

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



In vitro metody studia imunitního systému včel

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Michaela Svitáková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Danihlák Jiří, Ph.D.
Rok:	2017

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

V Olomouci dne 11. 5. 2017

Ráda bych tímto poděkovala panu Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D., vedoucímu mé bakalářské práce, za odborné vedení, doporučení literatury a poskytnuté konzultace, které mi pomohly k vypracování teoretické i experimentální části bakalářské práce. Děkuji také celému kolektivu Katedry biochemie za všestrannou pomoc při práci v laboratoři.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Michaela Svitáková
Název práce	<i>In vitro</i> metody studia imunitního systému včel
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Danihlík Jiří, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017

Abstrakt

Včely se řadí mezi hospodářsky velmi významnéopylovatele, proto ztráty včelstev jsou velmi znepokojivým trendem. Aby škody, které včelaři a zemědělci za poslední léta zaznamenali, byly co nejmenší, je třeba dále studovat imunitní systém včel, což by mohlo vést k aplikaci poznatků základního výzkumu do praxe. V teoretické části bakalářské práce je shrnut imunitní systém včel (*Apis mellifera*). Imunitní systém jednotlivých včel se skládá z 1) fyzikálních bariér, 2) buněčné imunity, 3) humorální imunity. Nejen patogeny či paraziti, ale také oxidační stres způsobený mnoha faktory, mají přímý dopad na zdraví včel. Ke snižování oxidačního stresu mají organismy vyvinuté obranné mechanismy, jejichž součástí jsou i antioxidantní enzymy katalasa a superoxid dismutasa. K humorální imunitě také patří antimikrobiální peptidy, v hemolymfě včel jsou obsaženy známé antimikrobiální peptidy apidaeciny, abaecin, defensiny a hymenoptaecin.

V praktické části byla spektrofotometricky stanovena specifická aktivita enzymu katalasy jak u klinicky zdravých včel odebraných přímo ze včelstev, tak u včel krmených v *in vitro* podmínkách potravou obsahující 50% sacharosu, 50% sacharosu a pyl a také potravu obohacenou o přirozené včelí patogeny *Paenibacillus larvae* a *Ascosphaera apis*. Ve vzorcích včel krmených *in vitro* byla hodnota specifické aktivity katalasy nejvyšší v případě, že potrava obsahovala 50% sacharosu s pylem. U včel, které byly odebrány přímo ze včelstev, se hodnoty specifické aktivity katalasy lišily pouze v homogenizovaných zadečcích v rámci včelstva 23 mezi porovnávanými odběrovými měsíci.

Pro detekci antimikrobiálních peptidů v hemolymfě, byla optimalizována metodagelové elektroforézy a následná imunodetekce antimikrobiálních peptidů abaecinu a defensinu1 metodou Western blot. Pro vizualizaci proteinů na gelech bylo optimální barvení koloidním Coomassie Brilliant Blue-G250. Antimikrobiální peptidy detekované metodou Western blot byly nejlépe vizualizované na nitrocelulosevé membráně blokované roztokem 5% BSA. Celý postup je ovšem potřeba dále optimalizovat.

Klíčová slova	Včela medonosná, imunita, antimikrobiální peptidy, katalasa
Počet stran	82
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Michaela Svitáková
Title	<i>In vitro</i> methods of research of honey bee immunity
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Danihlík Jiří, Ph.D.
The year of presentation	2017

Abstract

Honey bees are very important pollinators and so the decline of bee colonies is alarming. To minimize the damage caused to beekeepers and farmers in the last years it is necessary to proceed with research of bee immune system, which could lead to the application of the basic research results into the practice. The theoretical part of the bachelor's thesis describes the immune system of honey bees (*Apis mellifera*). The immune system of a bee consists of 1) physical barriers, 2) cellular immunity, 3) humoral immunity. Not only pathogens or parasites, but also oxidative stress caused by many factors, have direct influence on health of bees. The organisms develop protective mechanisms to reduce oxidative stress, which include also antioxidative enzymes catalase and superoxide dismutase. The humoral immunity incorporates also antimicrobial peptides, the well-known antimicrobial peptides of haemolymph are apidaecins, abaecin, defensin and hymenoptaecin.

In the practical part of the bachelor's thesis the specific activity of enzyme catalase was determined by spectrophotometry, as of clinically healthy honey bees taken directly from the bee colonies, as of the *in vitro* honey bees fed by the nourishment containing 50% of sucrose, 50% of sucrose with pollen and also by nourishment enriched with natural bee's pathogens *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis*. In the specimens of bees nourished *in vitro* was the highest figure of specific activity of catalase in the cases nourished by 50% of sucrose with pollen. The levels of catalase specific activity of the bees taken directly from the bee colonies were different only in homogenized bee abdomens in the bee colony 23 between compared months.

The method of gel electrophoresis was optimized and subsequent immunodetection of antimicrobial peptides abaecin and defensin 1 by the Western blot method to detect antimicrobial peptides in haemolymph. To make the proteins within the gels visible the staining with colloid Coomassie Brilliant Blue-G250 was optimal. Antimicrobial peptides detected by the Western blot method were preferably visualized on nitrocellulose membrane blocked by 5% solution of BSA. It will be necessary to

further optimize the whole procedure.

Keywords	Honey bee, immunity, antimicrobial peptides, catalase
Number of pages	82
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	Úvod	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Imunitní systém včel	2
2.1.2	Sociální imunita	2
2.1.2.1	Hygienické chování a grooming	3
2.1.2.2	Sběr antimikrobiálních pryskyřic	3
2.1.2.3	Sekrece jedu jako obranné látky	4
2.1.2	Buněčná imunita	4
2.1.3	Humorální imunita	5
2.1.3.1	Lysozym	5
2.1.3.2	Lektiny	5
2.1.3.3	Koagulace	6
2.1.3.4	Fenoloxidasa	6
2.1.3.5	Antimikrobiální peptidy (AmP)	7
2.1.4	Antioxidační ochrana	10
2.1.4.1	Vybrané antioxidační enzymy	11
2.1.4.1.1	Katalasa	11
2.1.4.1.2	Superoxid dismutasa	12
2.1.4.1.3	Aktivita antioxidačních enzymů u včel	13
2.2	Včelí patogeny a paraziti a jejich vliv na zdraví včel a včelstev	14
2.2.1	Virózy včel	14
2.2.2	Bakteriózy včel	15
2.2.3	Houbová onemocnění	17
2.2.4	Vliv prostředí na antioxidační a imunitní systém včel	18
2.3	Složení hemolymfy včel	20
2.4	Chov včel <i>in vitro</i>	22
2.5	Metody měření složek humorální imunity hmyzu	23
2.6	Elektromigrační metody	25
2.6.1	Gelová elektroforéza	25
2.7	Izoelektrická fokusace	25
2.8	Western Blotting	26
2.9	Detekce celkových proteinů na polyakrylamidovém gelu po provedené elektroforéze	27
2.9.1	Detekce pomocí Coomassie Brilliant Blue	27
2.9.2	Fluorescenční detekce proteinů	29
2.9.3	Detekce proteinů stříbrem	29

2.9.4	Negativní barvení gelu zinkem s SDS a imidazolem	30
3	Experimentální část	31
3.1	Materiál	31
3.1.1	Použité chemikálie	31
3.1.2	Přístrojové vybavení	32
3.1.3	Biologický materiál	33
3.2	Metody	35
3.2.1	Stanovení kalibrace pro výpočet koncentrace proteinů	35
3.2.2	Stanovení aktivity CAT	36
3.2.2.1	Příprava vzorků včel pro stanovení aktivity CAT	36
3.2.2.2	Měření aktivity CAT	36
3.2.3	SDS-PAGE elektroforéza	37
3.2.3.1	Příprava vzorků	37
3.2.3.2	Příprava pufrů a gelů	37
3.2.3.3	Provedení SDS-PAGE elektroforézy	38
3.2.3.4	Detekce proteinů na gelech po provedení elektroforézy	39
3.2.3.4.1	Detekce Coomassie Brilliant Blue	39
3.2.3.4.2	Detekce stříbrem	39
3.2.3.4.3	Roztoky použité pro detekci	40
3.2.4	Western blot	40
3.2.4.1	Použité roztoky pro imunodetekci abaecinu a defensinu	41
3.2.5	Použité statistické metody	41
4	Výsledky a diskuze	42
4.1	Kalibrace pro výpočet koncentrace proteinů	42
4.2	Koncentrace proteinů v homogenizovaných tkáních včel	43
4.3	Stanovení specifické aktivity enzymu CAT	48
4.4	SDS-PAGE – porovnání metod vizualizace proteinů na gelech	54
4.5	Imunodetekce antimikrobiálních peptidů abaecinu a defensinu po Western blotu	59
5	Závěr	62
6	Literatura	63
7	Seznam použitých zkratk	71

Cíle práce

Vypracovat rešerši na téma signálních drah a regulace exprese a hladiny komponent humorální složky imunitního systému hmyzu se zaměřením na včelu medonosnou, včetně přehledu metod analýzy složek humorální imunity včel.

Optimalizace metod detekce antimikrobiálních peptidů elektroforetickými a imunochemickými metodami.

Analýza vybraných fyziologických a biochemických parametrů na vzorcích včel odebraných ze včelstev v různou roční dobu.

1 Úvod

Včely (*Apis mellifera*) jsou celosvětově jedním z nejrozšířenějších druhů společenského hmyzu. Hrají důležitou roli v opylování rostlin a v produkci medu, vosku, propolisu a dalších včelích produktů. Zdraví včel je v dnešní době velmi diskutovaným tématem. V mnoha zemích dochází k významným ztrátám včelstev, jejichž příčiny nejsou doposud spolehlivě objasněny. Pokles počtu včelstev nebo jejich slábnutí je zřejmě ovlivněno řadou patogenů a parazitů včetně bakterií, hub, virů, prvoků nebo roztočů. Vůči řadě z nich nebyla dosud nalezena funkční léčba. Na zdraví včelstev mají neblahý dopad také xenobiotika, která se do těla mohou dostat přímým kontaktem, vdechováním nebo potravou. Tyto látky jsou součástí různých pesticidů, které vznikají při průmyslové výrobě nebo jinou lidskou činností.

U včel se vyvinula kaskáda obranných úrovní, které se v rámci vrozeného imunitního systému dělí na fyzikální bariéry, buněčnou a humorální imunitu zahrnující profenoloxidasový aktivační systém, produkci reaktivních forem kyslíku, či antimikrobiálních peptidů. Důležitou úrovní imunitního systému sociálního hmyzu je i tzv. sociální imunita, která je založena na specifickém chování jedinců v úlu nebo obecněji v hnízdě. Pro lepší pochopení ztrát včelstev nebo jejich nevysvětlitelného slábnutí, je třeba různými metodami zkoumat včelí imunitní systém a jeho změny v reakci na různé podmínky, jako např. interakce antimikrobiálních peptidů s patogenními mikroorganismy, nebo expresi důležitých proteinů vlivem oxidačního stresu.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Imunitní systém včel

Imunitní systém je důležitý pro udržení integrity organismu, představuje obranu proti vnějším a vnitřním cizorodým biologickým vlivům a patří k homeostatickým mechanismům organismu (Hořejší a Bartůňková, 2009). Poruchy homeostatických stavů, které mohou způsobit jednotlivým včelám nebo celým včelstvům problémy, se projevují jako nemoci (Tautz, 2010).

Nemoci včel dělíme podle jejich výskytu na nemoci včelího plodu a dospělých jedinců. Jsou to onemocnění nenakažlivá (např. průjem, zácpa), která se nedají přenést na okolní včelstva, ale i onemocnění nakažlivá, která je možno přenést na ostatní jednotlivce ve včelstvu nebo na sousední zdravá včelstva. Nakažlivá onemocnění dělíme podle původců na infekční a invazivní (parazitární). Infekční onemocnění jsou způsobena patogeny - viry, bakteriemi a houbami. Příčinou invazivních onemocnění včel jsou především prvoci a roztoči. Nemoci plodu nelze přenést na dospělé včely a naopak, dospělé včely jsou však schopny nemoci plodu přenášet, např. spory bakterie *Paenibacillus larvae*. Výjimkou je aspergilóza a varroóza. Těmito nemocemi může být postižen jak plod, tak i dospělé včely (Veselý *et al.*, 1985; Ebeling *et al.*, 2016).

Jelikož včely žijí v neustálém vzájemném kontaktu, postupem času se u nich vyvinul mechanismus ochrany, který lze rozdělit do tří úrovní (Tautz, 2010). Fyzikální bariéry jsou první obrannou složkou hmyzu, která napomáhá k ochraně dutin těla před vniknutím mikroorganismů. Tyto bariéry zahrnují kutikulu, stěnu střeva, tracheje a peritrofickou membránu, která se vyskytuje v trávicím traktu larev. Za druhou obrannou linií je považována buněčná imunita, která je propojena s poslední úrovní imunity - humorální imunitou (Antunez *et al.*, 2009).

2.1.2 Sociální imunita

Sociální hmyz může být považován za superorganismus, tedy skupinu příbuzných jedinců žijících v hnízdě. Někteří jedinci v hnízdě se chovají tak, že brání a chrání včelstva před patogeny a parazity. Tato obranná chování v rámci včelstev zahrnují hygienická chování, groominga sběr antimikrobiálních pryskyřic (Borba *et al.*, 2015). Život ve skupině tedy přináší řadu výhod oproti solitérnímu způsobu života.

Spolupráce jedinců tak může zvýšit účinnost v péči o plod, v hledání potravy nebo v obraně proti predátorům. Díky těmto výhodám se sociální hmyz (včely, vosy, mravenci, termity) stal na mnoha stanovištích dominantním druhem. Na druhou stranu, život ve skupině může přinést také řadu nevýhod, jako snadnější šíření infekčních onemocnění mezi jednotlivci (Cremer *et al.*, 2007).

2.1.2.1 Hygienické chování a grooming

Hygienické chování a čištění tzv. grooming jsou mechanismy, které ochraňují včelstva proti chorobám a parazitárním roztočům (Boecking a Spivak, 1990). Hygienické chování se užívá k popisu dvoustupňového procesu prováděného dělnicemi, kterým detekují mrtvé nebo nemocné larvy a kukly v plástu, ty pak následně odstraní (Lapidge *et al.*, 2002).

Grooming umožňuje jednotlivcům i skupinám včel ve včelstvu eliminovat nejen prach a pyl z těl, ale také odstranit případné ektoparazity. Toto chování zahrnuje kousání a lízání a pohyby středohrudních nohou. Tykadla jsou pečlivě čištěna pomocí nohou umístěných na předohrudí. Mnoho samočisticích aktivit (auto-grooming) včel je možné vidět na květinách, v letu, při sběru pylu a v úlu. Sociální grooming (allo-grooming) je prováděn mezi včelami navzájem a může být vyvolán tancem. Včely vykonávající tento typ pohybu jsou čištěny ostatními mladuškami, které tak například odstraňují foretické roztoče (*Varroa destructor*) z těla dospělých včel (Boecking a Spivak, 1999).

2.1.2.2 Sběr antimikrobiálních pryskyřic

Pryskyřice rostliny produkují, aby chránily mladé listové pupeny před patogeny a útoky býložravců. Tyto výměšky jsou tvořeny antimikrobiálními látkami (např. monoterpeny a flavonoidy), které hrají důležitou roli pro přežití rostlin (Borba *et al.*, 2015). Většina včel staví hnízda bez použití materiálů z prostředí, ovšem některé včely z čeledi Apidae (*Euglossa*, *Meliponin*, *A. mellifera*) často shromažďují pryskyřice a používají je buď samostatně, nebo ve směsi s voskem, jako stavební materiál (Nakamura a Seeley, 2006), který je nazýván propolis. Pokud včely mají hnízdo v dutinách stromů, obalí propolisem celý vnitřní povrch dutiny, vytvoří propolisový obal (Borba *et al.*, 2015). Včely tedy využívají propolis pro tmelení dutin a otvorů, někdy jím dokonce zužují česno úlu. Tento tmel je dobrou izolační látkou, která zároveň impregnuje dřevěné stěny úlu a

poskytuje ochranu proti dřevokazným houbám. Je to současně dobrý stavební materiál, kterým zpevňují namáhané části včelího plástu a okraje buněk (Veselý *et al.*, 1985).

2.1.2.3 Sekrece jedu jako obranné látky

Jedová žláza včel je důležitým zdrojem antimikrobiálních látek (Kuhn-Nentwig, 2003). Včelí jed je tvořen širokým spektrem molekul, od biogenních aminů až po proteiny a peptidy (Baracchi a Turillazzi, 2010). Polypeptid mellitin tvoří až 50 % sušiny včelího jedu. Apamin je další peptid izolovaný ze včelího jedu, který působí na nervovou soustavu. Mast cell degranulating peptid (MCD-peptid) narušuje biologickou aktivitu histiocytů, které jsou důležité pro imunologickou reakci živých organismů. Jed obsahuje nejen fosfolipasu A a B, což jsou hydrolytické enzymy, ale také bílkovinu minimin, která působí na hmyz jako inhibitor příjmu potravy, hmyz je nehybný, ale nehyne (Veselý *et al.*, 1985). Včelí jed je díky svým vlastnostem využíván jako léčivý prostředek. Je součástí mnoha léků i mastí, kterými se například léčí revmatické, svalové či kloubní potíže (Veselý *et al.*, 1985).

