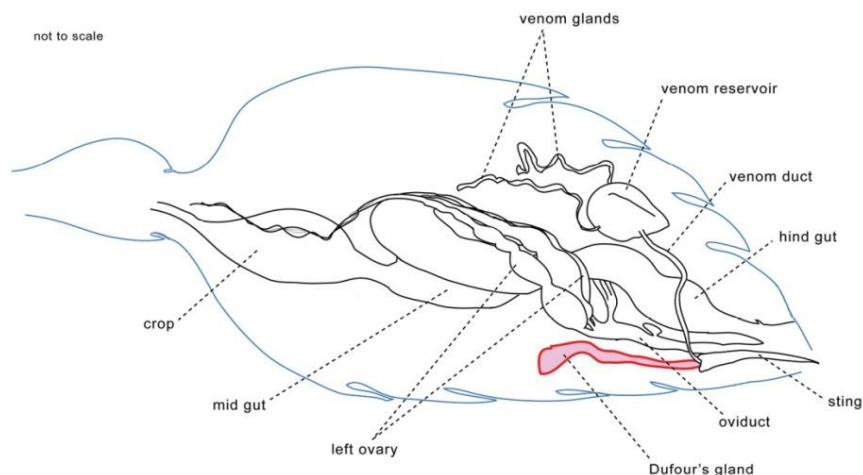
V zadečku jsou uloženy zažívací orgány, cévní a nervová soustava, vyměšovací soustava, medový váček, vzdušné vaky a jedová žláza. Žihadlo je na konci duté, napojené na jedový váček. Na konci žihadla je háček, který znemožňuje vytažení žihadla z rány. Při bodnutí se spolu s žihadlem vytrhne i jedový váček a včela následně umírá (Oždian, 2013).

Ve včelím společenstvu se nachází 3 typy včel – matka, dělnice a trubec. Matka je jediná v celém úlu, která dokáže klást vajíčka a pářit se s trubci. Od dělnice se liší velikostí a tvarem zadečku, který je veden do špičky. Ve špičce zadečku se nachází samičí i samčí pohlavní buňky, kterými matka reguluje počet jedinců v úlu. Dělnice je typ včely, která se liší od matky absencí pohlavních orgánů. Na rozdíl od matky má vyvinutou voskotvornou a hltanovou žlázu. Hltanová žláza slouží u mladých včel k tvorbě mateří kašičky a u starších jedinců k přeměně pylu na med. Trubec je včelí sameček, který se líhne z neoplozených vajíček. Jeho tělo je oproti matce i dělnici širší. Převážně žije jen v letních měsících. Jeho funkcí je oplození matky, po oplození umírá (Veselý et al., 2013).

1.2. Jedová žláza včely medonosné

Jedová žláza má trubicovitý tvar, na konci vidlicovitě rozvětvlující. Je dlouhá 10 – 25 mm a její příčný průměr v době činnosti se pohybuje okolo 130 μm . Jedová žláza funguje včelám již od vylíhnutí z buňky a ústí přímo do jedového váčku, kde se vytvořený jed shromažďuje. Jedový váček je tvořen průsvitnou chitinovou blankou a slouží jako zásobník sekretu jedové žlázy. V období 2 – 3 týdnů života, kdy je váček naplněn, obsahuje v průměru 0,26 mg jedu. Tvorba jedu závisí na množství přijaté bílkovinné potravy, čím více bílkovin, tím víc jedu a naopak (Titěra, 2006; Veselý et al., 2013).

Jedová žláza i jedový váček jsou součástí žihadlového aparátu, který slouží k odčerpávání jedu z váčku a do kterého ústí ještě alkalická neboli Dufourova žláza, jejíž sekret je důležitý pro dobrou funkci žihadla (Titěra, 2006; Veselý et al., 2013). Jedovou žlázu mají ve včelím společenství dělnice i královna, liší se ale velikostí. Královna má delší jedovou žlázu, která produkuje více jedu (Veselý et al., 2013).



Obr. 1: Jedové ústrojí včely medonosné (Aniruddha M., 2013).

1.3. Včelí jed

Včelí jed je bezbarvá kapalina, charakteristické vůně, hořkokyselá chuť, jejíž hlavní složkou je melitin (peptid z 26 aminokyselin). Tato složka tvoří 50 - 60 % jedu. Významnou složkou včelího jedu jsou také vysokomolekulární peptidy, především enzymy fosfolipáza A2, která činí 12 % jedu, hyaluronidáza (2 %), lysofolipáza (1 %), kyselá fosfomonoesteráza (1 %) a α -glucosidáza (0,6 %). Dalšími složkami jedu jsou apamin (18 aminokyselin, 2 %), který působí na nervovou soustavu, minimin (2 %), quinin, secapin, procamin, adolapin, terpiamin (1 %), proteázový inhibitor a peptidy s méně než 5 aminokyselinami v řetězci a volné aminokyseliny.

Fyziologicky aktivní látky jako jsou aminy, histaminy, dopamin, noradrenalin tvoří 1 % sušiny včelího jedu. Poměrně vysoký obsah (0,5 %) vykazuje kyselina máselná (Titěra, 2006).

Je zajímavé, že množství i kvalita včelího jedu je u různých jedinců včelího společenstva, zejména u královny a dělnice různá. Tomuto jevu přispívá i změna ročního období (Kato, 1994). Vliv jedu královny je mnohem menší na ostatní živočichy (např. myši) než jed dělnice. Naopak na ostatní jedince rodu *Apis* je působení jedu královny mnohem větší než jedu dělnice. Rozdíl účinku včelího jedu se vyskytuje také mezi mladou královnou a královnou, která po dlouhou dobu řídí společenství úlu. Jed starší královny je 15 krát méně letální než královny mladé (Schmidt, 1995). Jed královny se stává v podstatě inaktivním po 1 – 2 roku života. Rozdíl mezi těmito jedy byl rozeznán při pitvě jedové soustavy, kdy byl u mladých královen zaznamenán váček plný bezbarvého, průhledného jedu. Naopak u starších královen obsahoval váček viskózní jed tmavě hnědé barvy. U většiny starších královen byl jed zabarvený dohněda až černá a kvůli svému pevnému

skupenství nemohl být shromažďován ani rozpouštěn ve vodě (Schmidt, 1995). Zatímco jedová žláza dělnic v době jejich vylíhnutí neobsahuje jed, nově narozená královna již jed produkuje (Roat et al., 2006).

1.3.1. Biologické účinky složek včelího jedu: aplikace v lékařství

Po celá staletí byl včelí jed, med a pyl používán k lékařským účelům. Apitherapie neboli “včelí terapie” (z latinského *Apis* – včela) je lékařská metoda využívající včelí produkty. Tato terapie byla používána již ve Starověkém Egyptě jako homeopatický lék na artritidu. V současné době včelí jed nebo terapie pomocí včelího žihadla upoutala pozornost lékařů jako potenciální homeopatický lék na velkou řadu nemocí (Bogdanov, 2015).

Tab. II: Apiterapie pomocí včelího jedu (Bogdanov, 2015).

Nemoci	Typ nemoci, detail
Artritida	<ul style="list-style-type: none"> • Artritida, revmatická artritida • osteoartritida
Ztuhlost ramenního kloubu	<ul style="list-style-type: none"> • Akupunktura včelím jodem
Nemoci centrální a periferní nervové soustavy	<ul style="list-style-type: none"> • Skleróza • Demence • Ochrnutí po mozkové mrtvici • Zánět ganglií • Svalová dysfunkce • Parkinsonova choroba • Myopathie
Srdce, krevní oběh	<ul style="list-style-type: none"> • Hypertenze • Arterioskleróza • Angina pectoris • Srdeční arytmie
Nemoci kůže	<ul style="list-style-type: none"> • Ekzémy, dermatida • Furunkulóza • Léčba jizev • plešatost
Ostatní choroby	<ul style="list-style-type: none"> • astma, bronchitida • rakovina • endokrinologie, urologie • vředy, zánět střev

1.4. Melitin

Melitin je polypeptid obsahující 26 aminokyselinových zbytků. Je to cytotoxická komponenta včelího jedu, jenž tvoří 50 – 60% z jeho celkového množství (Terwilliger and Eisenberg, 1982).

Množství melitinu v jedu je rozdílné během cyklu života včely. U včelí dělnice nejdříve syntéza melitinu pomalu stoupá, následně však dojde k poklesu. Je dokázáno, že produkce melitinu je nejvyšší mezi 1 – 2 týdnem po vylíhnutí. Obsah melitinu se také mění v průběhu letních měsíců. U včel starších než jeden týden je obsah melitinu v jedu nižší v polovině srpna než u včel stejného věku začátkem června (Owen and Pfaff, 1995).

Biologicky aktivní peptid melitin má několik velmi důležitých funkcí: snižuje povrchové napětí buněčných membrán, má protizánětlivé účinky ve velmi malém množství, zvyšuje propustnost kapilár a snižuje krevní tlak a krevní srážlivost, má vliv na centrální nervový systém, má imunostimulační a imunosupresivní funkce a stimuluje hladké svalstvo. Má inhibiční účinek na růst mikroorganismů včetně gram - pozitivních i gram - negativních bakterií, protozoa a virů, podílí se na apoptóze rakovinných buněk a inhibici růstu buněk (Luís F. Leandro, 2014). Melitinem mohou být léčeny některé nádory, například ledvin, plic, jater nebo močového měchýře. Genová terapie melitinem může být použita jako nový způsob léčby pro některé druhy rakoviny, jako leukémie nebo rakovina prostaty a rakovina mléčné žlázy (Oršolić, 2012). Melitin může eliminovat virus HIV, zatímco nepoškodí ostatní buňky (Hood et al., 2013).

Vyšší dávka melitinu však působí hemolyticky a zánětlivě. Ačkoliv ve formě tetrameru nebo monomeru je melitin slučitelný s vodou, narušuje přírodní i syntetickou lipidovou dvojvrstvu buňky. Pravděpodobně v důsledku narušení membrány buňky, melitin zvyšuje aktivitu fosfolipázy A2 a ovlivňuje živé buňky. Melitin má potencionální aktivitu v lýze buněk (Terwilliger and Eisenberg, 1982).

V roce 1997 Lubke a Garon publikovali studii, kde ukázali, že melitin má inhibiční efekt na spirochéty Lymské boreliózy (LB) již v malých koncentracích (Lubke and Garon, 1997). Nicméně další studie zabývající se stejným tématem doposud nebyly publikovány. Kvůli každoročnímu nárůstu případů onemocnění Lymskou boreliózou a prozatímní absencí vakcíny, je obzvlášť důležité studovat účinky přírodních látek, jako je melitin na spirochéty a jiné bakterie s cílem najít terapeutické účinné sloučeniny, které by mohly sloužit k rozšíření spektra klinicky užitečných antimikrobiálních činidel.

1.5. Lymská borelióza a její původci

Lymská borelióza je jedno z nejčastějších onemocnění přenášené klíšťaty a to jak ve světě, tak i v České Republice, která svým geografickým reliéfem a mírným klimatem vytváří ideální podmínky pro hojný výskyt klíšťat. Nejčastějším přenašečem původce Lymské boreliózy, spirochét komplexu *B. burgdorferi* sensu lato (s. l.) v České Republice je klíště obecné *Ixodes ricinus*.

První oficiální záznam o Lymské borelióze pochází z městečka Old Lyme (Connecticut, USA), podle kterého tato nemoc byla pojmenována (Bartůněk a kol., 1996).

Onemocnění způsobené spirochétami *B. burgdorferi* s. l. probíhá u většiny případů abortivně, u 5 – 20 % se klinicky projeví kožní problémy, ale i závažné postižení zejména kolenních kloubů tzv. Lymská artritida, která se projevuje v pozdním stádiu onemocnění. Dalšími klinickými příznaky jsou poruchy nervové soustavy a periferních nervů. Vzácně může Lymská borelióza způsobovat i poruchy jiných orgánů, například srdce a způsobit tzv. Lymeskou karditidu (Krbková, 2007).

1.5.1. Borelie

Borelie patří do třídy *Spirochaetes*. Jsou to mikroaerofilní spirochéty, které se vyznačují spirálovitě vinutým tělem o délce až 30 μm , průměrem 0,2 μm . *Borrelia burgdorferi* je považována za „diderm“ nebo dvou – membránovou bakterii spíše než gram – negativní ani gram – pozitivní bakterii (Samuels and Radolf, 2010). Pohyb borelií zajišťují bičíky vyčnívající z bazálních disků (7 – 11) na obou koncích borelie. Jejich funkcí je obtáčení těla borelie pod vnější buněčnou stěnou. Dalším způsobem pohybu borelie je smršťování a natahování nebo rotace kolem osy (Bartůněk et al., 1996). Tyto pohyby umožňují přesun borelie do míst jejího nejčastějšího výskytu – viskózního prostředí mezibuněčné hmoty. Borelie mají schopnost vstupovat do buněk, jako jsou fibroblasty, makrofágy a dendritické buňky a v nich dále přežívat (Křupka et al., 2008).

Vzhledem k neúplnosti metabolické výbavy jsou borelie závislé na svém hostiteli. Postrádají enzymy důležité pro syntézu aminokyselin, mastných kyselin a nukleotidů, které získávají z těla hostitele, proto nemohou žít ve vnějším prostředí (Křupka et al., 2008). Borelie nejvíce rostou při teplotě 30 – 34 °C a jejich generační doba je 12 a více hodin (Bednář, 1999). Genom borelie je představen lineárním chromozomem, obsahuje také větší počet plazmidů, které nesou geny pro tvorbu proteinů vnější membrány. Díky schopnosti výměny plazmidů s jinými bakteriemi se borelie přizpůsobuje prostředí (Bartůněk, 1996).

Tyto bakterie jsou jednobuněčné a dělí se příčným nebo podélným zaškrcováním, které zprostředkovává růst cytoplazmatické membrány. Výjimkou jsou intracelulárně perzistující borelie, které se zaškrcováním nedělí (Bartůněk et al, 1996).

Hlavními hostiteli *B. burgdorferi* s. l. v přírodě jsou drobní a středně velcí hlodavci, pak také ptáci, plazi a velká zvěř.

1.5.2. Druhy borelií

Jedinci z rodu *Borrelia* se rozdělují na dvě odlišné skupiny podle toho, jaké onemocnění způsobují. Do první skupiny patří spirochéty, které způsobují Lymskou boreliózu. Do této skupiny, která je označována jako skupina *Borrelia burgdorferi* sensu lato komplex se řadí v současné době 21 druhů. Jsou to druhy *B. afzelii* (Canica et al., 1993), *B. americana* (Rudenko et al., 2009a), *B. andersonii* (Marconi et al., 1995), *B. bavariensis* (Margos et al., 2009), *B. bissettii* (Postic et al., 1998), *B. burgdorferi* sensu stricto (Baranton et al., 1992), *B. californiensis* (Postic et al., 2007), *B. carolinensis* (Rudenko et al., 2009b), *B. garinii* (Baranton et al., 1992), *B. japonica* (Kawabata et al., 1993), *B. kurtenbachii* (Margos et al., 2010), *B. lusitaniae* (Le Fleche et al., 1997), *B. sinica* (Masuzawa et al., 2001), *B. tanukii* (Fukunaga et al., 1996), *B. spielmanii* (Richter et al., 2006), *B. valaisiana* (Wang et al., 1997), *B. yangtze* (Chu et al., 2008), *B. finlandensis* (Casjens et al., 2001), *B. chilensis* (Ivanova et al., 2014) a nedávno objevená *B. mayonii* (Pritt et al., 2016).

Nejznámější druhy, které patří do toho komplexu a je u nich prokázána schopnost způsobit Lymskou boreliózu jsou *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*. Každá ze zmíněných druhů borelií způsobuje různé klinické příznaky Lymské boreliózy. *Borrelia afzelii* se nejvíce podílí na vzniku kožních onemocnění jako je *Erythema migrans* a *Acrodermatitis chronica atrophicans*. *Borrelia garinii* se projevuje převážně výskytem Lymské neuroboreliózy. *B. burgdorferi* s. s. způsobuje převážně artritidu, ale také neuroboreliózu (Balmelli, 1995; Strle et al., 2006). V poslední době je uznán význam i dalších druhů spirochét komplexu *B. burgdorferi* s. l. jako původců tohoto onemocnění.

Do druhé skupiny patří borelie, které jsou příčinou návratné horečky. Významní zástupci této skupiny jsou: *B. duttonii*, *B. hispanica*, *B. crocidurae*, *B. recurrentis*, *B. corriaceae*, *B. lonestari*, *B. miyamotoi*, *B. parkeri*, *B. turicatae*, *B. hernii*, *B. anserina*, *B. persica* (Ras et al., 1996).

2. Cíl práce

1. Literární studie k problematice.
2. Zjištění minimálních koncentrací včelího jedu, při které dochází k úmrtí spirochét borelií.
3. Detekce a izolace genu kódujícího melitin v jedových žlázách včely medonosné; optimalizace laboratorních podmínek pro RNA/DNA purifikaci, cDNA syntézy, PCR, elektroforézy, klonování a sekvenování.
4. Produkce rekombinantního peptidu (bez signální sekvence) v prokaryotním expresním systému.
5. Ověření antibakteriálního potenciálu rekombinantního melitinu a jeho vliv na mortalitu spirochét *B. burgdorferi* s. l.
6. Interpretace výsledků.

3. Materiály a metody

3.1. Použité materiály a chemikálie

Tab. III: Seznam použitých primerů.

Primer	Použitá teplota nasedání (°C)	Sekvence primeru 5' → 3'	reference
MILmat F - 10	55	TCC GGA AGC GGG AAT TGG AG	Tato práce
MILmat R - 10	55	TAA CCC TGT TGC CTC TTA CGT TT	Tato práce
MILmat F - 6	55	CGG GAA TTG GAG CAG TTC TGA	Tato práce
MILmat R - 6	55	CCC TGT TGC CTC TTA CGT TT	Tato práce
MILmatexp101 F	50	CAC CAT GGG AAT TGG AGC AGT TCT	Tato práce
MILmatexp101 R	50	CTG TTG CCT CTT ACG TTT	Tato práce
M13 - F	50	GTA AAA CGA CGG CCA	TOPO [®] TA Cloning [®] Kit (Invitrogen)
M13 -R	50	CAG GAA ACA GCT ATG AC	TOPO [®] TA Cloning [®] Kit (Invitrogen)
T7 - F	50	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Champion [™] pE TDirectional TOPO [®] Expressionkits (Invitrogen)
T7 - R	50	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	Champion [™] pE TDirectional TOPO [®] Expression kiks (Invitrogen)

Tab. IV: Seznam použitých kitů a chemikálií.

Metoda	Materiál	Složení
Izolace RNA	Kit	RNeasy [®] Protect Mini Kit (50), (Qiagen)
	Stabilizační roztok	RNAlater [™] RNA stabilization solution (Ambion)
cDNA syntéza	Kit	Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche)
PCR	2x premix	Taq DNA polymeráza (doplněno reakčním pufrem), (pH 8.5), 400 μM dATP, 400 μM dGTP,

		400 μ M dCTP, 400 μ M dTTP, 3 mM MgCl ₂ (Promega)
DNA elektroforéza	agaróza	1 – 2,5 % agaróza (Serva) v 1x TAE pufru
	50 xTAE pufr	200 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA
	100 bp DNA ladder	Thermo Scientific GeneRuler 0,5 μ g/ μ l
	6x vzorkový pufr	0,25 % bromfenol blue, 0,25% xylen cyanos, 30% glycerol, 1,2% SDS, 60 mM sodiumphosfate, 0,4 % orange G, pH 6.8
Purifikace PCR produktu	Kit	QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)
Klonování	Kit	TOPO [®] TA Cloning [®] Kit for sequencing (Invitrogen)
	Kit	Champion [™] pET Directional TOPO [®] Expression Kits (Invitrogen)
Transormace	S.O.C medium	2 % tryptone, 0,5 % yeastextract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glukóza
	LB agar	1,5 % bacto-agar v LB mediu, pH 7.5
	ampicilin	Konečná koncentrace 50 μ g/ml
	LB medium	1,0 % tryptone, 0,5 % yeastextract, 1,0 % NaCl, pH 7.0
	Kompetentní buňky	One Shot top 10 chemically compenent <i>E. coli</i> BL21 Star (DE3), (Invitrogen)
Purifikace plazmidové DNA	Kit	QIA prep [®] Spin Miniprekit (Qiagen)
Expresse genu	1mM IPTG	Isopropylthio - β - galaktosid
SDS - PAGE	1x PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
	Vzorkový pufr	4 x Laemmli Sample Buffer (BioRad)
	Redukční činidlo	355 mM β - mercaptoethanol
	marker	Spectra [™] multicolor low range protein ladder (Thermo Scientific)
	10 x anodový pufr	1 M Tris, 0,225 M HCl, pH 8.9
	10 x katodový pufr	1 M Tris, 1 M Tricin, 1 % SDS, pH 8.25
	3 x gelový pufr	3 M Tris, 1 M HCl, 0,3 % SDS, pH 8.45
	Zaostřovací gel	40 % akrylamid/Bis – akrylamid, 3 x gel pufr, ddH ₂ O, 10 % amonium persulfát, TEMED (N – tetramethylethylendiamin)
	Rozdělovací gel	40 % akrylamid/Bis – akrylamid, 3x gel pufr, glycerol, ddH ₂ O, 10 % amonium persulfát, TEMED
	Barvení gelu	PageBlue [™] Protein Staining Solution (MBI Fermentas)