2.1.2 Buněčná imunita

Buněčnou imunitu představují hemocyty zahrnující buněčné obranné mechanismy fagocytózu, enkapsulaci a nodulaci (Borba *et al.*, 2015). Malé cizorodé částice jako bakterie nebo jednobuněčné houby jsou pohlceny fagocytózou, zatímco větší celky (shluky buněk, paraziti) jsou odstraněny procesem enkapsulace. Nodulace se pak uplatňuje jako odpověď na velké množství cizích buněk. Nodulace společně s enkapsulací jsou doprovázeny melanizací, která je katalyzována fenoloxidasou (PO; EC 1.14.18.1) (Ashida a Brey, 1997).

U hmyzu se vyskytuje šest typů hemocytů: prohemocyty, plasmatocyty, granulocyty (granulární buňky), koagulocyty (cytocyty), sferocyty a oenocytoidy (Lavine a Strand, 2002). Podle Kodríka (2004) se všechny typy hemocytů vyznačují přítomností jádra. Prohemocyty vykazují schopnost dělení, přičemž jde o velmi malé útvary. Granulocyty jsou buňky uplatňující se při srážení hemolymfy a v tvorbě nodulů. Jsou typické svým vysokým obsahem granulí vázaných v membránách. Plasmatocyty mohou taktéž obsahovat granule, na rozdíl od granulocytů hrají důležitou roli při fagocytóze a enkapsulaci patogenů, jedná se o nejčastěji se vyskytující typ hemocytů (Kodřík, 2004).

Nepřilnavé hemocyty zahrnují sferocyty a oenocytoidy obsahující složky PO kaskády (Strand, 2008).

2.1.3 Humorální imunita

Buněčnou a humorální imunitu nelze zcela oddělit, protože mnoho humorálních faktorů reguluje aktivitu hemocytů a naopak hemocyty produkují mnoho obranných molekul (Strand, 2008). Do humorální složky imunity patří antimikrobiální peptidy, jejichž syntéza je spouštěna přes signální dráhy (Toll, IMD, Jak-STAT), dále fenoloxidasová kaskáda, koagulace hemolymfy a produkce reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (RNS) (Borba *et al.*, 2015). Humorální imunita zahrnuje také imunitní proteiny jako lysozymy a lektiny (Ponnuvel and Yamakawa, 2002).

2.1.3.1 Lysozym

Tento enzym štěpí (lyzuje) β -(1,4)-glykosidickou vazbu mezi kyselinou N-acetylmuramovou (NAM) a N-acetylglukosaminem (NAG) ve vrstvě peptidoglykanu buněčné stěny bakterií. Lysozym (EC 3.2.1.17) patří mezi hydrolasy, což jsou enzymy katalyzující hydrolytické štěpení vazeb (Callewaert and Michiels, 2010). Molekulová hmotnost myšího lysozymu je 14 kDa, svou sekvencí se podobá lysozymu obratlovců (Vilmos and Kurucz, 1998). U včel se vyskytují tři typy lysozymu, dva c-(chicken) typy a jeden i-(invertebrate) typ (Evans *et al.*, 2006).

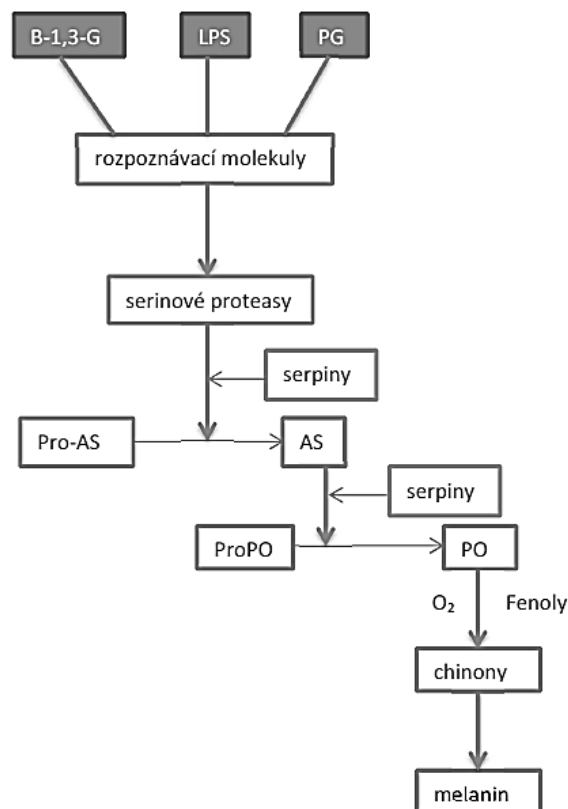
2.1.3.2 Lektiny

Lektiny hrají důležitou roli v nespecifickém obranném mechanismu bezobratlých živočichů, kteří nedokáží syntetizovat protilátky jako obratlovci (Kotani *et al.*, 1995). Jde o proteiny interagující se sacharidy. Tyto interakce jsou významné ve dvou odlišných aspektech imunitní odpovědi. Zahrnují jak rozpoznání patogenu, tak buněčné interakce vedoucí k zneškodnění patogenu. Mnohé z těchto proteinů patří do skupiny C-typu, tedy Ca^{2+} -dependentní skupiny (Kanost *et al.*, 2004). Lektiny purifikované z hemolymfy hmyzu lze považovat za multimerní proteiny (70 – 1500 kDa), jejichž podjednotky mají velikost 30 – 40 kDa (Gillespie *et al.*, 1997).

2.1.3.3 Koagulace

V reakci na vzniklá poranění kutikuly dochází u hmyzu k aktivaci koagulačního systému, který brání ztrátám hemolymfy z těla. Hlavním znakem koagulace je interakce mezi humorální a buněčnou prokoagulační aktivitou. U většiny hmyzu dojde k plné aktivaci srážení hemolymfy pouze za přítomnosti buněčných i prokoagulačních složek (Liet *al.*, 2002). Srážení utěsňuje rány a účinně brání vniknutí mikroorganismů a jejich šíření v dutině hemocoelu. V měkkém těle larev je rychlá koagulace nutností narozdíl od dospělých jedinců s tvrdou kutikulou, kdy ke koagulaci docházet nemusí. Je velmi pravděpodobné, že na procesu koagulace má také podíl PO, která ovlivňuje nejen zesíťování během uzavření a hojení ran, ale má také vliv na produkci cytotoxických látek vůči bakteriím (Bidlaet *al.*, 2005).

2.1.3.4 Fenoloxidasa



Obr. 1: Schéma PO kaskády. Aktivace profenoloxidasového aktivačního systému (Pro-AS), následná aktivace PO a konečná syntéza melaninu (upraveno dle Söderhäll a Cerenius, 1998; Eleftherianos a Revenis, 2011).

Nedílnou složkou vrozené imunitní odpovědi je také profenoloxidasový aktivační systém (Pro-AS) nebo také fenoloxidasová kaskáda (Obr. 1) vedoucí k syntéze melaninu, což je tmavá nerozpustná látka důležitá při ochraně vůči patogenům, při hojení ran i pro pigmentaci kutikuly. Fenoloxidasa (PO, EC: 1.14. 18.1) je enzym patřící do třídy oxidoreduktas (González-Santoyo a Córdoba-Aguilar, 2012) syntetizovaný ve formě neaktivního zymogenu profenoloxidasu (ProPO), který je postupně kaskádou aktivován molekulami obsaženými v buněčné stěně bakterií nebo hub (Zufelato, 2004). Molekulami aktivujícími ProPO mohou být β -1,3-glukany (BG), lipopolysacharidy (LPS) a peptidoglykany (PG) (Söderhäll a Cerenius, 1998).

Aktivní PO poté katalyzuje oxidaci fenolů, konkrétně o-difenolů, na toxické a vysoce reaktivní chinony, které podléhají neenzymatické polymerizaci na melanin. Proces melanizace vede k enkapsulaci mikroorganismů v hemolymfě a konečným produktem je barvivo melanin (Cerenius *et al.*, 2008). Molekulová hmotnost zymogenu ProPO je 70-80 kDa, tento protein obsahuje 2 atomy mědi, které tvoří místa pro navázání kyslíku. Po proteolytické aktivaci má PO molekulovou hmotnost 50-60 kDa. Sekvence aminokyselin ProPO je u členovců homologní s hemocyaniny, což jsou transportní proteiny bezobratlých, a hexameriny (zásobní protein). Serinové proteasy nazývané serpiny regulují kaskádu tak, že díky svým inhibičním účinkům zabraňují nadměrné a předčasné aktivaci. Enzymatickými reakcemi kaskády dochází k produkci několika látek jako např. cytotoxických chinonů, reaktivních meziproductů dusíku i kyslíku (González-Santoyo a Córdoba-Aguilar, 2012; Eleftherianos a Revenis, 2011).

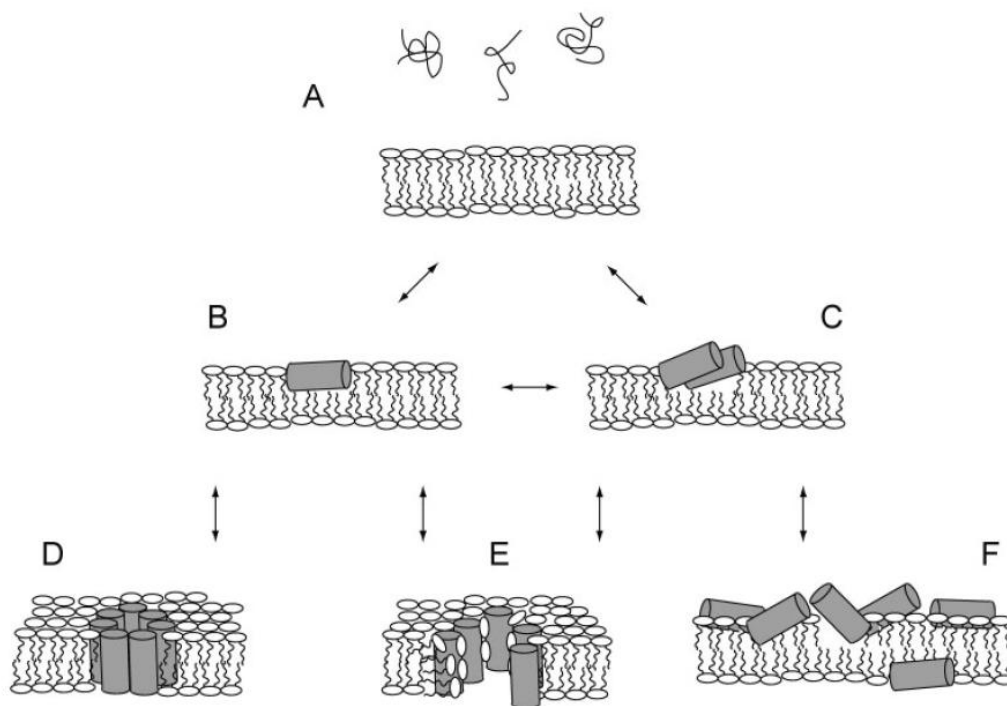
2.1.3.5 Antimikrobiální peptidy (AmP)

AmP tvoří důležitou obrannou složku všech organismů vůči napadení patogenů (Reddy *et al.*, 2004), zvýšená exprese jejich genů je stimulována infekcí (Klaudiny *et al.*, 2009). Dosud bylo identifikováno kolem 2770 AmP z toho přes 270 těchto peptidů u hmyzu (Guaní-Guerra *et al.*, 2010). AmP jsou utvářeny zejména v tukovém tělese, což je velký biosyntetický orgán hmyzu, dále v hemocytech, střevech, epiteliálních buňkách kutikuly, slinných žlázách a reprodukčním traktu (Vilmos a Kurucz, 1998).

Pokud je bakterie injektována do hemocoelu dochází k syntéze a vyplavení AmP do hemolymfy (Gillespie *et al.*, 1997). Dráhy vedoucí ke tvorbě AmP jsou aktivovány molekulami obsaženými ve stěnách mikrobů, u hostitelů tyto látky chybějí. Jedná se o

lipopolysacharidy nacházející se na povrchu Gram-negativních bakterií (G^-), peptidoglykany u Gram-negativních i Gram-pozitivních (G^+)bakterií a β -1,3-glukany, které jsou součástí buněčné stěny hub (Randolt *et al.*, 2008). AmP mohou být v hemolymfě detekovány již do 2-4 hodin po septickém zranění (Otvos, 2000).

Hmyzí antimikrobiální peptidy se skládají z méně než 50 aminokyselin, v jejich sekvenci se nacházejí aminokyseliny arginin a lysin, díky nimž převažuje pozitivní náboj a hydrofobní rezidua (přes 50 %) (Doležilková *et al.*, 2011). Kationické peptidy jsou dále děleny na lineární peptidy s α -helikální strukturou, AmP bohaté na cystein – obsahující disulfidické můstky a peptidy s převažující určitou aminokyselinou – bohaté na Pro, Gly, His (Vizioli a Salzet, 2002). AmP jsou molekuly amfipatické povahy, kromě hydrofobní složky obsahují také složku hydrofilní, která je kladně nabitá a interaguje se záporně nabitými membránami bakterií. Následně díky hydrofobní části peptidu mohou být v membránách vytvořeny póry, viz. Obr. 2 (Wuet *et al.*, 1999).



Obr. 2: Schématický přehled interakcí mezi AmP a buněčnou membránou. Na schématu A) – C) je membrána stále intaktní, schéma D) – F) znázorňuje membránu narušenou peptidy; A) přiblížení peptidů k membráně; B) při nízké koncentraci je peptid navázán jako monomer; C) při vysokých koncentracích se peptidy samovolně sdružují; D) tvorba pórů v membráně, tzv. model sudové skruže; E) model tyroidního póru, který je tvořen peptidy i lipidy; F) koberec model, nedochází k tvorbě pórů, ale k lokálnímu narušení membrány. Peptidy jsou navázány na lipidy hydrofobními částmi, zatímco hydrofilní část je odvrácena vně (převzato z Strandberg a Ulrich, 2004).

Prvním izolovaným AmP hmyzu byl cecropin, jehož název je odvozen od martináče cecropijského (*Hyalophora cecropia*), což je druh nočního motýla (Otvos, 2000). Jedná se o lineární amfipatický peptid s molekulovou hmotností 3-4 kDa (Vizioli a Salzet, 2002) účinný proti bakteriím, prvokům, parazitům i houbám (Reddy *et al.*, 2004).

U včely medonosné (*Apis mellifera*) dosud byly po infekci bakteriemi detekovány v hemolymfě AmP abaecin, apidaecin, hymenoptaecin a defensiny, v mateři kašičce royalisin, jelleiny a ve včelím jedu mellitin (Daníhlík *et al.*, 2015).

Defensinu hmyzu patří do rodiny AmP, pro kterou je charakteristický vzor šesti Cys s třemi disulfidickými můstky: Cys1-Cys4, Cys2-Cys5 a Cys3-Cys6. Hmyzí defensin obvykle obsahuje 36- 46 AMK, avšak u včel a čmeláků je složen z 51 AMK. Tento antimikrobiální peptid je velmi aktivní vůči širokému spektru G⁺bakterií, o něco méně působí na G⁻ bakterie (Bulet *et al.*, 1999). Defensiny v cílových membránách vytvoří póry, které umožní prostoupení peptidů do cytosolu buněk, čímž způsobí další intracelulární poškození (Ganz, 2003).

Apidaeciny a abaecin patří do skupiny AmP bohatých na prolin. Přestože apidaecin má kratší peptidový řetězec než abaecin (Bulet *et al.*, 1999) jejich sekvence AMK jsou velmi podobné. Tab. 1. Isoformy apidaecinu Ia, Ib, II a III byly poprvé izolovány z hemolymfy včely medonosné (*Apis mellifera*) a jsou nejvýznamnějšími součástmi humorální imunity včel (Li *et al.*, 2006). Obecně peptidy bohaté na Pro a Gly jsou aktivní vůči G⁻ bakteriím (Otvos, 2000). Kromě apidaecinu a abaecinu Casteels *et al.* (1993) identifikovali v hemolymfě včel hymenoptaecin, což je malý protein složený z 93 AMK inhibující převážně na G⁻ bakterie, ale také G⁺ bakterie.

Tab. 1: Aminokyselinová sekvence AmP abaecinu a apidaecinu (upraveno a převzato z Li *et al.*, 2006, Casteels *et al.*, 1990).

Typ AmP	Isoforma	Sekvence aminokyselin
Abaecin		YVPLPNVPQPGRRPFPTFPGQGPFNPKIKWPQGY
Apidaecin	Ia	GNNRPVYIPQRPPHPRI
	Ib	GNNROVYIPQRPPHPRL
	II	GNNRPIYIPQRPPHPRL
	III	GNNRPIYISQRPPHPRL

Tab. 2: Sekvence AMK jelleinů (upraveno dle Fontana *et al.*, 2004)

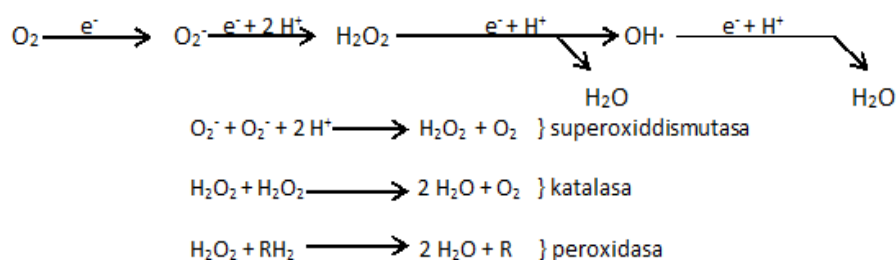
Typ AmP	Isoforma	Sekvence aminokyselin
Jelleiny	I	PFKISIH _L
	II	TPFKISIH _L
	III	EPFKISIH _L
	IV	TPFKISIH

Z mateří kašičky hmyzu byl izolován 5,5kDa AmP royalisin složený z 51 AMK, který patří do skupiny defensinů. Royalisin inhibuje nejen růst G^+ bakterií (např. *P. larvae*), ale současně má inhibiční vliv na růst hub (Tseng *et al.*, 2011). Dalšími čtyřmi typy AmP přítomnými v mateří kašičce jsou peptidy jelleiny (jellein-I, jellein-II, jellein-III a jellein-IV) složeny pouze z 8 – 9 AMK, větší část řetězce je hydrofobní. Tyto AmP se neliší pouze sekvencí AMK (Tab. 2), ale vyznačují se také rozdílnou inhibiční aktivitou vůči G^- i G^+ bakteriím a kvasinkám (Fontana *et al.*, 2004).