Western Blot	Blotovací pufr	150 mM glycin, 20 % methanol, 25 mM Tris base, pH 8.3
	Methanol	CH ₃ OH
	Membrána	Immobilon – P ^{SQ} PVDF Transfer membrane (Millipore)
	Protilátky	Anti His Ni – NTA HPR konjugát
	TBS Pufr	10 mM Tris – Cl pH 7.5, 150 mM NaCl, ddH ₂ O
	TBS Tween pufr	20 mM Tris – Cl, pH 7.5, 500 mM NaCl, 0,05 % Tween 20 (Sigma)
	10x Tris - saline	9 % NaCl, 1 M Tris – Cl, pH 8.0
	Barvicí roztok	18 mg 4 – chlor – 1 – naphthol (Sigma) v 6 ml methanolu, 24 ml 1x Tris – saline, 60 µl 30 % peroxid vodíku
Metoda Bradforda	Bradfordovo činidlo	0,01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G – 250, 4,7 % (w/v) ethanol, 8,5 % (w/v) kyselina fosforečná
	Lyzační roztok	300 mM NaCl, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8.0
Průtoková cytometrie	Ředící roztok	2 % BSA, 5,4 mM glukóza v PBS sterilní, přefiltrováno přes 0,22 µm filtrační membránu
	propidiumiodid	1,5 µM C ₂₇ H ₃₄ I ₂ N ₄ (Sigma Aldrich)

Tab. V: Seznam použitých přístrojů.

PCR cycler	Master cycle personal(Eppendorf)
PCR box	DNA/RNA UV cleaner UVC/T – M – AR (Biosan)
Fotosystém na focení gelu	Kodak
Centrifugy	Centrifuge 5415D (Eppendorf)
	Centrifuge 1415R (Eppendorf)
	Centrifuge 5415C (Eppendorf)
	Universal 32R (Hettlich zentrifugen)
Elektroforéza	SHU6 (Sigma Aldrich)
	OVL Easycast™ B2 (Thermo Scientific)
Mikroskop s kondenzorem temného pole	Leica DM 1000 LED (Leica)
Petroff – Hausserova počítací komůrka	Hloubka: 0,22 mm, Hausser Scientific, PA, USA
Inkubátor	Thermomixer (Eppendorf)
Sterilní box (Flow box)	ESCO Class II BSC
Průtokový cytometr	BD FACS Canto II
Genie Electrophoretic Blotter	Idea Scientific Company, MN, USA
Sonikátor	Bandelin Sonopuls

3.2. Metody

3.2.1. Izolace RNA z jedové žlázy včely medonosné

Pro izolaci RNA z jedové žlázy bylo použito 10 včel medonosných - dělnic (*Apis mellifera*). Žlázy byly vypitvány pomocí dvou pinzet a vloženy do roztoku RNAlater. RNA z jedových žláz byla izolována pomocí RNeasy kitu přesně podle doporučení od výrobce. RNA byla eluována z kolony 50 μ l RNase – free H₂O. Koncentrace izolované RNA byla změřena pomocí NanoPhotometer při vlnové délce 260/280 nm. RNA byla ihned použita k dalším účelům nebo skladována na – 80 °C.

3.2.2. Syntéza jednovláknové cDNA

Jednovláknová cDNA byla syntetizována pomocí kitu Enhance avian HS RT-PCR-100 (Sigma). Syntéza byla provedena podle návodu od výrobce pro Two-Step RT-PCR. V posledním kroku byla cDNA eluována z kolony 30 μ l ddH₂O. Koncentrace cDNA byla změřena na přístroji NanoPhotometer při vlnové délce 260/280 nm.

3.2.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Syntetizovaná cDNA byla použita jako templát pro PCR reakci se speciálně navrženými primery (2 páry), specifickými pro včelí melitin. Reakce proběhla v 0,2 ml zkumavkách v přístroji Master Cycler Personal (Eppendorf). Pro zjištění případné kontaminace byla ke každé reakci přidána negativní kontrola, ve které byl templát nahrazen ddH₂O.

Reakční směs (1 reakce ve 20 μ l):

2x PCR Master mix (Promega).....	10 μ l
PrimerMILmat F-10/ F-6 (0,1 mM)	1 μ l
Primer MILmat R-10/R-6 (0,1 mM)	1 μ l
ddH ₂ O	7 μ l
cDNAtemplát (150 μ g/ μ l).....	1 μ l

Program PCR

- 1) 94 °C....3 min, denaturace DNA
- 2) 94 °C....30 s, denaturace
- 3) 55 °C....30 s, nasedání primeru
- 4) 72 °C.... 1 min, syntéza
- 5) 72°C.... 10 min, závěrečná elongace

Kroky 2 – 4 se 35 krát opakovaly

Výsledky byly ověřeny elektroforézou na 2,5 % agarozovém gelu. Ke vzorkům bylo přidáno 1,66 μl 6x koncentrovaného vzorkového pufru s obsahem SYBR Green barvy pro vizualizaci DNA pod UV zářením. Jako markér byl použit standard molekulových hmotností 100 bp Gene Ruler (MBI Fermentas). Elektroforéza probíhala přibližně 40 minut při 100 V. Výsledky byly zdokumentované pomocí přístroje MiniLumi (DNA Bio Imaging Systems).

3.2.4. Purifikace PCR produktu

PCR produkt byl purifikován z gelu pomocí QIAquick[®] Gel Extraction kit (Qiagen) podle návodu od výrobce. DNA byla eluována z kolony 30 μl ddH₂O.

3.2.5. Klonování PCR produktu do vektoru PCR[®] 4- TOPO

Purifikovaný produkt byl ligován do vektoru podle návodu od výrobce. Reakční směs, která obsahovala 4 μl purifikovaného PCR produktu, 1 μl Salt solution, 1 μl vektoru byla promíchána a inkubována 30 minut při pokojové teplotě.

3.2.6. Transformace One Shot TOP10 *E. coli* kompetentních buněk

Kompetentní buňky (50 μl) byly pomalu rozmrazeny na ledu. K buňkám byly přidány 2 μl z klonovací reakce, směs byla opatrně promíchána a inkubována 25 minut na ledu. Poté byly buňky vystaveny teplotnímu šoku, a to 42 °C na 30 sekund, pak inkubovány s S.O.C médiem při 37 °C 1 hodinu na třepačce. Následně byla tato reakce rozetřena na Petriho misky s LB agar/ampicilinem (50 $\mu\text{g/ml}$). Misky byly inkubovány přes noc při 37 °C. Další den byly vzniklé kolonie přeočkovány do LB media s ampicilinem (50 $\mu\text{g/ml}$) a kultivovány na třepačce při 37 °C přes noc. Třetí den byly buňky stočeny (13 000x g, 15 minut) a z buněčného peletu byla purifikována plazmidová DNA, která byla eluována z kolony 50 μl ddH₂O. Poté byla změřena koncentrace plazmidové DNA.

3.2.7. Ověření přítomnosti inzertu v plazmidu (screening)

Přítomnost inzertu v plazmidu byla ověřena metodou PCR. Pro tuto reakci byly použity gen specifické primery MILmat R-10, F-10 a také vektor – specifické primery M13 forward a M13 reverse. Výsledky byly vyhodnoceny na 2,5 % agarozovém gelu. Plazmidy, u kterých byla přítomnost inzertu prokázána, byly osekvenovány v sekvenační servisní laboratoři společnosti BIOGEN PRAHA s. r. o.

3.2.8. Klonování PCR produktu do expresního vektoru Champion pET 101/D-TOPO[®]

Plazmidy, u kterých byla prokázána přítomnost správné sekvence, byly podrobeny PCR s nově navrženými specifickými primery MILmatexp 101 F/R pro expresní vektor.

Program PCR:

- 1) 95°C 5 min, denaturace DNA
- 2) 94°C 30 s, denaturace
- 3) 50°C 30 s, nasedání primeru
- 4) 72°C 1 min, syntéza
- 5) 72°C 10 min, závěrečná elongace

Kroky 2-4 se 35 krát opakovaly.

Poté následovala elektroforéza na 1,8 % agarozovém gelu. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí UV světla.

PCR produkty byly purifikovány pomocí QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) podle přiloženého návodu. Následně byl purifikovaný produkt klonován do expresního vektoru Champion pET 101/D – TOPO[®]. Klonovací reakce probíhala přesně podle přiloženého návodu od výrobce.

Následně proběhla transformace buněk *E. coli* One Shot TOP 10 (bod 3.2.6.) a byla ověřena přítomnost inzertu v plazmidu se specifickými primery MILmatexp 101 F/R a s primery T7 protomor, T7 reverse na plazmidu.

3.2.9. Produkce rekombinantního proteinu

Transformované buňky BL21 Star[™] (DE3) One Shot[®] byly přeočkovány do 10 ml LB média, které obsahovalo ampicilin (50 µl/ml). Vzorky byly přes noc inkubovány v třepacím inkubátoru na 37 °C. Další den došlo k přesazení 500 µl buněk do 10 ml nového LB/ampicilin (50 µl/ml) a kultura byla nadále inkubována 2 hodiny při 37 °C. Následně byly buňky rozděleny do zkumavek po 5 ml. Do jedné z nich bylo přidáno IPTG (1 mM). Ještě před přidáním IPTG byl odebrán nultý (neindukovaný) vzorek. Poté bylo odebíráno 500 µl z obou kultur po dobu 6 hodin dle návodu. Buňky byly stočeny (13 000 g, 15 min) a uchovány při – 20 °C.

3.2.10. SDS – PAGE

K buněčnému peletu všech vzorků bylo přidáno 150 µl PBS a vzorky byly sonikovány na přístroji Bandelin Sonoplus při 20 kHz (6 x 10 sekund). Následovala

centrifugace (13 000 g, 15 min, 4 °C). Čtrnáct μ l supernatantu bylo smícháno s 5 μ l vzorkového pufru (4x Laemmli sample buffer) a s 1 μ l redukčního činidla (β – mercaptoethanol). Následovala denaturace při 95 °C, 10 minut. Po denuraci byly vzorky přeneseny na led a ihned nanoseny na gel.

Před samotnou elektroforézou byly připraveny katodový, anodový pufr, gel pufr a krycí a rozdělovací gel přesně podle přiloženého návodu. Po nanesení vzorků a markeru na gel probíhala elektroforéza při 45 V, po přechodu vzorků do rozdělovacího gelu bylo napětí zvýšeno až na 200 V.

Po skončení elektroforézy následovalo barvení gelu pomocí PageBlue™ Protein Staining Solution přes noc na třepačce. Další den byl gel promýván 3 krát 10 minut v ddH₂O. Výsledky byly vyhodnoceny pod bílým světlem.

3.2.11. Western Blot a detekce rekombinantního proteinu

Vzorky rozdělené SDS – PAGE byly přeneseny na membránu podle přiloženého návodu od výrobce Genie blotovacího zařízení. Nejprve byla membrána aktivována methanolem. Samotný přenos trval 1,5 hodiny při 17 V. Po skončení přenosu byla membrána navlhčena v blotovacím pufru a uchovávána na 4 °C.

Detekce rekombinantního proteinu proběhla reakcí s anti His Ni –NTA HPR konjugátem. Membrána s přenesenými vzorky byla promývána 2 krát 10 minut v TBS pufru. Po promývání následovala inkubace 1 hodinu v blokovacím pufru (3 % BSA – TBS). Dále byla membrána promývána 3 krát 10 minut v TBS Tween pufru a inkubována 1 hodinu v TBS Tween pufru obsahujícím anti His Ni – NTA HPR protilátky. Po inkubaci s protilátkami byla membrána znovu promývána 3 krát 10 minut v TBS Tween pufru a obarvena v obarvovacím roztoku. Barvení probíhalo 1 – 4 minuty v tmavém prostředí. Reakce barvení byla zastavena promýváním ve vodě. Membrána byla okamžitě vyfocena.

3.2.12. Částečná „purifikace“ (rozdělení) buněčného lyzátu na koloně

Buněčný lyzát byl rozdělen na koloně Ultracel – 3k (cut – off 3,000) pomocí centrifugace při 5000 rpm 1 hodinu. Dolní frakce (flow through) byla použita k dalším experimentům.

3.2.13. Stanovení koncentrace rekombinantního proteinu podle Bradfordovy metody

Koncentrace dolní frakce obsahující částečně „purifikovaný“ rekombinantní protein melitinu byla změřena pomocí Bradfordovy metody, jejíž principem je adsorpční vazba barviva Coomassie Brilliant Blue G 250 na molekulu proteinu. Padesát μ l Bradfordova

činidla bylo smícháno s 50 μ l roztoku obsahujícího proteiny a změřeno na přístroji NanoPhotometer při vlnové délce 595 nm.

3.2.14. Příprava BSK – II media pro kultivace borelie

Příprava byla prováděna podle protokolu Dr. P. Rosa (USA). Seznam použitých látek potřebných pro výrobu 1 litru media je uveden v tabulce IV. První tři chemikálie ze seznamu byly v uvedeném množství při stálém míchání pomalu rozpuštěny v 800 ml vody na magnetické míchače. Následně byly přidány ostatní složky. Želatina byla rozpuštěna ve vařící vodě a přidána k ostatním složkám. Po rozpuštění všech komponentů bylo dovedeno pH do 7.6 pomocí NaOH. Poté byl roztok po nepatrném zahřátí přefiltrován přes 0,22 μ m filtr. Filtrace probíhala ve sterilním boxu, aby nedošlo ke kontaminaci. Přefiltrovaný roztok byl následně rozdělen po 50 ml do zkumavek ve sterilních podmínkách, do každé zkumavky byly přidány 3 ml králíčího séra. Medium bylo uloženo do mrazáku na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tab. IV: Látky pro výrobu BSK – II.

Složky	Množství na 1000 ml (g)
10x CMRL	9,7
Neopentane	5
Yeastolate	50
Hepes acid	2
glukoce	6
Sodium pyruvate	0,8
Sodium citrate	0,7
N – acetyl glucosamine	0,4
Sodium bicarbonate	2,2
Gelatina	10

3.2.15. Kultivace borelie

Borelie byly kultivovány v kompletním BSK – II médiu ve sterilním prostředí. Při nasazování bakterií ze zmrazených kultur bylo použito 5 – 10 μ l zmražené kultury

na 10 ml BSK – II média bez antibiotik. Kultivace probíhala při 34 °C. Vzorky byly pravidelně kontrolovány mikroskopií temného pole a po dosažení hustoty buněk nad 10^7 /ml byly nekontaminované kultury použity pro další experimenty.

3.2.16. Mikroskopie temného pole a počítání spirochét

Dostatečně narostlé kultury borelií byly pozorovány pod mikroskopem s kondenzorem temného pole při zvětšení 10 x 40. Pomocí Petroff - Hausnerovy komůrky byla stanovena hustota kultury. Koncentrace byla vypočítána na základě průměrného počtu bakterií v úhlopříčce pěti větších čtverců Petroff - Hasserovy komůrky. Koncentrace buněk v 1 ml kultury byla spočítána pomocí vzorce $A \times 1,25 \cdot 10^6$, kde A je průměrný počet bakterií ve větším čtverci komůrky.

3.2.17. Měření působení včelího jedu na borelie

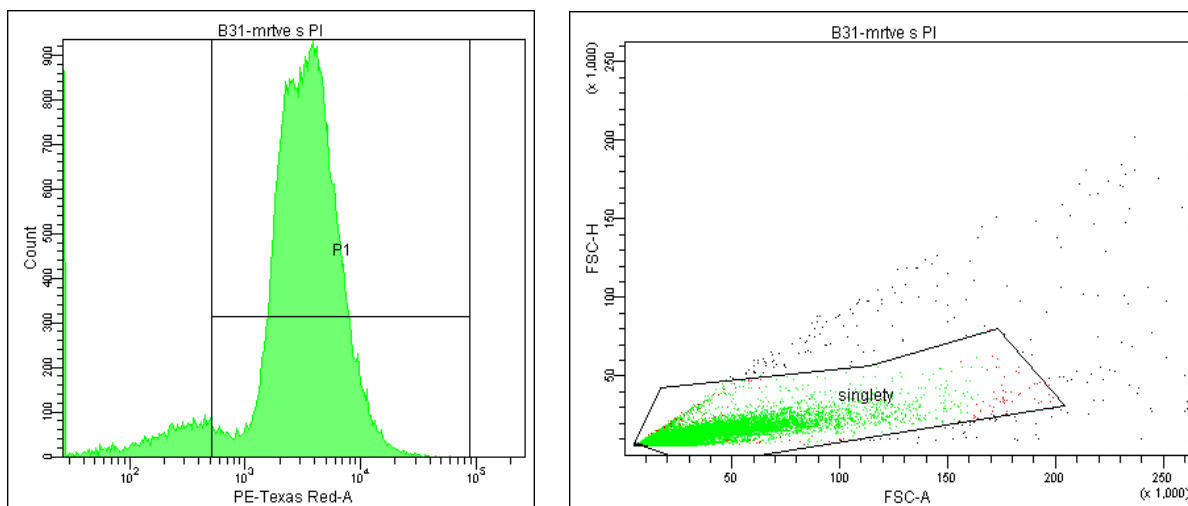
Dostatečně narostlá kultura *B. afzelii* byla naředěna do koncentrace 10^7 /ml sterilním BSK – II médiem. Ve sterilním boxu v mikro destičkách bylo smícháno 50 μ l kultury borelie a včelí jed v různých koncentracích (totální objem 50 μ l). Takto připravené vzorky byly inkubovány při 34 °C (po dobu 12, 24, 48 hod). Výsledky působení včelího jedu/melitinu na borelie byly vyhodnoceny pomocí průtokového cytometru.

Ke každému měření byla připojena kontrola živých a mrtvých buněk. Jako kontrola mrtvých buněk byla použita kultura borelií inkubována 30 min při 56 °C. Kontrola živých buněk obsahovala 50 μ l čisté kultury borelií, která byla inkubována při 34 °C s ostatními vzorky.

Téměř stejný postup byl použit jak při měření aktivity melitinu jako součásti nativního včelího jedu, tak i v případě měření aktivity částečně „purifikovaného“ rekombinantního peptidu.

3.2.18. Průtoková cytometrie

Metoda průtokové cytometrie byla použita pro vyhodnocení mortality borelií ve všech sledovaných vzorcích. Po inkubaci byly vzorky odstředěny 15 minut při 10 000 rpm pomocí centrifugy. Následně byl odebrán a dekontaminován supernatant a odstředěné borelie byly smíchány s 200 μ l ředícího roztoku. Tato směs byla přenesena do 5 ml zkumavek BD FalconTM, ve kterých byla měřena mortalita borelií v průtokovém cytometru. Mortalita borelií byla sledována na základě intenzity fluorescence propidiumiodidu v kanálu PE-Texas Red A 616/23 s určením oblasti P1 s výskytem mrtvých buněk (Obr. 2, 3).



Obr. 2, 3: Znárodnění mrtvých buněk v oblasti P1 v průtokovém cytometru a vymezení buněk.