Mellitin je jednou ze složek včelího jedu. Jedná se o peptid složený z 26 aminokyselin, které jsou, s výjimkou hydrofilní sekvence (Lys-Arg-Lys-Arg) v blízkosti C-konce, hydrofobní. Mellitin poškozuje buněčné membrány, způsobuje rozklad erytrocytů, leukocytů i trombocytů (Ownby *et al.*, 1997).

2.1.4 Antioxidační ochrana

Vývoj aerobních metabolických procesů jako dýchání nebo fotosyntéza vedl k produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) v mitochondriích, chloroplastech a peroxisomech. Společným znakem různých typů ROS je jejich schopnost způsobit oxidační poškození DNA, lipidů i proteinů (Apel a Hirt, 2004). Tvorba ROS je stimulována různými faktory: stárnutí, vliv životního prostředí (polutanty, teplota, hypoxický stres) či běžné metabolické pochody (Lalouette *et al.*, 2011). Hmyz disponuje sadou antioxidačních enzymů a antioxidantů o malé molekulové hmotnosti, které mohou tvořit řetězové reakce jako odpověď na endogenně produkované oxidanty. Významné antioxidační enzymy hmyzu jsou superoxidodismutasa (SOD, EC: 1.15.1.1), katalasa (CAT, EC: 1.11.1.6), glutathiontransferasa a glutathionreduktasa. Mezi hydrofilní a lipofilní antioxidanty se řadí askorbát, glutathion, tokoferoly a karotenoidy (Felton a Summers, 1995).



Obr. 3: Univalentní (jednomocná) dráha redukce kyslíku a enzymatické obrany vůči reaktivním intermediátům kyslíku (upraveno dle Fridovich, 1978).

Reaktivní formy kyslíku jsou převážně redukováné formy atmosférického kyslíku (O_2). Obvykle jsou tyto intermediáty výsledky excitace kyslíku (O_2) za vzniku singletního kyslíku (O_2^1). Pokud dojde k převodu jednoho, dvou či tří elektronů na O_2 dojde ke tvorbě superoxidového anionradikálu (O_2^-), peroxidu vodíku (H_2O_2) nebo hydroxylového radikálu ($\text{HO}\cdot$) (Mittler, 2002).

2.1.4.1 Vybrané antioxidační enzymy

2.1.4.1.1 Katalasa

Enzym CAT (peroxid vodíku oxidoreduktasa, hyperoxidasa) je přítomen téměř ve všech organismech s aerobním metabolismem (Zámocký, 1998). Tento tetramerní enzym je složen ze čtyř tetraedrálně uspořádaných identických 60kDa podjednotek, kdy na jednu podjednotku připadá jedna ferriprotoporfyrinová skupina. Celková molekulová hmotnost enzymu je 240 kDa (Matés *et al.*, 1999). Hlavní úlohou CAT je ochrana buněk před vysoce reaktivními molekulami obsahujícími peroxidickou vazbu, které vznikají jako vedlejší produkty katabolismu (Zámocký, 1998). Celková reakce katalyzovaná CAT je rozklad dvou molekul peroxidu vodíku na vodu a kyslík, tuto reakci lze ovšem rozdělit do dvou fází, v závislosti na typu katalasy (Chelikani *et al.*, 2004).

Monofunkční katalasy (dříve označované jako typické katalasy)

Tento celkově nejrozšířenější typ katalas se skládá z tetramerních molekul s jedním protohemem. Monofunkční CAT vynikají vysokou katalytickou aktivitou a v menší

míře i dvouelektronovou peroxidasovou aktivitou (Zámocký, 1998). Monofunkční CAT dělíme do tří skupin. První skupina zahrnuje katalasy rostlinného původu. V druhé skupině jsou obsaženy enzymy bakteriálního a houbového původu. Z této skupiny jsou enzymy vysoce odolné vůči denaturaci a proteolýze. Malé podjednotky enzymů bakterií, hub a jiných eukaryot jsou součástí třetí skupiny monofunkčních CAT (Chelikani *et al.*, 2004).

Katalasy-peroxidasy

V porovnání s monofunkční CAT katalasy-peroxidasy disponují nižší katalasovou aktivitou, zvýšenou peroxidasovou aktivitou, širším pH a teplotním optimem. Tyto molekuly jsou většinou dimery o molekulové hmotnosti 120 – 340 kDa. Pro tento typ CAT je typické bifunkční chování. Obecně katalasy-peroxidasy přeměňují širokou škálu organických molekul v procesu peroxidace (Zámocký a Koller, 1999).

Katalasa obsahující mangan

Typ katalas, také známý pod názvem nehemové-katalasy, je celkově méně rozšířen než monofunkční CAT. Jeden typ této katalasy je obsažen v bakterii mléčného kvašení *Lactobacillus plantarum* a druhý v termofilním organismu *Thermus thermophilus*. Enzym se nachází v homohexamerní struktuře (Zámocký a Koller, 1999).

2.1.4.1.2 Superoxid dismutasa

SOD je všudypřítomný enzym účinně katalyzující superoxidové anionty, zároveň je považován za první ochranný enzym proti ROS (Zelko *et al.*, 2002). Působením tohoto enzymu je snižován oxidační stres, což má za následek zabránění poškození DNA, RNA, proteinů a lipidů. Katalyzuje přeměnu superoxidu na peroxid vodíku, který pak dále může být rozkládán katalasou. Superoxidový anionradikál, který má oxidační i redukční vlastnosti, podléhá dismutaci, kdy jedna jeho molekula poskytuje elektron molekule druhé, tím pádem se oxiduje a zároveň redukuje (Matoušková *et al.*, 2014).

V současné době jsou známy tři typy SOD, které katalyzují stejnou reakci. SOD1 neboli CuZn-SOD (EC 1. 15. 1.1) je homodimerní enzym obsahující měď a zinek, nachází se především v cytoplasmě eukaryotických buněk. SOD2 jinak také Mn-SOD (EC 1. 15. 1.1) je enzym tetramerní struktury lokalizovaný především v matrix

mitochondrií. Poslední z této rodiny enzymů je SOD3 tedy EC-SOD (EC 1. 15. 1.1) vyskytující se v extracelulárním prostoru (Zelko *et al.*, 2002).

2.1.4.1.3 Aktivita antioxidantních enzymů u včel

Weirich *et al.*(2002) zjistili, že enzymové aktivity v některých tkáních vykazovaly značné rozdíly ve vzorcích včel stejné kasty. Nelze určit přesnou příčinu, proč tomu tak je. Nicméně to naznačuje, že enzymová aktivita může být ovlivněna vnějšími nebo vnitřními faktory mezi jednotlivými dělnicemi, mladuškami a matkami.

Katalasová aktivita byla u všech kast nejvyšší v žaludku a o něco nižší ve spermatéce, v žaludku matky vykazovala CAT vyšší aktivitu než u dělnic a mladušek. Tento trend byl obdobný také ve spermatéce, kdy u matek byla naměřená aktivita až pětkrát vyšší než u mladušek. V hemolymfě je CAT aktivita obecně nižší než u ostatních tkání, u dělnic však byla o něco vyšší než u matek i mladušek. Svalová CAT aktivita byla marginální u dělnic, mladušek i matek (Weirich *et al.*, 2002).

Enzym SOD vykazoval oproti CAT mnohem vyšší aktivitu v již zmíněných tkáních u všech tří porovnávaných kast. V žaludku, hemolymfě ani spermatéce se však rozdíly mezi aktivitou signifikantně mezi jednotlivými kastami nelišily. Ve svalové tkáni matek dosahovala aktivita hodnoty až 60 mU/μg, zatímco u dělnic i mladušek byla hodnota poloviční. Naopak v žaludku byla aktivita SOD nejvyšší u dělnic (Weirich *et al.*, 2002).

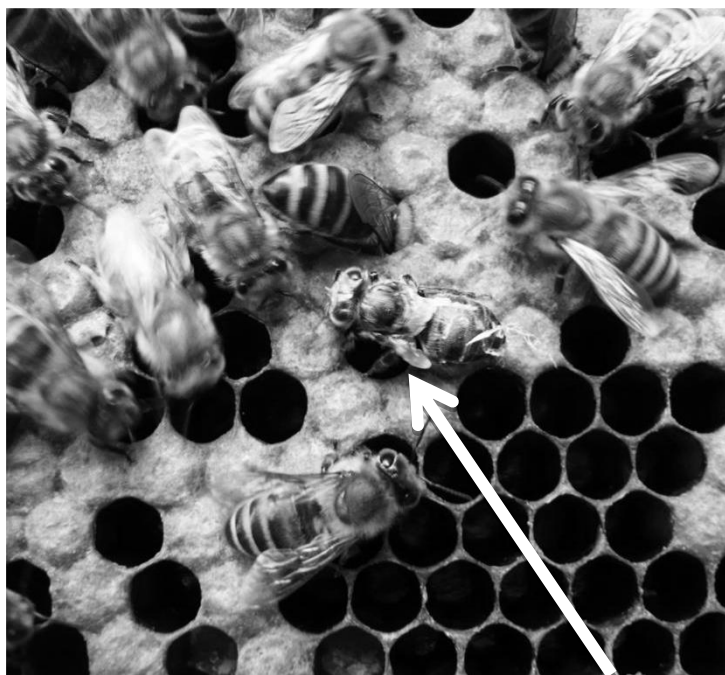
Lipinski a Zoltowska (2005) se ve své práci zabývali měřením aktivity antioxidantních enzymů SOD, glutathionperoxidasy (GPX), peroxidasy a plazmatického proteinu ceruloplasminu (Cp). Zkoumali trubčí plod ve fázi předkukly, který byl infikován roztočem *Varroa destructor*. Výsledky ukazují, že kvůli infestaci tímto parazitem byly hladiny aktivity SOD, GPX a Cp 2× – 4× vyšší ve srovnání se zdravými trubčími předkuklami.

2.2 Včelí patogeny a paraziti a jejich vliv na zdraví včel a včelstev

K rozsáhlému rozšíření včelích onemocnění došlo především v důsledku transportu včel. Nejznámějším příkladem je roztoč *Varroa destructor*, který byl přenes z včely východní (*Apis creana*) na evropskou včelu medonosnou (*A.mellifera*). Některé patogeny jako virus deformovaných křídel (DWV) nebo *Nosema ceranae* mají široké spektrum hostitelů a mohou napadat jak včely, tak čmeláky, zatímco jiné, jako bakterie *Paenibacillus larvae* nebo prvok *Crithidia bombi*, jsou hostitelsky specifické patogeny. Světově rozšířená onemocnění včel, která způsobují významné poklesy včelstev, mohou být způsobena jak viry, tak bakteriemi (Goulson *et al.*, 2015).

2.2.1 Virózy včel

Viry jsou nejmenší organismy (velikost v nm), které mají schopnost rozmnožování se v buňkách určitých tkání, způsobují jejich rozpad a následnou smrt infikovaného jedince (Veselý *et al.*, 1985). Do dnešní doby bylo u včel popsáno více než 18 virových nálezů, které mohou napadat včely nacházející se v různém období života i v odlišných kastách. Mezi světově nejrozšířenější choroby patří virus akutní paralýzy včel (ABPV), virus černání matečnic (BQCV), virus chronické paralýzy včel (CBPV), virus deformovaných křídel (DWV), Kašmírský virus (KBV) a virus pytlíčkovitého plodu (SBV) (Chen a Siede, 2007). Výskytem těchto virových onemocnění se v Německu zabývali Nielsen *et al.* (2008), přičemž nejvíce včelínů bylo napadeno SBV a nejméně BQCV a KBV.



Obr. 4: Fotografie včely, u které se projevila DWV. Na obrázku je možné vidět typické poničení křídel, které ukazuje šipka (fotografie použita se svolením autora Jiřího Danihlíka).

DWV jako i ostatní virová onemocnění přetrvává v latentním stavu bez jakýchkoli příznaků. Nemoc se projeví až ve spojení s kleštíkem včelím (*Varroa destructor*), po jehož napadení nejsou včely schopny přežít (Yue a Genersch, 2005). Typickými příznaky onemocnění jsou scvrklá a zmačkaná křídla (viz Obr. 4), zmenšení velikosti těla a ztráta barvy dospělých včel (Chen a Siede, 2007). K detekci tohoto onemocnění využili Yue a Genersch (2005) metodu reverzní transkripce s následným PCR (RT-PCR).

Vůči nákaze SBV jsou nejméně odolné dvoudenní larvy, nemoci však podléhají také dospělé včely a jejich plody. BQCV má vliv na rozvoj larev a kukel královny. Typickým společným symptomem těchto dvou onemocnění je žloutnutí a ztvrdnutí larev (Chen a Siede, 2007).

ABPV i CBPV se vyznačují stejnými příznaky, kterými jsou třes a neschopnost létat. CBPV je méně virulentní a včely hynou až po několika dnech od nákazy. ABPV je mnohem agresivnější, způsobuje hynutí již do jednoho dne (Chen a Siede, 2007).

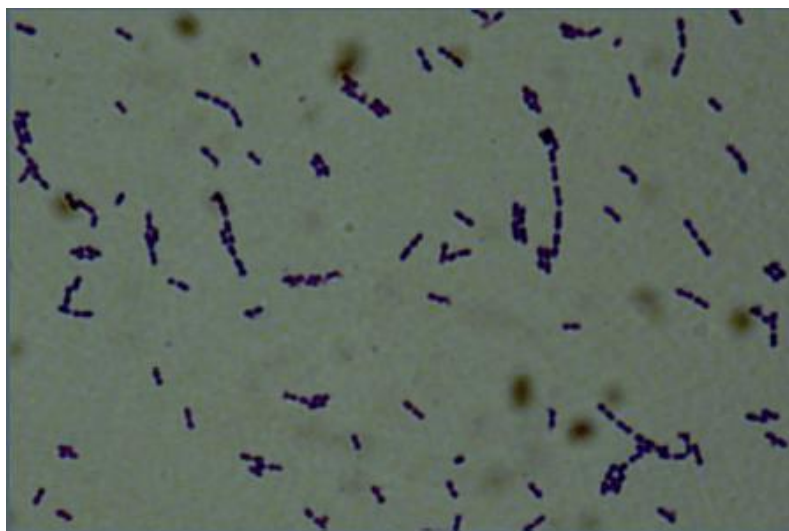
2.2.2 Bakteriózy včel

Hniloba včelího plodu: Nemoc je způsobena patogenní G^+ bakterií *Melissococcus plutonius* (Obr. 5). Jedná se o mírně protáhlé, na koncích zašpičatělé koky o průměru

0,8 μm , mohou se vyskytovat jednotlivě, tvořit řetízky nebo shluky. Nemoc se projeví již na nezavíčkovaném plodu. Po nákaze je barva larev změněna z bílé přes žlutou až na šedo-černou (Forsgren, 2010).

Mor včelího plodu: Za původce této střevní infekce je považován velice specifický patogen *Paenibacillus larvae*. Jedná se o G^+ , bičíkatou, sporulující bakterii, jejíž doposud jedinými známými hostiteli jsou larvy včel (Ebeling *et al.*, 2016). Klidové stadium v podobě spóry vnikne společně s potravou do gastrointestinálního traktu larvy (Veselý *et al.*, 1985), zde *P. larvae* přechází na komenzální životní styl (Genersch, 2010). Vyživuje se tedy z potravy požitá larvou. Peritrofní membrána v lumenu střeva brání průniku bakterie, která přes ni však může proniknout a v pozdějším stádiu infekce napadá také epitel. K poruše epitelu dochází paracelulární cestou, to znamená, že se buňky pohybují přes mezibuněčný prostor a vstupují do hemocoelu, kde jsou schopny pohybu a poliferace. Pro *P. larvae* je typické, že vylučuje vysoce aktivní extracelulární proteasy, které jsou potřebné k poškození larev (Genersch, 2010). Ze stádia schopného aktivního dělení přejde zpět do klidového stádia, ve kterém může přečkat i několik let (Veselý *et al.*, 1985).

V hemolymfě larev včel, které byly inokulovány bakterií *P. larvae*, došlo během 24 hodin ke zvýšení exprese nejen abaecinu, ale také defensinu (Evans, 2004). Účinnost antimikrobiálního peptidu defensinu proti *P. larvae* byla prokázána v testech inhibice růstu (Bíliková *et al.*, 2001; Bachanová *et al.*, 2002). Podle tvrzení Chan *et al.* (2009) by se dala očekávat zvýšená hladina některých AMP i antibakteriálních enzymů jako je PO a lysozym, který je významný svou funkcí degradovat peptidoglykanovou vrstvu G^+ bakterií.



Obr. 5: Bakterie *M. plutonius* po Gramově barvení (převzato z Forsgren, 2010).