4. Výsledky

4.1. Pitvání jedové žlázy včely

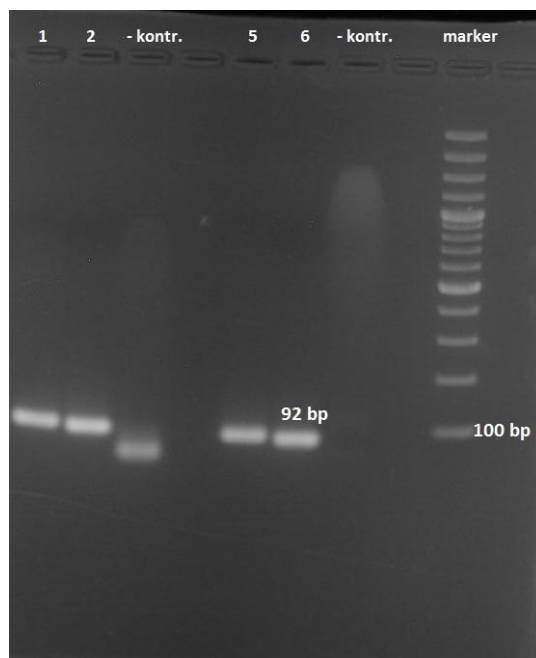
Z 10 včel medonosných (*Apis mellifera*) byly vypitvány jedové žlázy.

4.2. Izolace RNA a syntéza cDNA

Z vypitvaných jedových žláz byla izolována celková RNA. Koncentrace RNA byla 360 µg/ml. Z RNA byla syntetizována cDNA. Koncentrace cDNA byla 1530 µg/ml. Pro PCR reakci byla cDNA následně zředěna vodou v poměru 1:10.

4.3. PCR

cDNA byla použita jako templát pro PCR (Obr. 4). Pomocí PCR se specifickými primery pro zralý melitin byl získán PCR produkt o velikosti 92 bp. Tento PCR produkt byl purifikován z gelu. PCR produkt byl osekvenován se specifickými primery z obou konců.



Obr. 4: Jamky 1, 2, 5, 6 - specifický PCR produkt pro zralý melitin (92 bp). Jamky 3 a 7 – negativní kontrola. Jamka 9 – 100 bp DNA marker.

```
CCGGAAGCGGGAATTGGAGCAGTTCTGAAGGTATTAACCACAGGATTGCCCCGC
CCTCATAAGTTGGATTAAACGTAAGAGGCAACAGGGTTA
```

```
PEAGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQG
```

Obr. 5: Částečná nukleotidová sekvence genu melitinu a aminokyselinová sekvence proteinu jím kódována.

Molekulová hmotnost peptidu je 3200 Da. Peptid se skládá z 26 aminokyselin, z toho je 5 aminokyselin bazických (K, R), 1 kyselá (D, E), 13 hydrofóbních (A, I, L, F, V, W) a 5 polárních (N, C, Q, S, T, Y).

Získaná částečná sekvence genu kódujícího včelí melitin byla zadána do databáze GenBank a byla prokázána 100 % homologie s melitinem včely medonosné (Obr. 6).

Download ▾ [GenBank](#) [Graphics](#)

Apis mellifera melittin mRNA, complete cds
Sequence ID: [gb|JQ900378.1](#) Length: 229 Number of Matches: 1

Range 1: 128 to 219 [GenBank](#) [Graphics](#) ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
171 bits(92)	2e-39	92/92(100%)	0/92(0%)	Plus/Minus

```

Query 1  AACCCCTGTTGCCTCTTACGTTTAATCCAACCTTATGAGGGCGGGCAATCCTGTGGTTAATA 60
Sbjct 219 AACCCCTGTTGCCTCTTACGTTTAATCCAACCTTATGAGGGCGGGCAATCCTGTGGTTAATA 160

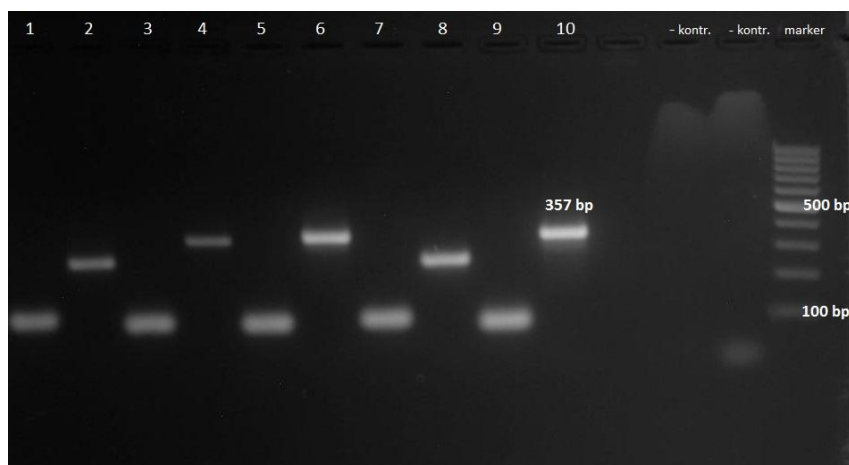
Query 61  CCTTCAGAACTGCTCCAATTCCTCCGCTTCCGGA 92
Sbjct 159 CCTTCAGAACTGCTCCAATTCCTCCGCTTCCGGA 128

```

Obr. 6: Porovnání sekvence genu kódujícího včelí melitin s databází GenBank.

4.4. Produkce rekombinantního konstruktů

PCR produkt obdrženy s primery na zralý melitin pro expresní vektor byl zaklonován do expresního vektoru Champion pET 101/D – TOPO[®] a rekombinanty s ověřenou sekvencí se správným čtecím rámcem byly použity pro transformaci BL21 Star expresních *E. coli* buněk.



Obr. 7: Ověření přítomnosti inzertu v expresním plazmidu Champion pET 101/D – TOPO[®].

*1, 3, 5, 7, 9 vzorky se specifickými primery MILmatexp 101 F, R.

2, 4, 6, 8, 10 stejné vzorky s primery T7 promotor a T7 reverse na plazmidu.

Předpokládaná molekulová hmotnost fúzního proteinu odpovídá 6530 Da. Peptid se skládá z 59 aminokyselin, z toho je 9 bazických (K, R), 3 kyselé (D, E), 19 hydrofóbních (A, I, L, F, V, W) a 11 polárních (N, C, Q, S, T, Y).

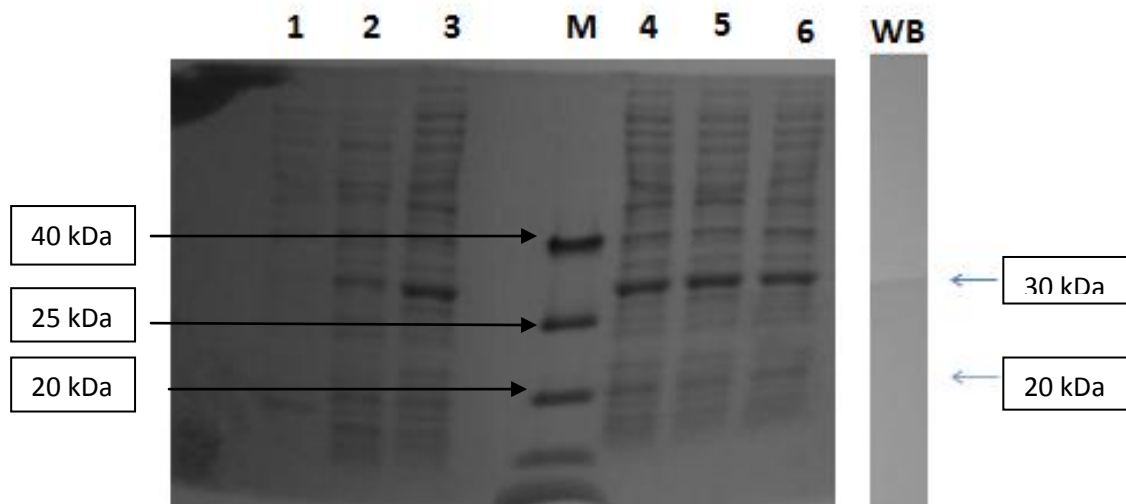
```
ATGGGAATTGGAGCAGTTCTGAAGGTATTAACCACAGGATTGCCCCGCCCTC
ATAAGTTGGATTAAACGTAAGAGGCAACAGaagggcgagctcaattcgaagctgaaggaag
cctatacctaaccctctcctcggctctcgattctacgcgtaccggtcacatcacaccatcaccattga
```

```
MGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQK GELNSKLEGKPILNPLLGLDSTRTGH
HHHHH.
```

Obr. 8: Aminokyselinová sekvence „fusion” proteinu s HIS Tagem na C konci.

4.5. Expres rekombinantního proteinu: Western Blot analýza

Transformované a indukované BL 21 Star *E. coli* byly sonikovány a následně použity pro SDS PAGE elektroforézu. Poté byla část gelu přenesena na membránu a metodou Western Blot byla ověřena exprese rekombinantního peptidu (Obr. 9).



Obr. 9: Expres rekombinantního proteinu: Western Blot analýza, – 1, 2, 3, 4, 5, 6 vzorky exprese, M – marker, WB – membrána.

Hledaný protein byl detekován ve dvou velikostech (kolem 30 a 20 kDa), což odpovídalo přítomnosti homodimerů.

4.6. Částečná „purifikace“ (rozdělení) hrubého lyzátu na koloně

Hrubý lyzát byl po sonikaci rozdělen na koloně Ultracel – 3k (cut – off 3,000). Pro další práci byla použita dolní (proteklá) frakce, která obsahovala rekombinantní melitin.

4.7. Měření koncentrace částečně „purifikovaného“ rekombinantního proteinu

Koncentrace částečně „purifikovaného“ rekombinantního proteinu byla změřena pomocí Bradfordovy metody. Bylo zjištěno, že frakce obsahující hledaný protein má koncentraci 196 µg/ml. Tato počáteční koncentrace byla použita pro další ředění v následujících experimentech.