2.2.3 Houbová onemocnění

Nosematóza: Včela medonosná (*A. mellifera*) může být infikována hmyzomorkou včelí (*Nosema apis*) a relativně nově i hmyzomorkou východní (*Nosema ceranae*) (Fries, 2010). Houba se dostane společně s potravou do středního střeva (žaludku), kde dochází k infekci epitelu žaludku pomocí pólového vlákna, které spora hmyzomorky vystřelí. V buňkách epitelu se houba množí, její spory jsou následně vylučovány s výkaly. Funkce střev se tak naruší (Lampeitl, 1996). Dle Chaimanee *et al.* (2012) dochází mezi 3. až 6. dnem po inokulaci hmyzomorkou k významnému poklesu exprese čtyř genů (apidaecinů, abaecinu, defensinu a hymenoptaecinu), to má tedy za následek celkové oslabení imunity včel. Takto napadené včely nejsou schopny trávit pyl, stárnou a předčasně hynou v důsledku vyčerpání tělesných zásob. Klinicky se nosematóza projevuje především v jarním období. Onemocnění indukuje špatná strava, nemožnost proletů včel během zimního období nebo celkové oslabení včelstva (Fries, 2010).

Zvápenatění včelího plodu: Zvápenatění včelího plodu je onemocnění projevující se nejčastěji v jarních měsících, jelikož pro růst hub jsou optimální chladné a vlhké podmínky. Jedná se o invazivní mykózu napadající včely, která je způsobena houbou *Ascospaera apis*. Tato parazitická houba usmrtí včelí larvu tím, že jí odčerpává důležité živiny (Aronstein a Murray, 2010). Do larev může *A. apis* proniknout formou potravy (výtrusnice, mycelium) nebo pokožkou. Klíčení výtrusů v těle probíhá v žaludku a v zadní části střeva (větší obsah kyslíku), kde vyrostou do dlouhých vláken. Mycelium se poté dostane přes střevní stěnu, vyplní tělní dutinu a prorůstá až na samotný povrch

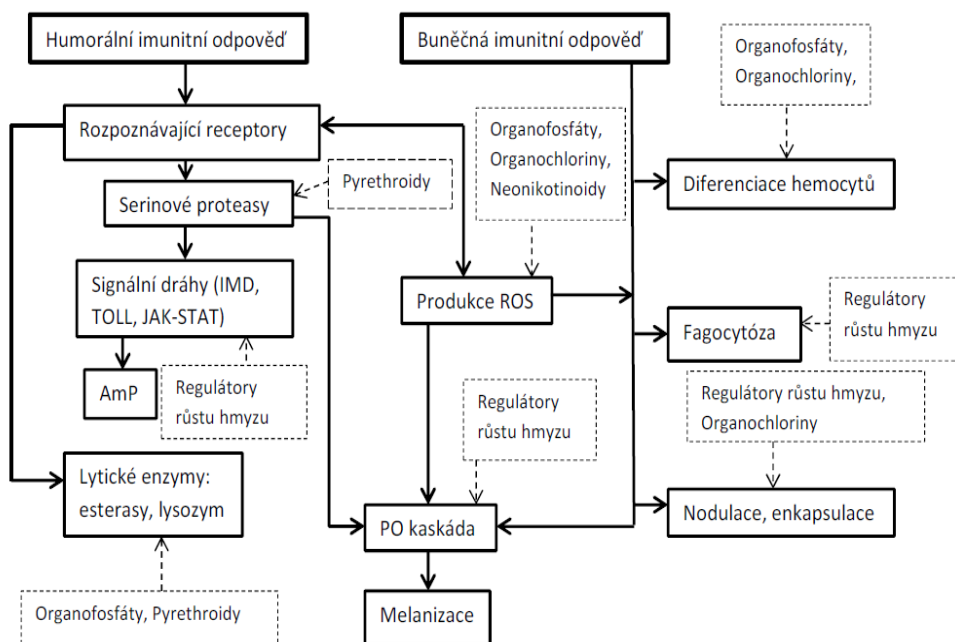
larvy, kde může vytvořit plodnice. Na onemocnění jsou nejcitlivější larvy staré 3-6 dnů, u dospělých včel se nákaza neprojeví, mohou ji však rozšiřovat. Spóry jsou velice odolné, přežívají v medu, pylu, vosku i na stěnách úlu. I když se zárodky *A. apis* ve včelstvech velmi často vyskytují, k samotnému onemocnění většinou dochází jen vlivem určitých podmínek, kterými mohou např. být pesticidy, nevhodná krmiva, oslabení včelstva jinou chorobou nebo špatné hygienické podmínky (Veselý *et al.*, 1985).

2.2.4 Vliv prostředí na antioxidační a imunitní systém včel

Všechny organismy jsou vystaveny působení cizorodých chemikálií nebo xenobiotik, mezi které patří průmyslové a přírodní chemikálie jako např. léčiva, pesticidy, polutanty, sekundární rostlinné metabolity např. alkaloidy. Xenobiotika se snadno vstřebávají kůží, plícemi nebo gastrointestinálním traktem, o to obtížněji se z organismu odstraňují (Parkinson, 2001).

Včely létavky urazí několik kilometrů, aby nasbíraly nektar, pyl, vodu a pryskyřice potřebné pro život v úlu. Během sběru se sběračky dostávají do úzkého kontaktu s toxickými látkami přírodního původu, tato xenobiotika následně vnášejí do včelstva. Příkladem může být sběr nektaru, obsahujícího mimo sacharidy potřebné pro včelstvo také látky syntetizované rostlinami. Pylkromě AMK a sterolů obsahuje také fenolické sloučeniny, které mohou vykazovat toxickou biologickou aktivitu (Johnson, 2015).

Dalšími látkami, které mají přímý dopad na imunitní systém včel, jsou pesticidy (James a Xu, 2012). Organofosfáty, které představují jeden z mnoha typů pesticidů, ovlivňují počet hemocytů i fagocytózu. Fagocytóza je obvykle doprovázena produkcí melaninu, což může být rychlejší proces než produkce AMP. To vede ke tvorbě ROS, které mohou přispět k eliminaci patogenů Obr. 6 (James a Xu, 2012).



Obr. 6: Schéma shrnující vliv insekticidů na imunitní systém včel. Plné obrysy rámečků a šipky znázorňují dráhy imunitního systému, přerušované obrysy rámečků a šipky vyznačují působení insekticidů na příslušné dráhy (převzato a upraveno dle James a Xu, 2012).

Nejnovější z hlavních tříd insekticidů jsou neonikotinoidy - thiacloprid, imidacloprid a klothianidin. Jde o neurotoxiny, které jsou agonisty nikotinových acetylcholinových receptorů (Henry, 2012), ovlivňují nervový systém a následně způsobují paralýzu i smrt (Goulson *et al.*, 2015). Brandt *et al.* (2016) dokázali, že subletální koncentrace těchto tří typů neonikotinoidů měly vliv na snížení koncentrace hemocytů, odpověď enkapsulace i antimikrobiální aktivitu hemolymfy, kdy byla testována její inhibice vůči G^+ bakterii *Micrococcus flavus*. Neonikotinoidní pesticidy jsou využívány k ochraně rostlin před mšicemi a jiným savým hmyzem (Henry, 2012).

Detoxifikační systém u zvířat, kterým se xenobiotika stávají méně škodlivá a jsou poté vyloučena, je dělen na tři fáze. Fáze I zahrnuje enzymy metabolizující xenobiotika, které jsou tvořeny monooxygenasami cytochromu P450. Enzymy II. fáze působí na produkty fáze I, zahrnují glutathion S-transferasy (GSTs), UDP-glukuronosyltransferasy (UGTs) a karboxylesterasy. Enzymy UGTs a GSTs se podílejí na přeměnách toxických látek, což má za následek zvýšení hydrofility, která usnadňuje jejich vylučování z těla. Pro zajištění detoxifikace jsou estery xenobiotik hydrolyzovány karboxylesterasami. Fáze III zahrnuje ABC transportér (anglicky ATPbinding cassette) a další membránové transportéry, díky kterým jsou konjugované toxiny aktivně vylučovány z buněk (Misra *et al.*, 2011).

2.3 Složení hemolymfy včel

Hemolymfa je vodná tělní tekutina, která roznáší po těle včely živiny, odplavuje odpadní produkty látkové přeměny k exkrečním orgánům, nadbytečné živiny přivádí hlavně k tukovému tělesu. Může být bezbarvá, čirá, obvykle ale bývá pigmentována a je tedy nažloutlá až hnědá (Kodrík, 2004). Tato tělní tekutina zaujímá asi $\frac{1}{4}$ z celkové hmotnosti těla, obsahuje buňky zvané hemocyty, které se podílí na imunitních reakcích, kvůli absenci erytrocytů nerozvádí po těle kyslík (Veselý *et al.*, 1985), pH je slabě kyselé (6,4 – 6,8), koncentrace solí (1,5 – 2,1 %), aminokyselin i peptidů je vyšší než u obratlovců (Kodrík, 2004). V hemolymfě jsou přítomny také sacharidy jako sacharosa, glukosa nebo trehalosa, které pocházejí z trávení potravy (Arslan *et al.*, 1986).

Další důležitou složkou jsou proteiny, které se liší různými funkcemi. Jejich obsah závisí na životním období daného jedince, obvykle koncentrace proteinů zaujímá 6 %, v posledním larválním instaru se může hodnota zvýšit až na 20 % (Kodrík, 2004). Proteiny plnící zásobní funkci jsou též nazývány storage proteiny, jejich molekulová hmotnost se pohybuje kolem 500 kDa, nejvíce jsou tedy zastoupeny v larválním stádiu, u dospělých jedinců se obsah snižuje. K tomuto typu proteinů řadíme např. arylphoriny, které jsou typické vysokým obsahem aromatických aminokyselin (18 – 26 %). Důležitým lipoproteinem pro transport lipidů mezi orgány hmyzu je lipophorin, který se v hemolymfě může nacházet ve dvou formách. První formou je HDLp (high-density lipophorin), který je v hemolymfě přítomen, pokud je hmyzu v klidu, naopak při vykonávání aktivity např. při dlouhém letu je vyplavován LDLp (low-density lipophorin). Tyto dvě formy se od sebe také liší tím, že LDLp má vyšší obsah tuku. Lipophoriny transportují širokou škálu lipidů, od triacylglycerolů až po cholesterol, jehož hlavními složkami jsou fosfolipidy a diacylglycerol. Lipidy jsou transportovány do rostoucích tkání nebo do tukového tělesa k uskladnění (Kanost *et al.*, 1990). Mezi lipophoriny patří také JHBP (juvenile hormone binding protein), který slouží k transportu juvenilního hormonu (Kodrík, 2004). Juvenilní hormon patří mezi gonadotropiny, ovlivňuje růst, reprodukci i životnost hmyzu. Dalším proteinem přítomným v hemolymfě je vitellogenin. Jde o glykolipoprotein s molekulovou hmotností 180 kDa syntetizovaný v samičích tukových buňkách a následně uvolněný do hemolymfy, má u dělnic antioxidační účinky (Yang a Cox-Foster, 2005).

Hemolymfa je také místem výskytu AmP, lysozymu, lektinů, tedy látek souvisejících s humorální imunitou. V této tělní tekutině bylo detekováno několik

proteinů inhibujících proteasy jako cystein proteasový inhibitor nebo serpiny, ty aktivují fenoloxidasovou kaskádu. Enzymy vyskytující se v plasmě hemolymfy jsou obvykle syntetizovány v hemocytech nebo tukovém tělese. Mezi nejvýznamnější enzymy obsažené v hemolyfě patří trehalasa, která katalyzuje hydrolysu důležitého sacharidu vyskytujícího se v hemolymfě, trehalosy (Kanost *et al.*, 1990).

2.4 Chov včel *in vitro*

Aby mohly být za podmínek *in vitro* studovány různé aspekty včel jako např. parazitologie, toxikologie nebo fyziologie za specifických podmínek, jsou včely chovány v laboratorních klíčkách buď jednotlivě, nebo ve skupinách. Williams *et al.* (2013) shrnuli optimální podmínky pro laboratorní chov včel.

Ideální klíčka sloužící k experimentálním účelům by měla být použita pouze jednou a poté zlikvidována, nebo lze použít sterilizovanou a vyčištěnou klíčku, což má za následek minimalizaci kontaminace patogeny a jinými zbytky z předchozích experimentů. Pro studie spojené s toxikologií pesticidů je doporučována klíčka jednorázová. Měla by být vyrobena z materiálů, které mohou být sterilizovány (nerezová ocel, sklo). Kovové a plastové klíčky mohou být dekontaminovány acetonem. Měly by mít dostatek větracích otvorů na ventilaci, které by měly být pokryty prodyšným materiálem (filtrační papír), aby se opět snížilo riziko kontaminace. Klíčky by měly umožňovat lehkou manipulaci s mrtvými včelami, aby mohly být snadno odstraněny. Velikost klíčky by měla být přizpůsobena počtu včel, např. 500 cm³ (500 ml) pojme až několik set dělnic. Pro skupinu méně než 100 jedinců se pro výběr uplatňuje velikost klece v poměru 3:1 (cm³/včela). Doporučená teplota pro chov dospělých jedinců je 30°C. Doporučená relativní vlhkost se pohybuje v rozmezí od 50 % do 70 %. Vlhkost uvnitř včelstva je ovlivněna nejen teplotou, ale i jednotlivými včelami. Včely v laboratoři jsou vždy udržovány v naprosté tmě. Nutností je také včelám zajistit přísun kyslíku. Oxid uhličitý dosahuje ve včelstvu vyšších hodnot než v atmosféře. Z důvodu výměny vzduchu je nutné zajišťovat větrání v klíčce (Williams *et al.*, 2013).

Pro chov včel je důležitý také přísun správné výživy, která má vliv na životnost a fyziologii. Důležitou složkou potravy pro včely jsou sacharidy a proteiny přijímané ve formě nektaru a pylu, dále vitamíny, minerály a lipidy. Dělnice chované *in vitro* jsou přikrmovány roztoky sacharosy, matkám je energie dodávána formou sacharosové pasty (Williams *et al.*, 2013).

2.5 Metody měření složek humorální imunity hmyzu

K detekci a kvantifikaci jednotlivých AmP byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC), díky které byly identifikovány peptidy jako hymenoptaecin, apidaecin i abaecin. Pro identifikaci těchto peptidů, byly testované včely infikovány životaschopnými bakteriemi *E. coli*, a po 24 hodinách jim byla odebrána hemolymfa. Metodou Edmanovy sekvenace byla stanovena aminokyselinová sekvence zmíněných peptidů (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1993). Další metodou je Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight (MALDI-TOF MS), kvantitativní hmotnostní spektrometrie, která byla použita například k porovnání obsahu melittinu, apaminu a MCD-peptidu v jedu matky, dělnic a ošetřovatelek, tedy mladých dělnic (Baracchi a Turillazzi, 2010), ale také pro zkoumání neuropeptidů v mozku včel (Pratavieira *et al.*, 2014). Turillazzi *et al.* (2006) pro izolaci dvou enzymů (dominulin A, dominulin B) z pokožky samic vosíka skvrnitého (*Polistes dominula*) použili metodu RP-HPLC i MALDI-TOF. Aminokyselinová sekvence potom byla zjištěna pomocí hmotnostní spektrometrie (Turillazzi *et al.*, 2006). Melittin, který je považován za jeden z nejdůležitějších AmP včelího jedu byl stanoven za použití HPLC a kapilární elektroforézy (CE) s detekcí pomocí UV nebo hmotnostní spektrometrie (MS). Kombinace HPLC-MS se prokázala jako rychlejší a citlivější pro kvantifikaci melittinu i v malé koncentraci (Zhou *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2015). Z různých vzorků včelích hlav, hrudníků a mateří kašičky byl elektroforetickou metodou v polyakrylamidovém gelu (PAGE) stanoven peptid royalisins antimikrobiálním účinkem vůči bakterii *P. larvae* (Bachanová *et al.*, 2002).

Metoda polymerasové řetězové reakce (PCR) byla využita pro ověření kandidátů imunitních genů včely medonosné a dále také pro stanovení jejich změny po interakci organismu s patogeny (Evans *et al.*, 2006). Chaimanee *et al.* (2012) kvantifikovali genovou expresi několika AmP u včel po inokulaci parazitem *N. ceranae* použitím kvantitativní PCR (qPCR). Tuto metodu použil také Yang a Cox-Foster (2005) ke stanovení míry genové exprese tří AmP (abaecinu, defensinu a hymenoptaecinu) a enzymů souvisejících s imunitou (PO a lysozym).

Pro studium detailů ve strukturách většiny známých AmP se jako velmi užitečná metoda projevila nukleární magnetická rezonance (NMR). Díky této analýze jsou známy trojrozměrné struktury a je tak snadnější porozumět funkci jednotlivých

peptidů (Reddy *et al.*, 2004). Pomocí NMR Holak *et al.* (1988) identifikovali strukturu cecropinu A.

Laughton a Siva-Johty (2011) standardizovali protokol pro měření aktivity PO i ProPO v hemolymfě včel (*A. mellifera*). Hladiny aktivity PO byly testovány pomocí katalytické přeměny bezbarvého L-DOPA (3,4-dihydroxy-L-fenylalanin) na červenohnědý dopachrom, který je měřen spektrofotometricky při vlnové délce 490 nm. Pro převedení zymogenu ProPO na aktivní PO se ukázal jako nejvhodnější α -chymotrypsin o koncentraci 0,5 mg/ml, doba inkubace byla 5 minut. Vyšší hladiny této proteasy však měly negativní vliv na aktivitu PO (Laughton a Siva-Johty, 2011).

V rámci imunitního systému jsou mimo jiné důležité dva antioxidační enzymy, CAT a SOD (Weirich *et al.*, 2002). Aebi (1984) optimalizoval metodu pro měření katalasy a z jeho standardizace vycházejí další stanovení. V metodě pro stanovení aktivity katalasy se využívá rozkladu 10 mM peroxidu vodíku (H_2O_2) působením tohoto enzymu. Měření se provádí stanovením změny absorbance při 240 nm a probíhá v prostředí 50 mM K-fosfátového pufru o pH 7.