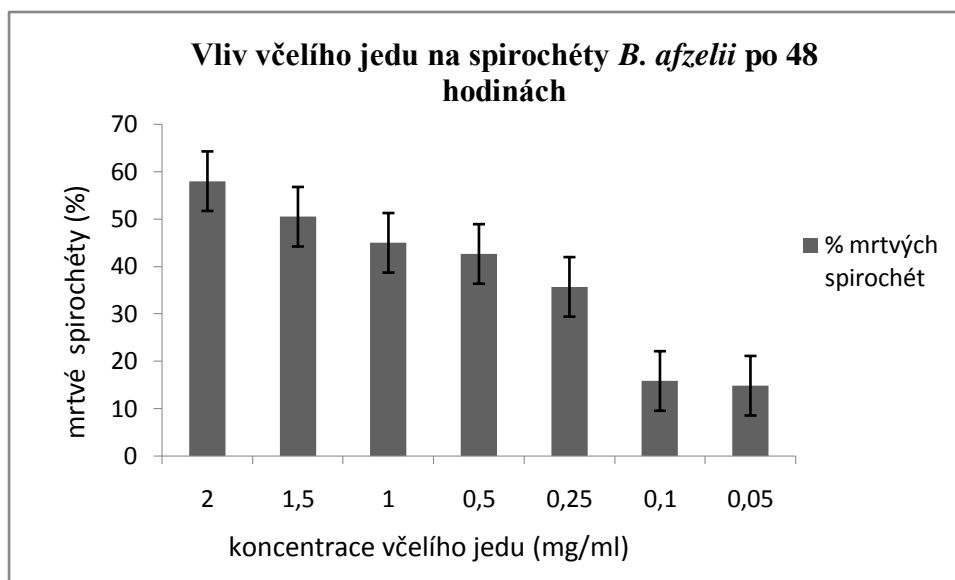
4.8. Vliv nativního včelího jedu na spirochéty *B. afzelii*, kmen CB 43.

Vliv včelího jedu na borelie byl vyzkoušen na kultuře CB 43 (*Borelia afzelii*). Padesát µl narostelé kultury *B. afzelii* CB 43 (10^7 /ml) bylo smícháno se včelím jodem (50 µl), v různých koncentracích (2.0, 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.10, 0.05 mg/ml). Bylo provedeno měření v různých inkubačních dobách (12, 24, 48 hodin). Výsledky byly vyhodnoceny pomocí průtokového cytometru a ukázaly, že melitin působí na spirochéty v závislosti na vzrůstající koncentraci a délce inkubace. Výsledky měření jsou představeny v tabulce VII a na obrázku 10.

Tab.VII: Vliv včelího jedu na *Borelia afzelii* CB 43 v různých inkubačních dobách.

Koncentrace jedu (mg/ ml)	Předpokládaná koncentrace melitinu (50 %)	Inkubace 12 hodin (% mrtvých buněk)	Inkubace 24 hodin (% mrtvých buněk)	Inkubace 48 hodin (% mrtvých buněk)
2	1	44,8		58,1
1,5	0,75	40,2		50,3
1	0,5	28,6		46,9
0,5	0,25	26,2		40,1
0,25	0,125	23,06		33,3
0,1	0,05		9,06	15,9
0,05	0,025		8,8	15,6

** hodnoty (%) naměřených mrtvých buněk jsou průměrem 3 jednotlivých měření.



Obr. 10: Vliv včelího jedu na spirochéty *B. afzelii*.

Z tabulky VII, Obr. 10 vyplývá, že vliv včelího jedu na spirochéty borelie se zvyšuje se vzrůstající koncentrací a časem. Jed zabíjí i při nejmenší vyzkoušené koncentraci 0,05 mg/ml po inkubační době 48 hodin až na 15,6 % buněk.

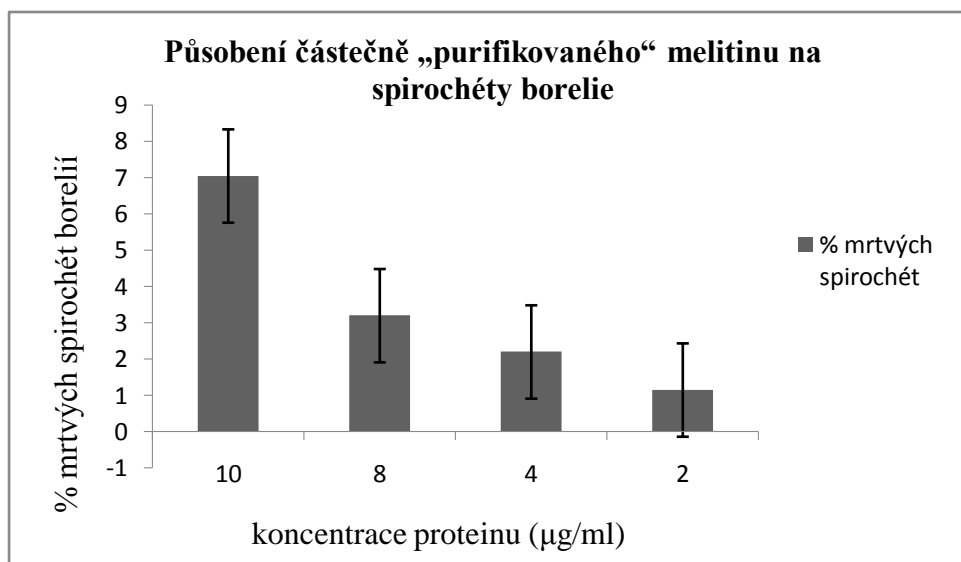
4.9. Ověření účinku částečně „purifikovaného“ rekombinantního melitinu na borelie

Vliv částečně „purifikovaného“ proteinu kódujícího melitin byl také vyzkoušen na spirochétách *B. afzelii*. Frakce proteinů obsahující rekombinantní melitin (původní koncentrace 196 $\mu\text{g/ml}$) byla naředěna (10, 8, 6, 4, 2 $\mu\text{g/ml}$) a smíchána s kulturou borelie $10^7/\text{ml}$ (1:1, totální objem vzorku 100 μl). Působení rekombinantního proteinu bylo měřeno po 48 hodinách inkubace při 34 °C. Výsledky byly vyhodnoceny průtokovým cytometrem a ukázaly, že částečně „purifikovaný“ rekombinantní melitin působí na spirochéty borelie i v malých koncentracích (Tab. VIII, Obr. 11).

Tab. VIII: Působení částečně „purifikovaného“ rekombinantního melitinu na spirochéty borelie.

Koncentrace proteinu ($\mu\text{g/ml}$)	Inkubace 48 hodin (% mrtvých buněk)
10	7,05
8	3,20
4	2,20
2	1,15

*hodnoty (%) mrtvých buněk jsou průměrem ze 3 jednotlivých měření.



Obr. 11: Vliv částečně „purifikovaného“ rekombinantního proteinu kódující melitin na spirochéty borelie.

Z tabulky VIII, Obr. 11 vyplývá, že částečně „purifikovaný“ rekombinantní melitin je aktivní a působí na spirochéty borelie i ve velmi malých koncentracích.

5. Diskuze

Lytické peptidy patří do skupiny látek, které se mohou používat k zabíjení poškozených buněk nebo buněk napadajících organismus. Několik těchto peptidů bylo zařazeno do skupiny potencionálních terapeutik.

Vědomosti o složení a způsobu činnosti včelího jedu jsou známi již 50 let, jeho léčebné účinky jsou využívány od pradávna, ale i přesto způsoby využití tohoto toxinu zůstávají relativně neprozkoumané.

Nejvíce zastoupená složka včelího jedu je melitin, toxická látka, která je zodpovědná za zabíjení buněk: napadá lipidovou dvojvrstvu membrány buněk, působí jako inhibitor růstu a má potencionální aktivitu i v lýze buněk. Ačkoliv je melitin nejvíce studovaný a známý včelí peptid, jeho vývoj pro klinické použití zůstává hlavně v preklinické fázi. V současné době není k dispozici žádný farmaceutický produkt používaný člověkem. Avšak některé patenty a slibné studie jsou zaměřené na bakteriální a virové infekce.

Melitin je antibakteriální peptid (AMP). AMP jsou látky přirozené imunity a objevují se prakticky v každém živém organismu, což svědčí o jejich roli v primární imunitní odpovědi (Andreu and Rivas, 1998). Jsou definovány jako peptidy složené z 12 – 50

aminokyselin, s molekulovou váhou menší než 10 kDa. Většinou jsou to pozitivně nabitě peptidy s nábojem molekuly od + 2 do + 7, protože hodnota bazických aminokyselin (arginin, lysin a histidin) přesahuje hodnotu kyselých aminokyselin (aspartát, glutamát). Zralý včelí melitin je peptid o molekulové hmotnosti 3200 Da, má pozitivně nabitý molekulový náboj (+ 3,91), skládá se z 26 aminokyselin a množství bazických aminokyselin (5) značně přesahuje množství aminokyselin kyselých (1).

Primární translační produkt melitinu obsahuje signální peptid, určený k exportu z buňky. V amfifilním zralém peptidu je amino – terminální oblast převážně hydrofobní a karboxylová oblast hydrofilní.

Antimikrobiální peptidy mohou zabít širokou škálu mikroorganismů, včetně gram – negativních a gram – pozitivních bakterií, hub, prvoků a virů. Jejich schopnost zabít mikroby je založená na kationovém náboji molekuly a na jejich peptidové struktuře. Vzhledem k jejich pozitivnímu náboji, jsou AMP přitahováni k aniontovým komponentám na povrchu lipidové membrány mikroorganismů. Objevení AMP a jejich role v boji proti mikrobiálním infekcím přivedl vědce k závěru, že AMP by mohly být základem pro novou skupinu klinických antimikrobiálních látek. Podle Carvalho a Machini (2013), mají AMP výhodné vlastnosti: jednoduchý metabolismus, nízkou mikrobiální rezistenci, antimikrobiální vlastnosti, synergický efekt při působení s jinými antibiotickými látkami a široké spektrum účinku. Bohužel AMP také mají své nedostatky. Hlavní překážkou je vysoká cytotoxická aktivita pro člověka a živočichy. Nicméně tento problém může být vyřešen prostřednictvím užívání rekombinantních genetických konstruktů nesoucích geny AMP. Tato rekombinantní technika částečné „purifikace“ funkčního melitinu byla i jedna z cílů této studie. V této práci byl melitin s 6x His – tag rozpoznávací sekvencí na C – konci zaklonován do expresního vektoru Champion pET/101 Directional TOPO. Exprimovaný fúzní protein, který má molekulovou hmotnost kolem 6530 Da, byl detekován pomocí metody Western Blot. Vliv rekombinantního melitinu na spirochéty borelií byl studován *in vitro* v pilotních experimentech a srovnán s působením nativního včelího jedu, v němž složka přírodního melitinu činí téměř 50 %.