Schopnosti SOD inhibovat reakce superoxidů je využíváno k nepřímému stanovení tohoto enzymu (Matoušková *et al.*, 2014). Metoda stanovení byla optimalizována Paolettim *et al.* (1986) a Paolettim a Mocalim (1990). Metoda stanovení SOD se sestává ze tří kroků. První zahrnuje produkci superoxidů, kdy dochází k přeměně xantinu xantinoxidasou, nebo se využívá reakce NADH (NADPH) s fenazin methosulfátem. Ve druhé fázi dochází k detekci superoxidů, ke které je možno využít nitrotetrazoliovou modř (NBT), pyrogallol, cytochrom c a další spektrofotometricky měřitelné chromogenní substráty. Poslední krok této metody představuje inhibici reakcí superoxidů. To znamená, že SOD katalyzuje přeměnu superoxidů, dochází k inhibici přeměny chromogenních substrátů na jejich barevné produkty (Matoušková *et al.*, 2014).

2.6 Elektromigrační metody

2.6.1 Gelová elektroforéza

SDS-PAGE

Dodecylsulfát sodný (SDS), je detergent, schopný vázat se svou hydrofobní částí na proteiny. Dokáže měnit tvar proteinů do válcovité podoby. Navázaný SDS na protein pak díky svému velkému negativnímu náboji překrývá vlastní náboj proteinu. To způsobí, že pokryté proteiny pak mají shodný poměr nábojů na jednotku hmoty a zároveň podobný tvar. Poté se proteiny při gelové elektroforéze dělí podle své molekulové hmotnosti za působení stejnosměrného elektrického proudu (Schägger, 2006). Nejpoužívanější SDS-PAGE metodou je metoda dle Laemmliho (1970). Jde o diskontinuální systém elektroforézy za použití dvou gelů, tzv. zaostřovacího a dělicího gelu. Gely se liší především stupněm zesíťování, odlišným pH a koncentrací pufru (Garfin, 2002). Analyzovaný vzorek je rozpuštěn v pufru obsahujícím Tris-HCl (udržuje konstantní pH), redukční činidlo (rozrušuje kvarterní strukturu proteinů), SDS, glycerol (zvyšuje hustotu vzorku) a barvivo bromfenolovou modř (vizualizace). Poté dochází k zahřívání na vodní lázni nebo v termobloku, což má za následek rozpuštění a denaturaci všech proteinů (Kinter a Sherman, 2005). Elektroforéza je zahájena bezprostředně po nanesení vzorku mikropipetou do jamky v polyakrylamidovém gelu a ukončena, jakmile se vzorek přiblíží k okraji gelu. Pomocí některé z detekčních metod pak zkoumáme rozseparované fragmenty proteinů (Garfin, 2002).

2.7 Izoelektrická fokusace

Izoelektrický bod proteinu je hodnota pH, při které nemá protein náboj. Při izoelektrické fokusaci proteiny putují v gradientu pH až do fáze, než se dostanou do části o pH, které se rovná jejich izoelektrickému bodu, tam proteiny ztratí náboj a přestanou putovat dále. Když se proteiny zastaví, jsou pak fokusovány neboli zaostřeny do úzkých zón (s téměř stejným pH) kolem izoelektrického bodu. Pro přípravu pufrů pro fokusaci se používají nízkomolekulární oligomery s alifatickými karboxylovými skupinami a aminoskupinami s podobnými izoelektrickými body. V elektrickém poli se tyto roztoky rozmístí tak, že nejkyselější putují k anodě a ke katodě směřují zásaditější. Izoelektrická

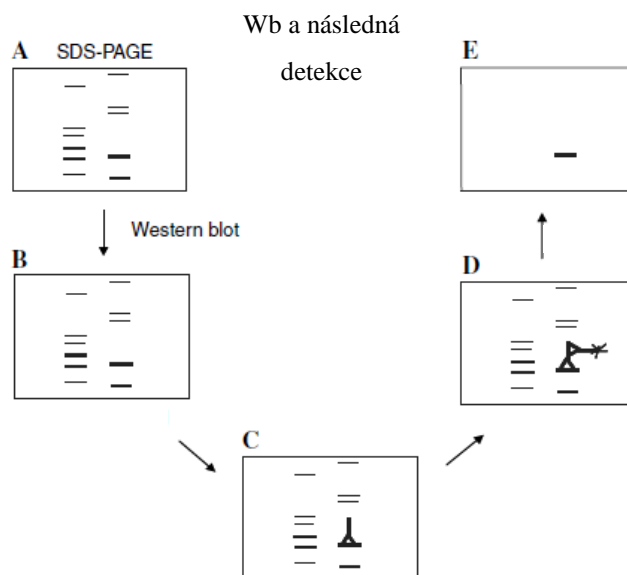
fokusace je výhodná pro analytické a preparativní účely. Může se dále kombinovat s elektroforézou. (Voet a Voetová, 1995).

2D-PAGE

Jak z názvu plyne, jde o dvourozměrnou metodu, která je nejčastěji používaná pro analýzu směsi proteinů na základě jejich pI a molekulové hmotnosti. Při této metodě je využita kombinace izoelektrické fokusace (dělení látek ve směru podle hodnoty pI) a SDS-PAGE elektroforézy (separace látek ve směru kolmém k původnímu podle molekulových hmotností). Metoda je citlivá a lze tak oddělit proteiny, které se liší jediným nábojem. Těto metody se využívá pro separaci jednotlivých složek z komplexních směsí obsahující proteiny (Issaq a Veenstra, 2008).

2.8 Western Blotting

Western blot(Wb) je metoda známá také pod názvemprotein blotting nebo immunoblotting, využívaná k immunodetekci proteinů po elektroforéze. Wb umožňuje přenos proteinů z SDS polyakrylamidového gelu na adsorpční membránu, na které je možné identifikovat bandy proteinů po reakci se specifickými protilátkami. Postup Wb je znázorněn naObr. 7(Kurien a Scofield,2006).



Obr. 7: Schéma procesu Wb: A) gel po SDS-PAGE před procesem Wb; B) přesný otisk gelu na membráně po blotování; C) navázání primárních protilátek na specifickém bandu na blotu; D) navázání sekundárních protilátek konjugovaných s enzymy (alkalická fosfatasa, křenová peroxidasa) tvořící vazby s primárními protilátkami; E) vyvolání barevné reakce (převzato a upraveno dle Kurien a Scofield, 2006)

Přenos bílkovin je zprostředkován působením elektrického pole působícího kolmo na povrch gelu, což zapříčiní pohyb proteinů z gelu na membránu, která je umístěna mezi gelem a kladnou elektrodou – vytvoří se tzv. sendvič. Sendvič zahrnuje na každém konci podložku z vláken (houby), filtrační papír k ochraně gelu a blotovací membránu (Mahmood a Yang, 2012).

Pro Wb je velmi důležité, aby byl těsný kontakt gelu a membrány pro zajištění jasného obrazu, a také, aby membrána byla umístěna mezi gelem a kladnou elektrodou. Tak dochází k přenosu záporně nabitých proteinů z gelu na membránu. Tento typ transportu se nazývá elektroforetický a může být uskutečněn v polosuchých nebo vlhkých podmínkách, které jsou preferovanější z důvodu prevence vyschnutí gelu (Mahmood a Yang, 2012).

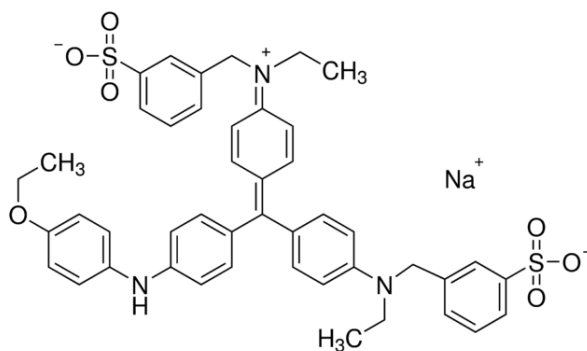
Nezbytnou součástí Wb je membrána, která může být nitrocelulosová nebo polyvinyliden fluoridová (PVDF). PVDF membrány jsou výhodnější díky jejich vysoké kapacitě vázání proteinů, pevnosti a chemické stabilitě. PVDF je vhodné pro barvení barvivem Coomassie Brilliant Blue (CBB). Nitrocelulosová membrána se využívá především pro svou vysokou afinitu k proteinu, v suchém stavu je však velmi křehká (Kurien a Scofield, 2006).

Dalším krokem je tzv. blokování, tedy ochrana nescifických míst membrány před navázáním antigenů. Blokování se obvykle provádí s 5% roztokem BSA nebo s roztokem netučného sušeného mléka zředěného v TBS (kvůli snížení pozadí). Poté je membrána inkubována s protilátkami, nejdříve primárními a poté se sekundárními, které jsou obvykle vázány s enzymy (např. křenová peroxidasa) (Mahmood a Yang, 2012).

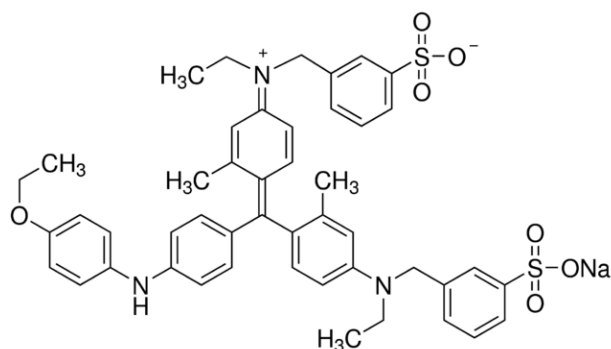
2.9 Detekce celkových proteinů na polyakrylamidovém gelu po provedené elektroforéze

2.9.1 Detekce pomocí Coomassie Brilliant Blue

Od zavedení této metody detekce pomocí barviva Coomassie Brilliant Blue (CBB) do oblasti analytické biochemie Fazekas De St. Groth *et al.* (1963) je tato metoda v oblasti detekce proteinů stále nejpoužívanější.



Obr. 8: Strukturní vzorec CBB-R250.



Obr. 9: Strukturní vzorec CBB-G250.

CBB existují ve dvou derivátech odvozených od trifenylmetanu. Coomassie R-250 (modrý odstín s nádechem červené, Obr. 8) a Coomassie G-250 (modrý odstín s nádechem zelené, Obr. 9), které se váží na aminoskupinu proteinů díky elektrostatickým a hydrofobním interakcím. V původním protokolu byly gely umístěny do roztoku s 0,01% CBB rozpuštěného v 45% metanolu (mohl být nahrazen ethanolem nebo isopropanolem), 45% vody a 10% kyseliny octové (Westermeier a Marouga, 2005).

V dnešní době existuje mnoho modifikací protokolů barvení, jejichž výchozí látkou je CBB, např. protokol dle Neuhoffa *et al.* (1988), Andersona *et al.* (1991), Kanga *et al.* (2002), Candiana *et al.* (2004), Wang *et al.* (2007), Dyballa a Mitzgara (2009) a Pinka *et al.* (2010).

Výhodou barvení metodou CBB je dobrá afinita barviva k proteinům, metoda je levná s dobrou opakovatelností a reprodukovatelností. Nevýhody jsou dlouhá doba barvení a spíše nízká citlivost (Westermeier a Marouga, 2005).

2.9.2 Fluorescenční detekce proteinů

Metoda byla objevena roku 1971, nabízí vyšší citlivost v porovnání s detekcí CBB. Fluorescenční molekuly SYPRO Orange a SYPRO Red se váží prostřednictvím nekovalentních interakcí na proteiny. Další používané barvivo je SYPRO Ruby Red, podobně citlivé jako barvení stříbrem (Merril *et al.*, 1983). Jako citlivější se projevilo barvivo Deep Purple obsahující fluoroforepicocconzískávaný z houby *Epicoccum nigrum*. Fluorescenční barvení je optimální spolehlivá metoda pro získání vysoké citlivosti, viz Tab. 3., barviva jsou dražší (Westermeier a Marouga, 2005).

2.9.3 Detekce proteinů stříbrem

Metoda detekce proteinů, která byla objevena v polovině 17. století. Prvotně byla hojně využívána ve fotografickém průmyslu, postupem času sloužila k vizualizaci buněčných struktur (Merril *et al.*, 1983). Přestože existuje mnoho protokolů barvení stříbrem, všechny jsou založeny na redukcí stříbrných iontů působením vedlejších řetězců aminokyselin v alkalickém prostředí. K této přeměně dochází po interakci stříbra s proteiny na gelu. Stříbrné ionty váží proteiny na základě elektrostatických interakcí s COO⁻ skupinou Asp a Glu nebo se komplexují s imidazolem, SH nebo NH₃ skupinami His, Cys, Met a Lys. Nejdříve jsou gely fixovány buď v 20% kyselině trichloroctové, a to zejména gely tenčí než 0,5 mm, nebo v 50% metanolu s 12% kyselinou octovou. Poté gely dvakrát promýváme 10% ethanolem s 5% kyselinou octovou. V dalších krocích jsou gely nejprve namočený v dichromanu draselném a poté v dusičnanu stříbrném. Opět proplachujeme (uhličitanem sodným s formaldehydem). Jakmile se objeví jemně nažloutlé pozadí, proces zastavujeme uložením gelu na 5 minut do 3% kyseliny octové (Merril *et al.*, 1983).

Existují čtyři způsoby vyvolávání gelů. Krátká metoda s dusičnanem stříbrným a dlouhá metoda s dusičnanem stříbrným, fixace v roztoku obsahujícím amoniak a stříbro bez aldehydu nebo v amoniaku s formaldehydem. Vyvolávání v roztoku bez aldehydu poskytuje vynikající kompatibilitu s hmotnostní spektrometrií. Vyvolávání s formaldehydem je nejcitlivější (Chevallet *et al.*, 2006). Barvení stříbrem je používanou metodou díky dobré citlivosti, viz Tab. 2, náklady jsou však vyšší v porovnání s barvením CBB, výsledky získáme poměrně rychle (Westermeier a Marouga, 2005).

Tab. 3: Porovnání inkubačních dob a detekčních limitů barviv (převzato a upraveno dle Granvogel *et al.*, 2007)

Barvivo	Inkubační doba (hodiny)	Detekční limit (ng proteinu)
<i>Coomassie (G-250)</i>	15	1-16
<i>Coomassie (R-250)</i>	12-48	30-100
<i>Stříbro</i>	0,25-3	0,5
<i>SyproRuby</i>	5,5-12	0,5-5
<i>Deep Purple</i>	3,5	0,1

2.9.4 Negativní barvení gelu zinkem s SDS a imidazolem

Metoda, při které nedochází k barvení proteinů, ale je vizualizováno pozadí gelu. Komplexní sůl zinku, SDS a imidazolu se vysráží v polyakrylamidovém gelu. Proteinové pásy se vůči tmavě zbarvenému gelu stávají dobře viditelné. Citlivost této metody je řazena mezi barvení CBB a stříbrem. Vysrážená sůl může být zpětně rozpuštěna pufrům Tris-EDTA, což podporuje elektroforetický transport proteinů pro Wb (Westermeier a Marouga, 2005).

3 Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Použité chemikálie

Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

APS (Sigma-Aldrich, Německo)

Bisakrylamid (MP Biomedicals, USA)

n-Butanol (Sigma-Aldrich, Německo)

Coomassie BB G-250 (Bio-Rad, USA)

Coomassie BB R-250 (Bio-Rad, USA)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Německou)

Fenylthiomocovina (Sigma-Aldrich, Německo)

Glycerol (Lach-Ner, Česká republika)

Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo)

Hydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, Španělsko)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina fosforečná 85% (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina trifluorocetová (Fluka, Švýcarsko)

Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, Japonsko)

Metanol (Lach-Ner, Česká republika)

Močovina (Sigma-Aldrich, Německo)

Peroxid vodíku 30% (Lach-Ner, Česká republika)

Primární protilátky (Clonestar, Česká republika)

SDS (Applichem, Německo)

SDS-PAGE marker – Ultra Low range Molecular Weight Marker (standard obsahuje: triosafosfát isomerasu z králíčího svalu (26.600 Da), myoglobin z koňského srdce (17.000 Da), α -laktalbumin z kravského mléka (14.200 Da), aprotinin z hovězích plic (6.500 Da), insulinový řetězec B (3.496 Da) a bradykinin (1,060 Da); Sigma-Aldrich, USA)

Sekundární protilátky(anti-králíčí IgG protilátky značené alkalickou fosfatasou; Sigma-Aldrich, USA)

Síran hlinitý (Lach-ner, Česká republika)

Sušené odstředěné mléko (Sigma-Aldrich, Německo)

TEMED (Sigma-Aldrich, Čína)

Tricin (Sigma-Aldrich, USA)

Tris (MP Biomedicals, Francie)

Tween-20 (Sigma-Aldrich, Německo)

3.1.2 Přístrojové vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo), automatické pipety (Eppendorf, Německo), elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA), elektromagnetická míchačka (Biosan, Litva), Gel Doc EZ System (Bio-Rad, USA), chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo), digitální pH metr InoLab pH level1 (InoLab, Německo), nitrocelulosevá membrána (Bio-Rad, Německo), PVDF membrána Bio-Rad, Německo), třepačka Bio Shaker 30 (Biosan, Litva), třepačka vortex V-1 Plus (Biosan Litva), zdroj napětí pro elektroforézu (Bio-Rad, USA), předvážky (KERN, Německo), kulový mlýnek FastPrep FP120 (Thermo Savant, USA), UV-VIS spektrofotometr (Agilent Technologies, USA)

3.1.3 Biologický materiál

Vzorky včel *Apis mellifera carnica* pochází ze včelnice na Kývalce u Rosic u Brna. Včely byly odebírány náhodně z plástů, stáří včel nebylo rozlišováno, včely byly vždy odebírány v odpoledních hodinách a po odběru ihned zamrazeny v tekutém dusíku. Včelstva byla klinicky zdravá. K dispozici jsem měla vzorky včel ze včelstev 23, 24 a 131, odběry proběhly v květnu a srpnu roku 2016.

Další včely, které jsem využila pro experiment, byly rozděleny do skupin, viz Tab. 4 a krmeny *ad libitum* různou potravou. Vzorky včel pochází ze včelstva 588, vylíhly se za laboratorních podmínek a od stáří jednoho dne byly krmeny potravou, která je uvedena v Tab. 4. Včely (*A. mellifera carnica*) pocházejí ze soukromé včelnice Ing. Květoslava Čermáka, CSc. z Petrušova. Ze včelstva 588 byl odebrán zavíčkovaný plod 1 – 2 dny před líhnutím, plásty byly převezeny do laboratoře, kde se včely vylíhly v izolátoru umístěném v inkubátoru (34,5°C).

Tab. 4: Použité experimentální skupiny včel a příslušný obsah potravy.

Experimentální skupina	Typ krmiva
1	50% roztok sacharosy
2	50% roztok sacharosy+ pyl
3	50% roztok sacharosy+ <i>P. larvae</i> CCM 4483
4	50% roztok sacharosy+ <i>A. apis</i>
5	50% roztok sacharosy+ pyl + <i>P. larvae</i> CCM 4483
6	50% roztok sacharosy+ pyl + <i>A. apis</i>

**A. apis* – *Ascosphaera apis*

Příprava roztoků potravy pro včely:

MYPGP medium (200 ml): 2 g Mueller Hinton broth; 3 g yeast extrakt; 0,6 g K₂HPO₄; 0,2 g Na pyruvát; 4 g agar + 4 ml 10% glukosa

50% sacharosa: 100 g cukru rozpustěno ve 100 ml sterilní H₂O, rozmícháno, doplněno na objem 200 ml.

50% sacharosa + bakteriální suspenze *P. larvae*: Bakterie byly inkubovány přes noc při 37 ° C (50 ml suspenze), po inkubaci byly bakterie pročištěny (rozpuštěno ve fyz. roztoku; 2× centrifugace 10000 ×g, 8-10 min). Pelety po poslední centrifugaci rozpuštěny v 10 ml fyziologického roztoku → ředěno v roztoku 50% sacharosy na OD₆₀₀=0,1 ve 200 ml sacharosy.

50% sacharosa + spory *A. apis*: Odebráno 5 ks larev napadených *A. apis* (zvápenatělé mumie). Spory byly zhomogenizovány v 1 ml sterilní H₂O. Do 200 ml 50% sacharosy přídavek 2× 1ml zhomogenizovaných larev (celkem 10 ks larev).

Pro SDS-PAGE elektroforézu byla využita hemolymfa, která byla odebrána včelám v srpnu 2016 na včelnici na Kývalce. Celkem 10 včel bylo použito k odběru hemolymfy pro směsný vzorek, každé včele byly odebrány 2 µl hemolymfy z hrudníku.

Biologické vzorky jsem obdržela od svého vedoucího.

3.2 Metody

3.2.1 Stanovení kalibrace pro výpočet koncentrace proteinů

Stanovení koncentrace proteinů bylo provedeno metodou dle Bradforda (1976). Do jamky na mikrodestičku bylo nanášeno 45 μl deionizované H_2O , 5 μl standardu, kterým byl roztok hovězího sérového albuminu (BSA; koncentrace 50 – 1000 $\mu\text{g/ml}$), nebo vzorku proteinu a 200 μl roztoku Bradfordova činidla. Zásobní roztok tohoto činidla byl připraven rozpuštěním 50 mg CBB G-250 ve 25 ml MeOH a 50 ml 85% kyseliny fosforečné. Roztok byl doplněn deionizovanou vodou na objem 100 ml a uchováván v lednici. Před použitím byl zásobní roztok vždy naředěn deionizovanou vodou v poměru 1:4 (Stoscheck, 1990). Měření bylo provedeno spektrofotometriky při vlnové délce 595 nm.

3.2.2 Stanovení aktivity CAT

Specifická aktivita je stanovena z koncentrace proteinů ve vzorku a aktivity daného enzymu v příslušném vzorku. Pro měření aktivity enzymu CAT byly využity jednotlivé tělní části (hlava, hrudník, zadeček) ze včel (včelstva 23, 24, 131) odebraných v květnu a srpnu, a také hrudníky včel ze včelstva 588, včely byly krmeny *in vitro* různou potravou, viz. Tab. 4. Pro stanovení specifické aktivity těchto vzorků byla změřena jejich koncentrace metodou dle Bradforda (1976), přičemž vzorky hlav byly ředěny 4× a vzorky hrudníků a zadečků 7× – 10×.

3.2.2.1 Příprava vzorků včel pro stanovení aktivity CAT

Veškeré vzorky včel byly uchovány v mrazáku při -80°C . Včely byly rozděleny na ledové lázni na hlavu, hrud' a zadeček a umístěny do mikrozkušavek. Zde ke každé části byly přidány homogenizační kuličky (cca 10 ks) a 100 μl 0,1M K-fosfátového pufru (pH 7,0), který navíc obsahoval 1mM EDTA a 0,01% PTU. Vzorky byly homogenizovány v kulovém mlýnku. Poté bylo přidáno dalších 100 μl 0,1M K-fosfátového pufru a zkumavky byly opět homogenizovány a následně centrifugovány při 12000 \times g při teplotě 5°C po dobu 10 minut. Do doby dalších měření byly vzorky skladovány při -80°C .

3.2.2.2 Měření aktivity CAT

Měření bylo provedeno dle původního protokolu podle Aebi (1984), některé parametry byly ovšem optimalizovány (koncentrace H_2O_2 , množství vzorku). Pro zjištění aktivity CAT byla měřena spektrofotometricky absorbance úbytku peroxidu vodíku při vlnové délce 240 nm.

Z upravených vzorků hlav nebo hrudníků bylo pro analýzu napipetováno do UV-kyvety 50 μl , ke kterým bylo přidáno 1950 μl 50mM K-fosfátového pufru (pH 7,0). Z homogenátů zadečků bylo pro jejich měření aktivity odebráno a napipetováno do UV-kyvety 10 μl , k nim bylo přidáno 1990 μl 50mM K-fosfátového pufru (pH 7,0). Byl měřen pokles absorbance 60mM H_2O_2 , kterého bylo do jednotlivých kyvet přidáno vždy 500 μl . Následně byla spočítána změna koncentrace a tedy i aktivita vztažená na jednotku času. Každý vzorek byl měřen v triplicátech po dobu 60 sekund při 25°C , teplota byla udržována vodním termostatem.

3.2.3 SDS-PAGE elektroforéza

Metoda byla využita k separaci proteinů ve vzorcích hemolymfy, u kterých byly po jejich úpravě (viz kapitola 3.2.3.1) změřeny koncentrace metodou dle Bradforda (1976), a k následnému porovnání citlivosti metod detekce proteinů na polyakrylamidových gelech a Wb.

3.2.3.1 Příprava vzorků

Po odchyení a odstřížení zadečku byly včelám odebrány 2 μ l hemolymfy. Do jedné mikroskopické pipety byla napipetována hemolymfa z 10 včel (celkem 20 μ l), ke které bylo přidáno 100 μ l 0,1% TFA, poté byly vzorky lyofilizovány, uchovány při -80°C .

Pro nanášení vzorku hemolymfy na jamku, byl připraven zásobní roztok hemolymfy připravený rozpuštěním lyofilizované hemolymfy ve 100 μ l 0,1% TFA. Jako standardy pro metodu Wb jsem použila kompletně syntetizovaný peptid abaecin (UniProt P15450), dále pak peptid pokrývající část sekvence abaecinu, který byl použit pro přípravu protilátek, označen CFN. CFN byl dále kaplován na BSA nebo na KLH protein, tyto standardy jsem také využila pro optimalizaci Wb. Pro optimalizaci imunodetekce defensinu jsem použila částečnou sekvenci defensinu, použitou pro přípravu protilátek, označenou jako CRK. Tato část antimikrobiálního peptidu defensinu byla stejně jako při přípravě protilátek proti abaecinu kaplována na BSA nebo KLH protein.

3.2.3.2 Příprava pufrů a gelů

Příprava anodového pufru: Na přípravu anodového pufru bylo naváženo 6,06 g Tris, který byl rozpuštěn ve 200 ml dH_2O . Hodnota pH roztoku byla upravena 1M HCl na hodnotu 8,9, poté byl roztok doplněn dH_2O na 500 ml celkového objemu. Pufr tedy obsahoval 0,1M Tris, pH 8,9.

Příprava katodového pufru: Na přípravu katodového pufru bylo naváženo 6,06 g Tris, 8,96 g Tricinu a 0,5 g SDS, vše bylo rozpuštěno ve 200 ml dH_2O , roztok byl doplněn na objem 500 ml. Výsledný pufr tedy obsahoval 0,1M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1% SDS, pH 8,25.

Příprava roztoku do separačního gelu AB-6: Bylo naváženo 930 g akrylamidu (AA) a 6,0 g N,N'-metylen-bisakrylamidu (bAA), které byly rozpuštěny ve 200 ml dH₂O. Pufr byl skladován v lednici při teplotě 4° C (Schägger, 2006).

Příprava roztoku do zaostřovacího gelu AB-3: Bylo naváženo 96,0 g AA a 3,0 g bAA, které byly rozpuštěny ve 200 ml dH₂O. Pufr byl skladován v lednici při teplotě 4° C (Schägger, 2006).

Příprava gelového pufru: Bylo naváženo 181,65 g Trisu a 1,5 g SDS, které byly rozpuštěny ve 300 ml dH₂O. Hodnota pH roztoku byla pomocí HCl upravena na 8,45 a roztok byl doplněn na 500 ml celkového objemu.

Příprava vzorkovacího – redukujícího pufru: Na přípravu bylo použito 12% SDS, 6% merkaptoethanol, 30% glycerol, 0,05% Coomassie Brilliant Blue G-250 a 150mM Tris/HCl (pH 7)

Příprava 16% polyakrylamidového gelu: Bylo smícháno 10 ml AB-6, 10 ml gelového pufru a 3 g glycerolu, roztok byl doplněn na celkový objem 30 ml. Polymerizace proběhla po přidavku 100 µl 10% APS a 10 µl TEMEDU.

Příprava 16% polyakrylamidového gelu s přidavkem 6M močoviny: Bylo smícháno 10 ml AB-6, 10 ml gelového pufru a 10,8 g močoviny, roztok byl doplněn na celkový objem 30 ml. Polymerizace proběhla po přidavku 100 µl 10% APS a 10 µl TEMEDU.

Příprava zaostřovacího 4% gelu: Byl smíchán 1 ml AB-3 a 3 ml gelového pufru. Polymerizace proběhla po přidavku 90 µl 10% APS a 9 µl TEMEDU.

3.2.3.3 Provedení SDS-PAGE elektroforézy

Byla provedena tricínová elektroforéza v 16% polyakrylamidovém gelu a v 16% polyakrylamidovém gelu s přidavkem 6M močoviny (Schägger, 2006). Před nanesením na gel byly vzorky vždy inkubovány se vzorkovacím pufrem v poměru 3:1 při teplotě 90°C po dobu 5 minut. Na jamku bylo naneseno 12µl standardu malých molekulových hmotností (ULMW, rozsah 1.060-26.600 Da) a 12µl vzorku hemolymfy, standardu AmP 10µM abaeicin nebo CRK (označení části peptidu defensinu) o koncentraci 10 mg/ml. Na gely, které byly připraveny pro porovnání citlivosti barvení, byl nanesen ULMW marker a hemolymfa. Na gely, které byly po elektroforéze přebírány, byla nanesena

hemolymfa a standard AmP abaecinu, nebo CRK. Napětí pro průchod vzorku zaostřovacím gelem při průběhu elektroforézy bylo 50 V a napětí pro průchod vzorku dělicím gelem bylo 80 V, aparatura byla umístěna do lednice (teplota 4°C).

3.2.3.4 Detekce proteinů na gelech po provedení elektroforézy

3.2.3.4.1 Detekce Coomassie Brilliant Blue

Byly použity tři typy barvení: CBB R-250 (Schägger, 2006), koloidní barvení CBB G-250 (Kang *et al.*, 2002; Dyballa a Metzger, 2009) a barvení CBB G-250, které proběhlo v mikrovlnné troubě. Barvení roztokem CBB R-250 vycházelo z protokolu dle Schäggera (2006). Gely byly po vyjmutí z elektroforetické aparatury umístěny po dobu 30 minut až 1 hodiny do fixačního roztoku, poté následovalo samotné barvení gelů v roztoku obsahujícím CBB R-250. Po uplynutí doby barvení byly gely několikrát propláchnuty odbarvovacím roztokem 1 (10% kyselina octová, 40% metanol).

Gely, které byly obarveny koloidním barvením CBB G-250 byly nejprve opláchnuty dH₂O a poté umístěny do koloidního roztoku obsahujícího CBB G-250 (Pink *et al.*, 2010). Po 2-12 hodinách byly gely několikrát propláchnuty odbarvovacím roztokem 2 (10% methanol, 2% kyselina fosforečná).

Pro porovnání barvení bylo otestováno také barvení roztokem CBB-G250, které proběhlo v mikrovlnné troubě. Jedná se o barvení bez organického rozpouštědla. Gely byly nejprve umístěny do roztoku CBB-G250, ve kterém byly po dobu 30 sekund vystaveny působení mikrovlnné trouby. Po vyjmutí byly gely ponechány v roztoku ještě 15 minut. Poté byl roztok vylit a gely byly propláchnuty dH₂O. Dokumentace gelů po detekci byla provedena pomocí přístroje Gel Doc EZ Imager.

3.2.3.4.2 Detekce stříbrem

Gely byly nejprve umístěny do fixačního roztoku po dobu 20 minut. Poté byly přemístěny do oplachovacího roztoku na 10 minut, následovalo promytí v dH₂O (10 minut). Pro zvýšení citlivosti byly gely na 1 minutu umístěny do 0,02% (w/v) thiosíranu sodného. Gely byly promyty vodou (2 × 1 minutu) a dále umístěny do vyvíjecího roztoku, dokud se na gelu neobjevily obarvené pásy proteinů. Nakonec byl

gel umístěn do zastavovacího roztoku 5% (v/v) kyseliny octové. Dokumentace gelů po detekci byla provedena pomocí přístroje Gel Doc EZ Imager.

3.2.3.4.3 Rostoky použité pro detekci

Fixační roztok: 50% metanol, 10% kyselina octová

Barvicí roztok CBB-R250: 0,1% CBB-R250, 45% metanol, 15% kyselina octová

Barvicí roztok CBB-G250 (koloidní): 0,02% CBB-G250, 5% síran hlinitý, 10% metanol, 8% kyselina fosforečná

Barvicí roztok CBB-G250 (mikrovlnná trouba): 80 mg CBB-G250 v 1 l dH₂O, 3 ml koncentrované HCl

Odbarvovací roztok 1: 10% kyselina octová, 40% metanol

Odbarvovací roztok 2: 10% metanol, 2% kyselina fosforečná

Oplachovací roztok: 50% metanol

Vyvíjecí roztok: 0,04 % formaldehyd, 2% Na₂CO₃

3.2.4 Western blot

Po elektroforéze vzorků hemolymfy a AmP byl proveden Western blot v uspořádání tank-blot. Tento proces zahrnuje přenos proteinů z gelu na NC nebo PVDF membrány, jejichž velikosti pórů byly 0,45 μm (Bio-Rad, Německo). Membrána byla přitisknuta na gel, a společně byly obklopeny filtračním papírem a porézní houbičkou, tento „sendvič“ byl vložen do kazety a ta do komůrky MiniProtean (Bio-Rad, Německo). Nejprve byly všechny komponenty před vložením do aparatury ponechány 10 minut v blotovacím pufu, který byl uchováván v lednici (4°C). Proud při blotování byl nastaven na 0,8 mA/cm², aparatura byla umístěna do lednice a blotovací proces probíhal většinou přes noc, nebo minimálně po dobu 4 hodin.

Po blotovacím procesu byla kazeta z komůrky vyjmuta a rozložena. Dále následoval proces blokace membrány, kdy NC nebo PVDF membrána byla ponořena do blokovacích roztoků (5% (w/v) sušeného mléka nebo 5% (w/v) BSA v TBS). Po 2 hodinách blokování byla membrána promyta 3× po 10 minutách v TBS obsahujícím

0,1% Tween-20. Po promývání byla membrána inkubována s primární protilátkou, která byla naředěna v poměru 1:500 s roztokem 5% sušeného mléka v TBS nebo roztokem 5% BSA v TBS. Byly použity protilátky proti defensinu a proti abaecinu.

Primární protilátky proti abaecinu a defensinu byly dodány firmou Clonestar, Brno. Současně byly dodány standardy k ověření funkčnosti primárních protilátek, a to antigen navázaný na BSA, antigen navázaný na KLH protein a samotný purifikovaný peptid. Dále následovalo promytí obdobné jako po blotovacím procesu a umístění membrán do roztoku s kozí sekundární anti-králičí IgG protilátkou značené alkalickou fosfatase (Sigma-Aldrich). Protilátka byla ředěna v poměru 1:1000 s roztokem 5% sušeného mléka v TBS nebo 5% BSA v TBS, zde byla membrána ponechána inkubaci po dobu 1-2 hodin. Dále následovalo opět promytí a detekce barvicím roztokem. Asi po 5 minutách jemného protřepávání došlo ke zbarvení všech bandů, kde byl obsažen příslušný Amp. Reakce barvení byla ukončena promytím v dH₂O.