Již dříve bylo prokázáno, že přírodní melitin vykazuje silné antimikrobiální vlastnosti, ale má také hemolytickou aktivitu a výrazné alergické účinky. Nicméně, bylo zjištěno, že lýza normálních buněk způsobená včelím melitinem může být blokována, a to přidáním galaktosaminu, glukosaminu nebo β – lactoglobulinu do buněčné reakce. Aminoskupiny se zdají být důležité pro blokaci melitinem zprostředkovanou lýzu, protože

glukosa, galaktosa a N – acetyl deriváty neprokazují žádnou inhibici (Killion and Dunn, 1986). Tudíž skutečnost, že hemolytická aktivita melitinu může být zastavena, ještě jednou zdůrazňuje potenciál melitinu v jeho uplatnění proti různým patogenům a tím i samotný význam aktuálního projektu.

Dříve již byly popsány antimikrobiální účinky apitoxinu produkovaného včelou medonosnou a jeho hlavních komponentů, fosfolipazy A2 a melitinu proti původcům zubního kazu, *Streptococcus salivarius*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis*, *Lactobacillus casei* a *Enterococcus faecalis* (Leandro et al., 2015). Melitin byl nejsilnější složkou apitoxinu (jedu), protože vykazoval velmi slibnou MIC hodnotu, od 4 do 40 µg/ml (4 µg/ml pro *L. casei*, 10 µg/ml pro *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus* and *S. mitis*, 6 µg/ml pro *E. faecalis* a 40 µg/ml pro *S. mutans*) a tím byla dokázána jeho potencionální aplikace proti orálním patogenům. V této práci melitin zabíjel bakteriální buňky i v tak malé koncentraci jako 2 µg/ml.

V další práci Alia et al. (2013) byly zkoumány MIC hodnoty melitinu proti gram – pozitivní *S. aureus* (ATCC 11632) a *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111) a gram – negativní *Salmonella enterica* (ATCC 7001) a *Yersinia kristensenii* (ATCC 33639). Bylo zjištěno, že nejmenší koncentrace melitinu (12,5 µg/ml) působí na *L. monocytogenes*, 25 µg/ml je MIC pro *S. aureus*, 100 µg/ml pro *S. enterica* a 200 µg/ml pro *Y. kristensenii*.

Vlivem melitinu na spirochéty borelií se zabývali i Lubke a Garon. Ve své publikaci z roku 1997 uvádí, že inhibiční vliv melitinu se projevil na spirochétách *B. burgdorferi* ve velmi krátkém čase od přidání melitinu do kultury, vytvořením puchýřků a bublin na povrchu spirochét. V této studii byla zkoumána minimální koncentrace melitinu, která působila na změny pohyblivosti spirochét. Bylo dokázáno, že koncentrace melitinu 100 µg/ml znehybní prakticky všechny buňky během 1 minuty po přidání. Snižováním koncentrace se zvyšovala pohyblivost spirochét, při koncentraci 10 µg/ml byla melitinem ovlivněna motilita 20 %. Autoři této studie neprokázali přesný způsob působení melitinu na spirochéty borelií, ale dokázali, že strukturální celistvost povrchové membrány spirochét borelie je velmi ovlivněna přidáním melitinu *in vitro*. Také změna pohyblivosti spirochét byla detekována velmi brzy po přidání melitinu.

V této práci jsme zkoumali vliv včelího jedu (melitinu) a rekombinantního částečně „purifikovaného“ melitinu v různých koncentracích na úmrtnost spirochét *B. afzelii* kmen CB 43. Výsledky byly vyhodnoceny pomocí průtokového cytometru, který určil

množství (%) mrtvých a živých spirochét. Bylo zjištěno, že nejvyšší použitá koncentrace jedu (2 mg/ml) zabila během 48 hodin 58 % spirochét, nejmenší koncentrace 50 µg/ml, (což odpovídá 25 µg/ml nativního melitinu) zabila 16 % spirochét během 48 hodin. V případě použití rekombinantního melitinu eliminace více než 7 % spirochét byla porovnána i při koncentraci 10 mg/ml za stejnou dobu působení. Při nejmenším, antimikrobiální potenciál rekombinantního melitinu je srovnatelný, pokud ne vyšší, než nativního melitinu jako součásti včelího jedu. Už dříve někteří autoři (Rios and Recio, 2005; Gibbons, 2008) určili měřítko (minimální inhibiční koncentraci) pro stanovení antimikrobiálního potenciálu různých látek. Tito autoři uvádějí, že MIC hodnoty nižší než 100,0 µg/ml jsou považovány za velice slibné při hledání nových anti – infekčních agens. Z toho vyplývá, že na základě obdržených hodnot se melitin může počítat za potenciální účinnou látku proti spirochétám borelií.

Rekombinantní technika purifikace funkčního melitinu by umožnila lepší přístup pro studium a produkci potencionálního léku. Expresse rekombinantního melitinu byla nedávno popsána v literatuře (Gui – Mei Kong et al., 2012; Shi et al., 2004). V obou případech byl rekombinantní melitin vyčištěn z rozpustných frakcí lyzátu *E. coli*. Navíc bylo dokázáno, že rekombinantní melitin získaný v bakteriálním expresním systému byl aktivní a inhiboval růst gram – pozitivní patogenní bakterie *Streptococcus pyogenes* (Buhrman et al., 2013).

V této práci byl také prováděn první pilotní experiment s cílem testování vlivu získaného fúzního proteinu melitinu na spirochéty Lymské boreliozy. Pro tento účel byl použit bakteriální systém (*E. coli*). Bylo zaznamenáno, že většina indukovaného proteinu v rozpustné frakci byla představena jako protein s větší velikostí reprezentující homodimery. Již bylo řečeno (Buhrman et al., 2013), že melitin je vysoce bazický peptid, který pokud je konstruovaný s „hexahistidin“ tag může změnit elektrostatické interakce a tím znemožnit narušení tvorby komplexů. To vysvětluje přítomnost homodimerů. Navíc, stejný důvod byl prezentován jako argument pro neúčinnost purifikace peptidu pomocí niklové chromatografie. To je důvod proč byla v této práci v pilotním experimentu prováděna částečná „purifikace“ (odseparování) rekombinantního proteinu pomocí celulózové membrány (30 kDa cut – off).

S ohledem na toxický účinek melitinu na bakteriální buňky byla testována rychlost růstu kultur *E. coli* s nebo bez přidání IPTG k posouzení, zda 6x His – melitin ovlivňuje růst *E. coli*. Jak bylo prokázáno dříve, indukce jiných rekombinantních proteinů pomocí IPTG

v *E. coli* vykazovala minimální působení na rychlost růstu buněk (Miroux and Walker, 1996). S touto skutečností se ztotožňují i poznatky této práce. Produkovaný fúzní protein nezpůsobuje významnou inhibici růstu bakteriálních buněk, což naznačuje, že 6x His fúzní melitin nemůže vytvářet póry v buněčných membránách, jelikož nebyla pozorována smrt buněk *E. coli*.

Všechny výsledky této práce týkající se působení melitinu na spirochéty Lymské boreliozy souhlasí s již dříve prokázanými vlastnostmi tohoto peptidu. Ale tato práce na rozdíl od dříve publikovaných ukazuje, že rekombinantní melitin má antimikrobiální účinky proti nejrozšířenějšímu druhu spirochéty komplexu *B. burgdorferi* sensu lato v Evropě i v koncentracích 10 krát nižších než dříve zkoumané.

Závěrem, tato práce se zabývala látkou s potencionálním využitím v nových baktericidních testech. Bylo dokázáno, že melitin působí proti boreliím. Protože tyto výsledky účinnosti rekombinantního melitinu proti spirochétám jsou první tohoto druhu, není srovnání s doposud publikovanými studiiemi možné. Jsou za potřebí další experimenty, které by zkoumaly toxický efekt rekombinantního melitinu na buňky. Následujícím krokem v pokračování tohoto studia bude optimalizace exprese rekombinantního melitinu v bakteriálním expresním systému a jeho purifikace.

Cíle budoucí práce v tomto směru budou:

- Optimalizovat stav purifikace rekombinantního proteinu.
- Odstrihnout fúzní část proteinu.
- Zjistit minimální koncentraci rekombinantního melitinu, která bude zabíjet spirochéty borelií na příkladu třech hlavních patogenních kmenů v Evropě, *B. burgdorferi* s. s., *B. garinii* a *B. afzelii*.
- Zkontrolovat toxický efekt melitinu na krevních buňkách člověka v minimálních koncentracích působících na borelie.

6. Závěr

Bylo prokázáno, že včelí jed působí na spirochéty borelie z komplexu *B. bugdorferi* s. l. v závislosti na vzrůstající koncentraci a času a to i v koncentracích výrazně nižších, než jsou dříve zkoumané (5 – 10 µg/ml). K objasnění působení včelího jedu byla vybrána *B. afzelii* CB 43 na základě jejího zvýšeného výskytu v České Republice.

S použitím nově navrhnutých PCR primerů v této práci, byl amplifikován a izolován z jedové žlázy včel medonosných (*Apis mellifera*) gen kódující melitin.

Expresí rekombinantního konstruktů v bakteriálním expresním systému se podařilo produkovat rekombinantní fúzní melitin, který zachoval antimikrobiální aktivitu.

V této práci byl poprvé studován vliv částečně „purifikovaného“ rekombinantního melitinu na spirochéty borelie. Bylo prokázáno, že frakce proteinů obsahující rekombinantní melitin působí na spirochéty borelií ve velmi malé koncentraci (2 µg/ml).

Včelí jed a jeho nejvíce zastoupená složka melitin má antibakteriální účinky, ale také působí na membrány krevních buněk. Ovšem v takto malých koncentracích by mohl být účinek melitinu na krevní buňky zanedbatelný. Proto je důležité zabývat se touto problematikou z hlediska vývoje vakcíny.