3.2.4.1 Použité roztoky pro imunodetekci abaecinu a defensinu

Barvicí roztok: Připraven vždy čerstvý před použitím, 33 μ l NBT, 33 μ l BCIP, 10 ml AP pufru na 2 membrány.

Blotovací pufr: 0,025M Tris-HCl, 0,192M glycin, 20% metanol, pH 8,3, doplněno dH₂O do objemu 1 litr.

Blokovací roztoky: 5% sušené mléko v TBS; 5% BSA v TBS.

TBS pufr: 20mM Tris, 500 mM chlorid sodný, pH 7,5.

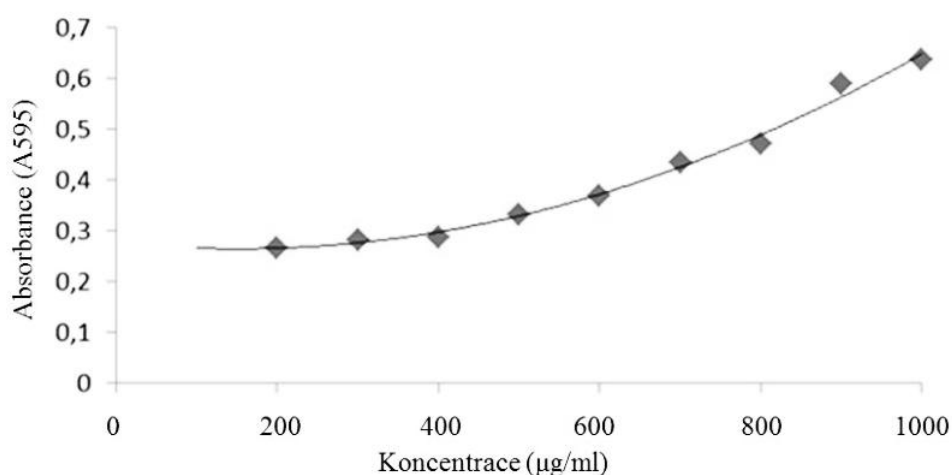
3.2.5 Použité statistické metody

Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu Statistica 13.1. Statistická významnost použitých testů byla vyhodnocována na hladině $\alpha = 0,05$. Pro znázornění výsledků byly použity krabicové (box-plot) grafy, k jejichž sestavení byl využit nástroj BoxPlotR dostupný na webu: <http://shiny.chemgrid.org/boxplotr/>, 22.4. 2017.

4 Výsledky a diskuze

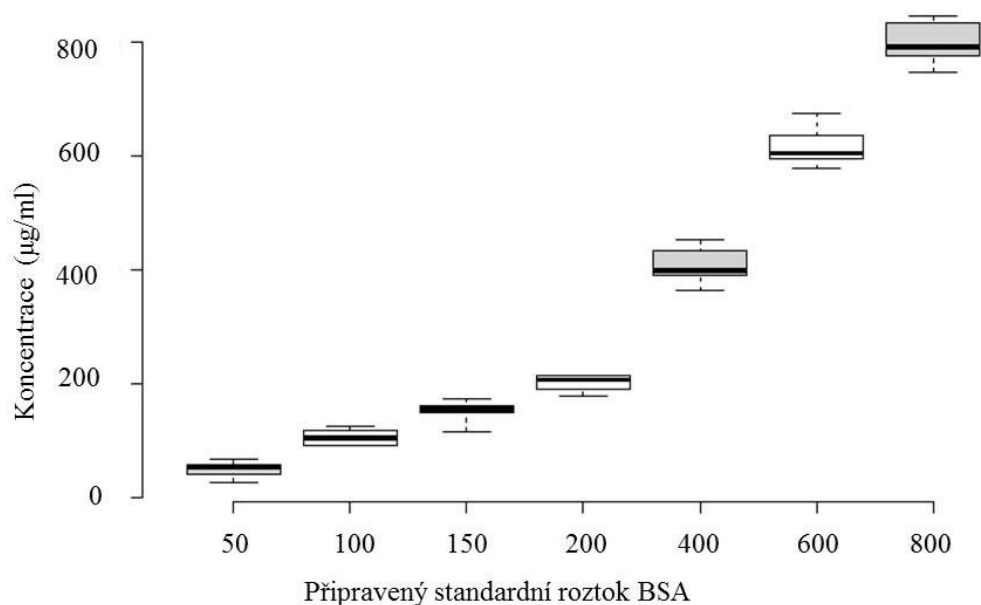
4.1 Kalibrace pro výpočet koncentrace proteinů

Pro výpočet koncentrace proteinů ve vzorcích, byly nejprve připraveny roztoky o vzrůstající koncentraci hovězího sérového albuminu. Pro stanovení koncentrace proteinů v rozmezí hodnot 200 – 1000 $\mu\text{g/ml}$ byl sestrojen graf (Obr. 10), koncentrace proteinů vzorků byly počítány z kvadratické rovnice. Koncentrace proteinů ve vzorcích, jejichž hodnoty byly nižší, tedy do 200 $\mu\text{g/ml}$, byly počítány z rovnice přímky ($y = 0,0005x + 0,0933$; $R^2 = 0,9678$). Měření bylo provedeno metodou dle Bradforda (1976) spektrofotometricky při 595 nm.



Obr. 10: Kalibrační křivka BSA pro přepočet koncentrací proteinů ve vzorcích v rozmezí 200 – 1000 $\mu\text{g/ml}$. Rovnice křivky, podle které byly koncentrace přepočítány je $y = 5\text{E-}07x^2 - 0,0002x + 0,2766$; $R^2 = 0,9908$.

Pro ověření správnosti metody pro přepočet koncentrací proteinů ve vzorcích byly připraveny roztoky hovězího sérového albuminu o koncentracích 50, 100, 150, 200, 400, 600 a 800 $\mu\text{g/ml}$ (Obr. 11). Každý vzorek o dané koncentraci byl připraven vždy 6 \times a takto připravené vzorky byly potom měřeny v triplikátech, dle kalibrační rovnice byly zpětně vypočítány koncentrace BSA.

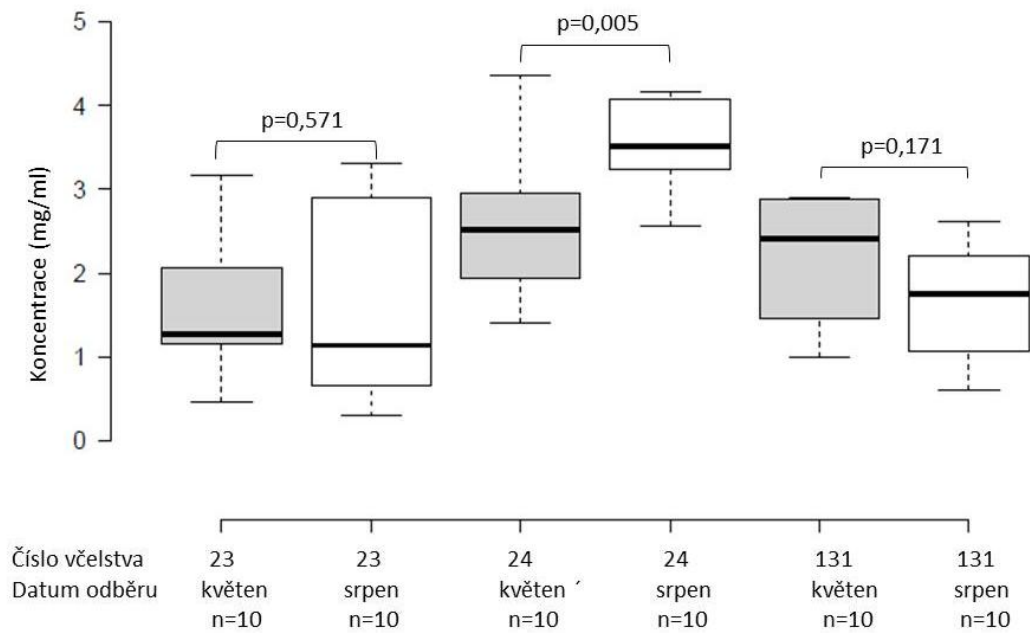


Obr. 11: Graf znázorňující ověření správnosti metody pro přepočet koncentrací proteinů ve vzorcích. Na ose x jsou hodnoty připraveného standardního roztoku BSA, který byl připraven z naváženého standardu BSA a následně naředěn na požadované koncentrace. Na ose y jsou znázorněny koncentrace proteinů, které byly ve vzorcích naměřeny a přepočítány pomocí daných rovnic.

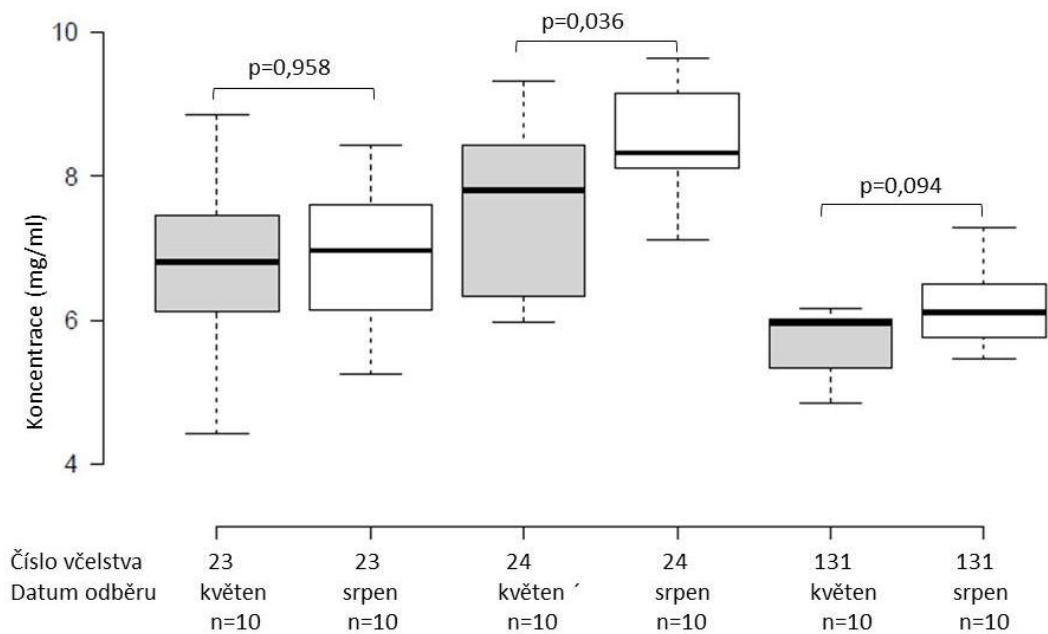
4.2 Koncentrace proteinů v homogenizovaných tkáních včel

Metodou dle Bradforda (1976) byly zjištěny koncentrace v jednotlivých vzorcích, které byly připraveny homogenizací tělních tkání včel. Vzorek obsahoval vždy danou tělní část, ke které bylo napipetováno 200 µl 0,05M K-fosfátového pufru. Vzorky byly před měřením vždy centrifugovány (12000 ×g) při teplotě 5°C po dobu 10 minut a po dobu měření uchovány na ledu. Vzorky obsahující homogenizované hlavičky byly pro stanovení koncentrací proteinů ředěny pouze 4×, vzorky obsahující homogenizované zadečky a hrudníky potom byly ředěny 7× - 10×.

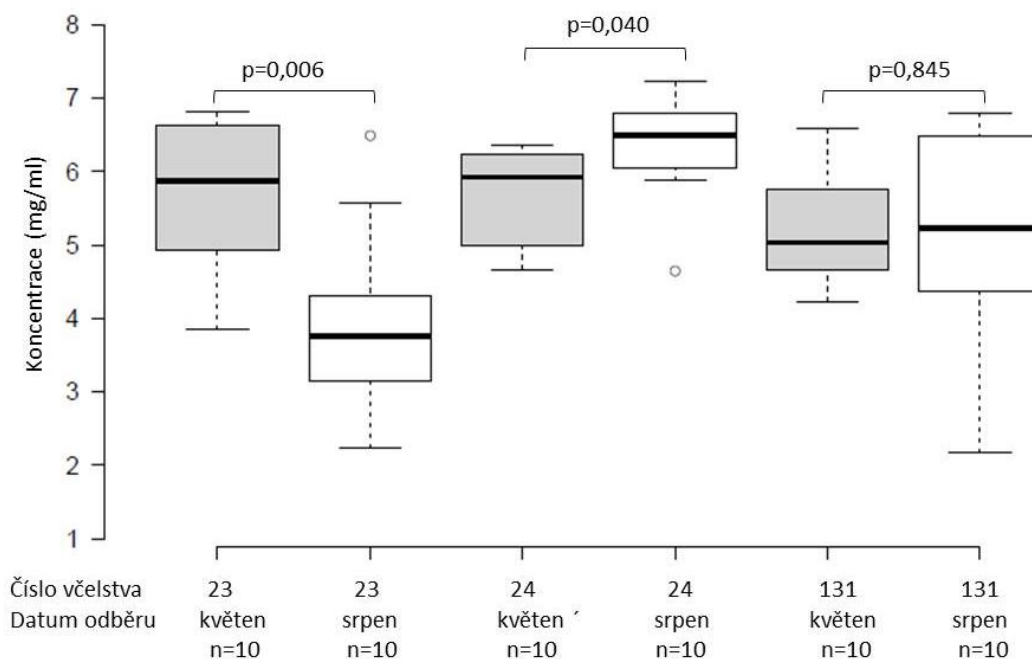
Z hodnot měření byly vypočítány koncentrace proteinů, které jsou pro hlavičky (Obr. 12), hrudníky (Obr. 13) a zadečky (Obr. 14) uvedeny v grafech. S využitím t-testu byly porovnávány průměry koncentrací proteinů jednoho včelstva v různých odběrových měsících (mezi květnem a srpnem v rámci jednoho včelstva), porovnávaná data jsou vždy v grafu vyznačena svorkou (hodnota p – pravděpodobnost výsledků).



Obr. 12: Graf koncentrací proteinů v hlavičkách včel ze včelstev 23, 24 a 131 odebraných v květnu a srpnu.



Obr. 13: Graf koncentrací proteinů v hrudnicích včel ze včelstev 23, 24 a 131 odebraných v květnu a srpnu.



Obr. 14: Graf koncentrací proteinů v zadečcích včel ze včelstev 23, 24 a 131 odebraných v květnu a srpnu.

Koncentrace proteinů v hlavičkách (Obr. 12) se celkově pohybovaly v rozmezí od 0,5 po 5 mg/ml. Jak ukázaly výsledky t-testu, průměry koncentrací ve včelstvu 23 a 131 v květnu a srpnu se nelišily ($p > 0,05$). Naopak tomu bylo u včelstva 24, kdy byly průměry koncentrací proteinů významně odlišné ($p < 0,05$).

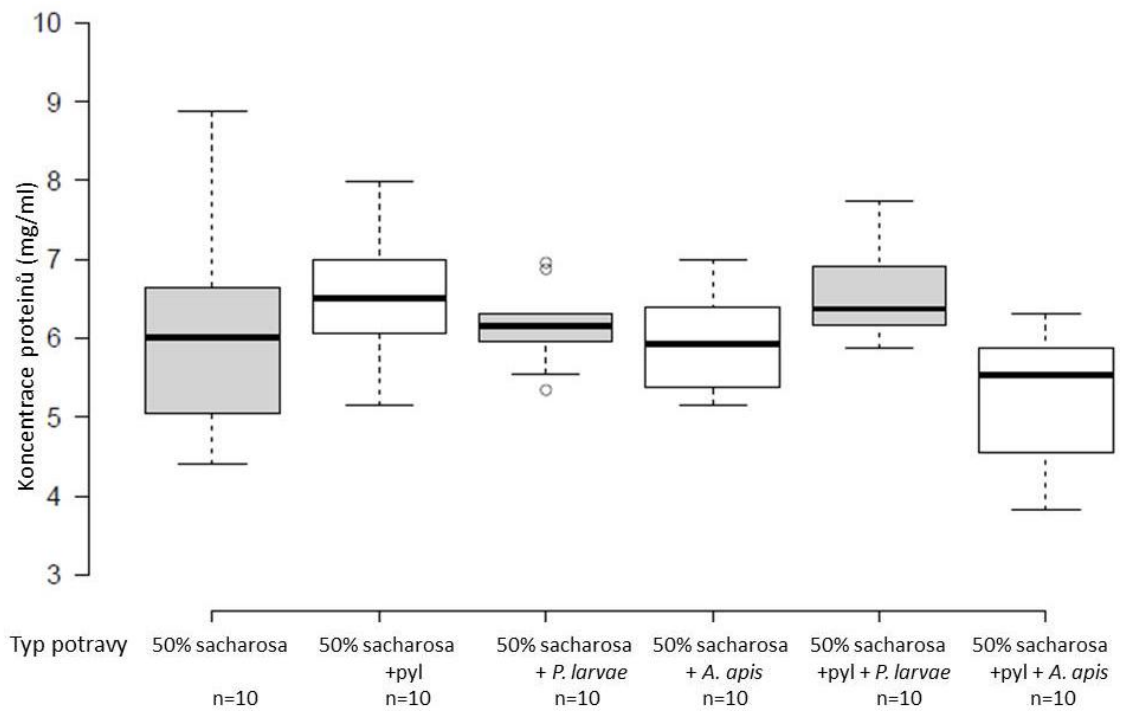
V hrudnicích byly, vzhledem k ostatním tělním částem, koncentrace proteinů nejvyšší (Obr. 13), nacházely se v rozmezí od 4 do 9,5 mg/ml. Koncentrace celkových proteinů byly podobné jako v homogenátech z hlaviček. Průměry koncentrací u včel odebraných v květnu a srpnu se statisticky nelišily jak u včelstva 23, tak 131 ($p > 0,05$). Jinak tomu bylo u včelstva 24, zde se průměry v dané tkáni v květnu a srpnu opět signifikantně lišily ($p < 0,05$).