7. Literatura

- Adade, C. M., Oliveira, I. R., Pais, J. A. and Souto – Padrón, T.** (2013): Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. *Toxicon* 69: 227 – 239.
- Andreu, A. and Rivas, L.** (1998): Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47: 415 – 433.
- Aniruddha Mitra** (2013): Function of the Dufour's gland in solitary and social *Hymenoptera*. *J. Hymenopt. Res.* 35: 33 – 58.
- Balmelli, T., Piffaretti** (1995): Association between different clinical manifestations of Lyme disease and different species of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. *Res. Microbiol.* 146: 329 – 40.
- Baranton, G., Postic, D., Saint Girons, I., Boerlin, P., Piffaretti, J. C., Assous, M., Grimont, P. A.** (1992): Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 378 – 383.
- Bartůněk, P., Bojar, M., Calda, P., Diblík, P., Doutlík, S., Hančil, J., Hercogová, J., Hoza, J., Hulínská, D., Janovská, D., Valešová, M., Živný, J.** (1996): Lymeská borelióza. Nakladatelství: Grada Publishing. 9 – 12, 31 – 49.
- Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J.** (1999): Lékařská mikrobiologie. Nakladatelství: Marvil s.r.o. 190 – 192.
- Buhrman, J. S., Cook, L. C., Rayahin, J. E., Federle, M. J., Gemeinhart, R. A.** (2013): Active, soluble recombinant melittin purified by extracting insoluble lysate of *Escherichia coli* without denaturation. *Biotechnol Prog.* 29: 1150 – 1157.
- Canica, M.M., Nato, F., du Merle, L., Mazie, J. C., Baranton, G., Postic, D.** (1993): Monoclonal antibodies for identification of *Borrelia afzelii* sp. nov. associated with late cutaneous manifestations of Lyme borreliosis. *Scand. J. Infect. Dis.* 25: 441 – 448.
- Carvalho, L. A. C. and Machini, M. T.** (2013): Hemocidinas derivadas da hemoglobina: Estruturas, propriedades e perspectivas. *Quim Nova.* 7: 1021 – 1029.
- Casjens, S. R., Fraser-Liggett, C. M., Mongodin, E. F., Qiu, W. G., Dunn, J. J., Luft, B. J., Schutzer, S.E.** (2011): Whole genome sequence of an unusual *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolate. *J. Bacteriol.* 193: 1489 – 1490.

- Eisenberg, D., Terwilligert, T. C.** (1981): The structure of Melittin. *J. Biol. Chem.* 257: 6016 – 6022.
- Fukunaga, M., Hamase, A., Okada, K., Nakao, M.** (1996): *Borrelia tanukii* sp. nov. And *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. *Microbiol. Immunol.* 40: 877 – 881.
- Gajski, G., Garaj – Vrhovac, V.** (2013): Melittin: A lytic peptide with anticancer properties. *Environ. Toxicol. Phar.* 36: 697 – 705.
- Gui-Mei Kong X-RZ, Ke-Yan Wu, Yue-Xiao Laio, Ping Bo.** (2012): Anti – proliferative activity of recombinant melittin expressed in *Eschericia coli* toward U937 cells. *Afr. J. Biotechnol.* 11:3026 – 3030.
- Hood, J. L., Jallouck, A. P., Campbell, N., Ratner, L., Wickline, S. A.** (2013): Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. *Antiviral Therapy.* Vol. 19: 95 – 103.
- Chu C. Y., Liu W., Juany B. G., Wang D. M., Juany W. J., Zhao Q. M., Zhang P. H., Wang Z. X., Tang G.P., Yang H., Cao W.C.** (2008): Novel genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato from rodents and ticks in southwestern China. *J. Clin. Microbiol.* 46: 3130 – 3133.
- Ivanova, L. B., Tomova, A., González-Acuña D., Murúa, R., Moreno, C. X., Hernández, C., Cabello, J., Cabello, C., Daniels, T. J., Godfrey, H. P., Cabello, F. C.** (2014): *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environ. Microbiol.* 22: 10.1111/1462-2920.12310.
- Kato, M.** (1994): Caste-specific and age-related toxic activities of honeybee venom on the same species of honeybees. *Honeybee Sci.* 15: 119 – 122.
- Kawabata, H., Masuzawa, T., Yanagihara, Y.** (1993): Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp.nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. *Microbiol. Immunol.* 37: 843 – 848.
- Krbková, L.** (2007): Lymeská borelióza. *Med. prax.* 5: 200 – 203.
- Křupka, M., Raška, M., Weigl, E.** (2008): Lymeská borelióza – biologie, patogeneze, diagnostika a léčba. *Dermatol. prax.* 1: 236 – 239.
- Leandro, L. F., Almeida, R., Casemiro, L. A., Cunha, W. R., Martins, C., Mendes, C. A., Vinholis, A.** (2015): Antimicrobial activity of apitoxin, Melittin and phospholipase A2

of honey bee (*Apis mellifera*) venom against oral pathogens. An. Acad. Bras. Ciênc. 87: 147 – 155.

Le Fleche, A., Postic, D., Girardet, K., Péter, O., Baranton, G. (1997): Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. Int. J. Syst. Bacteriol. 47: 921 – 925.

Lubke, L. L. and Garon, C. F. (1997): The antimicrobial agent melittin exhibits powerful *in vitro* inhibitory effects on the Lyme disease spirochete. J. Clin. Infect. Diseases. 1:48 – 51.

Marconi, R. T., Liveris, D., Schwartz, I. (1995): Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. J. Clin. Microbiol. 33: 2427 – 2434.

Margos, G., Vollmer, S. A., Kornet, M., Garnier, M., Fingerle, V., Wilske, B., Bormane, A., Vitorino, L., Collares-Pereira, M., Drancourt, M., Kurtenbach, K. (2009): A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. Appl. Environ. Microbiol. 75: 5410 – 5416.

Margos, G., Hojgaard, A., Lane, R. S., Cornet, M., Fingerle V., Rudenko, N., Ogden, N., Aanensen, D. M., Fish, D., Piesman, J. (2010): Multilocus sequence analysis of *Borrelia bissettii* strains from North America reveals a new *Borrelia* species, *Borrelia kurtenbachii*. Ticks Tick Borne Dis. 1: 151 – 158.

Masuzawa, T., Takada, N., Kudaken, M., Fukui, T., Yano, Y., Ishiguro, F., Kawamura, Y., Imai, Y., Ezaki, T. (2001): *Borrelia sinica* sp. nov., a Lyme disease – related *Borrelia* species isolated in China. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51: 1817 – 1824.

Miroux, B., Walker, J. E. (1996): Over – production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. J. Mol. Biol. 260: 289 – 298.

Oršolić, N. (2012): Bee venom in cancer therapy. Cancer Metastasis Rev. 31: 173 – 194.

Owen, M. D. and Plaff, L.A. (1995): Melittin synthesis in the venom system of the honey bee (*Apis mellifera* L.). Toxicon 33: 1181 – 1188.

- Postic, D., Ras, N.M., Lane, R.S., Hendson, M., Baranton, G.** (1998): Expanded diversity among Californian *Borrelia* isolates and description of *Borrelia bissettii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). *J. Clin. Microbiol.* 36: 3497 – 3504.
- Postic, D., Garnier, M., Baranton, G.** (2007): Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int. J. Med. Microbiol.* 297: 263 – 271.
- Ras, M. N., Baranton, G., Cutler, S. J., Lascola, B., Postic, D., Raoult, D., Rodhain, F.** (1996): Phylogenesis of relapsing fever *Borrelia* spp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 859 – 865.
- Richter, D., Postic, D., Sertour, N., Livey, I., Matuschka, F. R., Baranton, G.** (2006): Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu lato species by multilocus sequence analysis and confirmation of the delineation of *Borrelia spielmanii* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 873 – 881.
- Roat, T. C., Nocelli, R. C. F. and Cruz-Landim, C.** (2006): Ultrastructural modifications in the venom glands of workers of *Apis mellifera* L. (*Hymenoptera: Apidae*) promoted by topical application of juvenile hormone. *Neotrop. Entomol.* 35: 469 – 476.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Lin, T., Gao, L., Grubhoffer, L., Oliver, Jr., H.J.** (2009a): Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex, *Borrelia americana* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 47: 3875 – 3880.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver, Jr., H. J.** (2009b): *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex from the southeastern region of the United States. *J. Clin. Microbiol.* 47: 134 – 141.
- Samuels, D. S; Radolf, J. D. (editors),** (2010): *Borrelia: Molecular Biology, Host Interaction and Pathogenesis.* Chapter 6, Structure, Function and Biogenesis of the *Borrelia* Cell Envelope". Caister Academic Press. ISBN 978-1-904455-58-5.
- Sedlák, K., Tomšíčková, M.** (2006): *Nebezpečné infekce zvířat a člověka.* Nakladatelství Scientia. 30 – 31.
- Schmidt, J.O.** (1995): Toxinology of venoms from the honeybee genus *Apis*. *Toxicon* 33: 917 – 927.
- Strle, F., Cimperman, J., Lotrič – Furlan, S., Maraspin, V., Ružić – Sabljčić, E.** (2006): Comparison of findings for patients with *Borrelia garinii* and *Borrelia afzelli* isolated from cerebrospinal fluid. *Clin. Infect. Dis.* 43: 704 – 710.

Shi W. J., Xu H. J., Cheng, J. A, Zhang, C. X. (2004): Expression of the melittin gene of *Apis cerana cerana* in *Escherichia coli*. *Protein. Expr. Purif.* 37: 213 – 219.

Teixeira, V., Feio, M. J., Bastos, M. (2012): Role of lipids in the interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Prog. Lipid. Res.* 51: 149 – 177.

Titěra, D. (2006): Včelí produkty mýtů zbavené. Nakladatelství Brázda. 153 – 160.

Veselý, V., Bacílek, J., Čermák, K., Drobníková, V., Haragsim, O., Kamler, F., Krieg, P., Kubišová, S., Peroutka, M., Ptáček, V., Škrobal, D., Titěra, D. (2013): Včelařství. Nakladatelství Brázda. 22 – 23.

Wang, G., van Dam A. P., Le Fleche, A., Postic, D., Péter, O., Baranton, G., de Boer, R., Spanjaard, L., Dankert, J. (1997): Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisianasp. nov.* (*Borrelia* genomic groups VS116 and M19). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 926 – 932.

Internetové zdroje

Bogdanov, S. (2015): Bee venom. (citováno 27.1.2016), <http://www.bee-hexagon.net/honey/honey-for-medicine-health/>.

Oždian, T. (2013): Včela medonosná. (citováno 20.1.2016), <http://vcelamedonosnagc.blogspot.cz/?view=sidebar>.

Pritt, B. S., Mead, P. S., Johnson, D. K. H., Neitzel, D. F. et al. (2016): Identification of a novel pathogenic *Borrelia* species causing Lyme borreliosis with unusually high spirochaetaemia: a descriptive study. *Lancet Infectious Diseases*, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00464-864-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00464-864-8).

Přidal, A. (2001): Zařazení včel do zoologického systému. (citováno 10.1.2016), <http://user.mendelu.cz/apridal/skripta/images/system.gif>.