V zadečcích se koncentrace proteinů pohybovaly od 2,5 do 7,5 mg/ml (Obr. 14). V tomto případě se průměry koncentrací signifikantně nelišily pouze v rámci včelstva 131 ($p > 0,05$), zatímco včelstva 23 a 24 vykazovala signifikantně odlišné koncentrace proteinů v květnu a srpnu ($p < 0,05$).

Vysoké koncentrace v zadečcích a hrudnicích mohou být způsobeny přítomností tukového tělesa, které vyplňuje zadeček včel, naopak hrudník je převážně tvořen létacími svaly (Veselý *et al.*, 1985). Především v abdominální části tukového tělesa

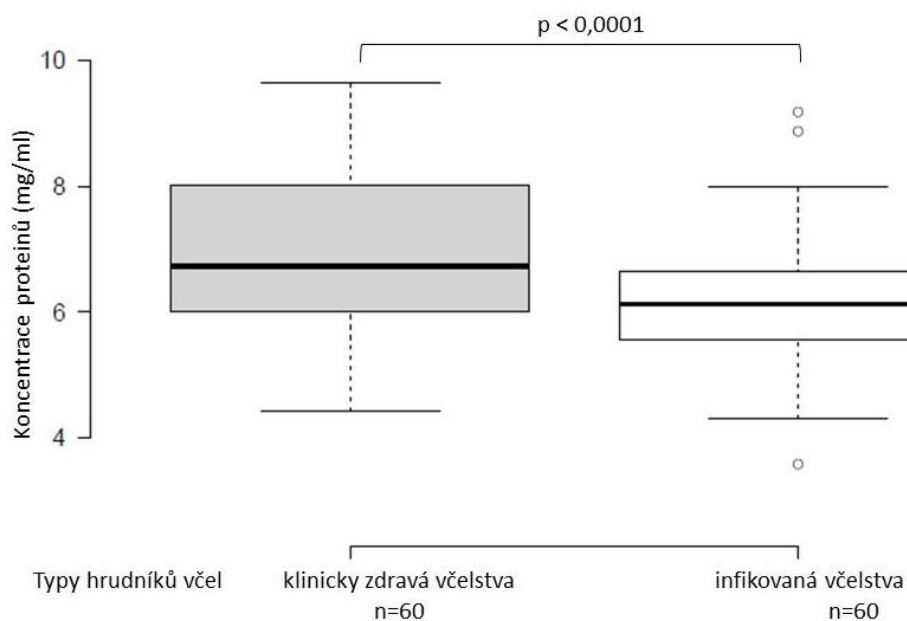
dochází k syntéze zásobních proteinů, např. vitellogeninu nebo antimikrobiálních peptidů (Corona *et al.*, 2007, Danihlík *et al.*, 2015).

Stejným způsobem (homogenizace) byly také upraveny tkáně infikovaných včel, u kterých byla stanovena koncentrace proteinů. Výsledky byly opět zpracovány do grafu (Obr. 15). Průměry koncentrací byly porovnány statistickou analýzou one-way ANOVA.



Obr. 15: Graf koncentrací proteinů v hrudnicích včel ze včelstva 588 krmných *in vitro* různou potravou (one-way ANOVA, $p = 0,023$).

Koncentrace proteinů byly tedy stanoveny v hrudnicích včel (Obr. 15), které pocházely z experimentu, kdy byly *ad libitum* krmny v laboratorních podmínkách od stáří jednoho dne potravou, uvedenou v Tab. 4 v kapitole 3.1.3. U těchto včel se koncentrace proteinů pohybovala v rozmezí hodnot od 4 do 9 mg/ml. Přestože rozmezí hodnot bylo téměř obdobné jako u včel odebraných ze včelstva 23, 24 a 131, průměry se signifikantně lišily ($p < 0,05$). Porovnání koncentrací v hrudnicích klinicky zdravých včel a infikovaných včel je uvedeno v Obr. 16.



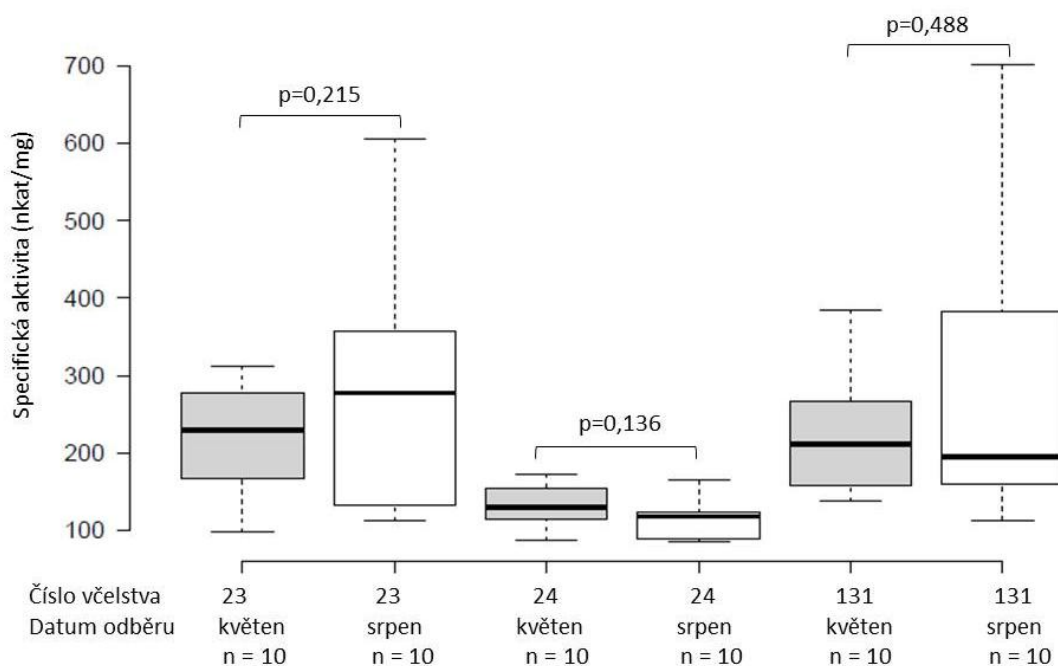
Obr. 16: Graf porovnání koncentrací proteinů v hrudnicích klinicky zdravých včel ze včelstev 23, 24, 131 a v hrudnicích včel infikovaných ze včelstva 588.

4.3 Stanovení specifické aktivity enzymu CAT

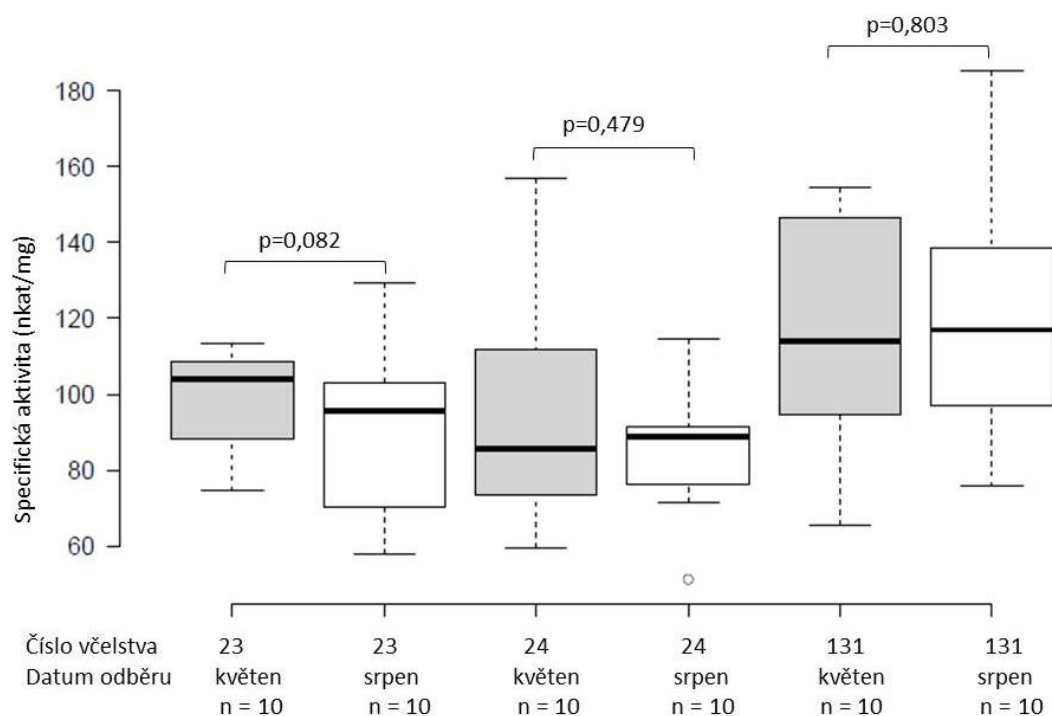
Specifická aktivita je aktivita vztažená na 1 mg proteinu, jednotkou je tedy 1 nkat/mg. Pomocí této veličiny je tedy vyjádřena přítomnost enzymu CAT v homogenizovaných tkáních. Pro měření byly využity tkáně, u kterých byly dříve stanoveny koncentrace proteinů, jejichž výsledky jsou shrnuty v předchozí kapitole 4.2. Při měření se vycházelo z původního protokolu dle Aebi (1984), který byl ovšem v několika parametrech modifikován. Pro spektrofotometrické měření (240 nm) nebyl použit jako substrát reakce 10mM H_2O_2 uvedený v původním protokolu dle Aebi (1984), ale 60mM H_2O_2 . Jako vhodný čas pro měření změny absorbance bylo zvoleno 60 s, při kterých byla změna absorbance evidentní, a stále byl ve směsi v nadbytku přítomen substrát.

U jednotlivých tkání se také lišil objem naneseného vzorku, celkový objem reakční směsi byl však zachován (2,5 ml). Pro homogenáty hlaviček (Obr. 17) i hrudníků klinicky zdravých včel (Obr. 18) byl experimentálně zvolen objem vzorku 50 μ l, který byl doplněn na požadovaný objem 2 ml 0,05M K-fosfátovým pufrům (pH 7). V případě zadečků (Obr. 19) byl použit objem 10 μ l, který byl 0,05M K-fosfátovým pufrům (pH 7) opět doplněn na celkový objem 2 ml. Reakce byla zahájena přidáním 500 μ l substrátu.

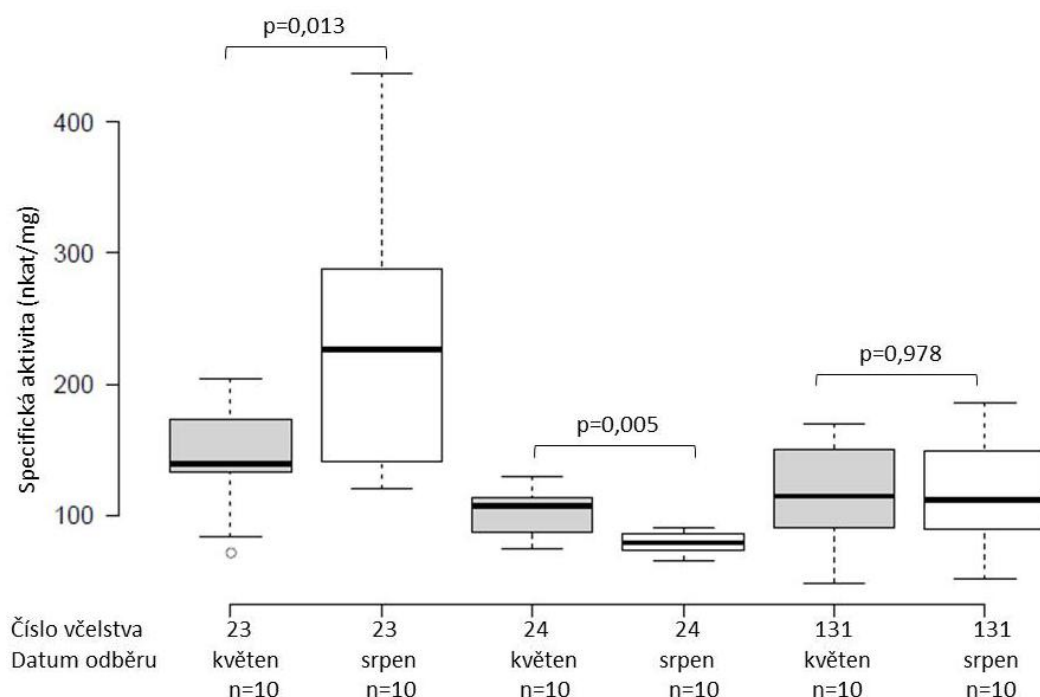
Dále byla specifická aktivita určena v hrudnicích včel (včelstvo 588), ve kterých byl porovnáván vliv obsahu potravy na oxidační stres, jehož nepříznivé vlivy snižuje právě enzym CAT. Pro měření vzorků hrudníků byl opět použit objem 50 μl , který byl doplněn na celkový objem 2 ml 0,05M K-fosfátovým pufrem a byl sledován pokles absorbance 60mM H_2O_2 , kterého bylo přidáno 500 μl . Výsledky jsou pro porovnání shrnuty graficky (viz. Obr.20a Obr. 21, ve kterých je uvedeno srovnání hodnot specifické aktivity CAT mezi hrudníky včel, které byly krmeny uvedenou potravou).



Obr. 17: Graf specifické aktivity enzymu katalasy v hlavičkách včel ze včelstev 23, 24 a 131, odebraných v květnu a srpnu.



Obr. 18: Graf sepcické aktivity enzymu katalasy hrudnicích včel ze včelstev 23, 24 a 131, odebraných v květnu a srpnu.



Obr. 19: Graf specifické aktivity enzymu katalasy v zadečcích včel ze včelstev 23, 24 a 131, odebraných v květnu a srpnu.

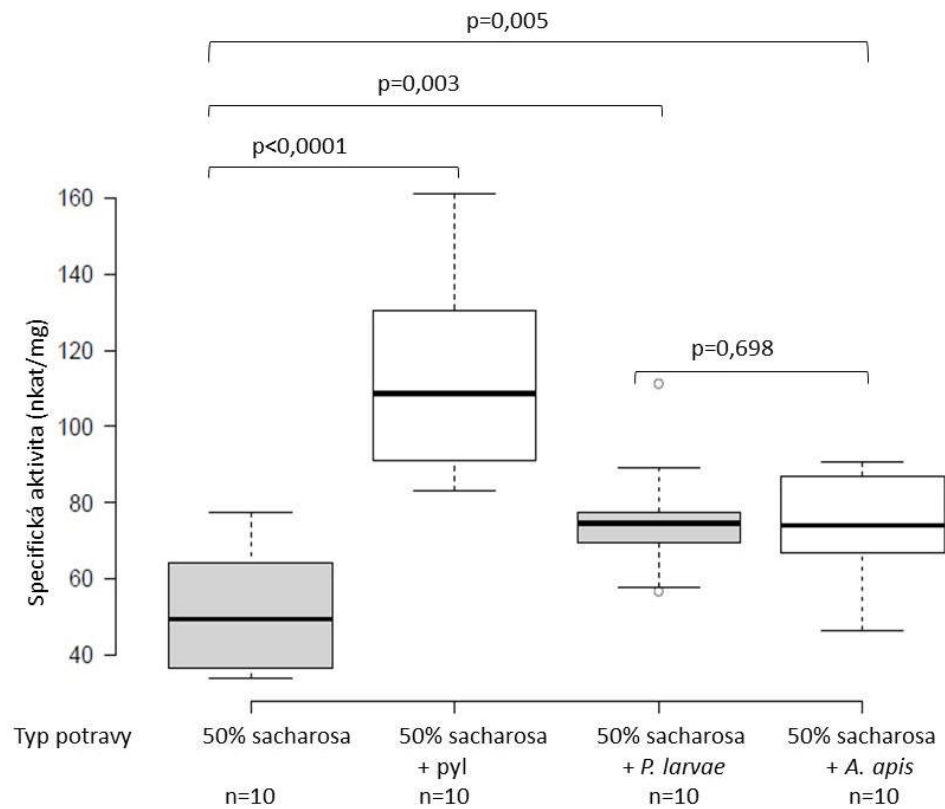
Specifická aktivita enzymu CAT v hlavičkách (Obr. 17) se pohybuje v rozmezí hodnot od 85 do 720 nkat/mg. Zde jsou hodnoty specifické aktivity nejvyšší, protože se jedná o aktivitu vyjádřenou na 1 mg proteinu. Množství proteinů bylo v hlavičkách

nejnižší. V rámci jednotlivých včelstev se hodnoty průměrů specifických aktivit v hlavičkách mezi daty odběru (květen vs. srpen) signifikantně nelišily ($p > 0,05$). Z grafu je však evidentní, že specifická aktivita v hlavičkách včelstva 23 i 131 je až dvojnásobně vyšší než v hlavičkách včelstva 24. Může to znamenat, že včely ze včelstva 23 a 131 trpěly více oxidačním stresem než včely ze včelstva 24.

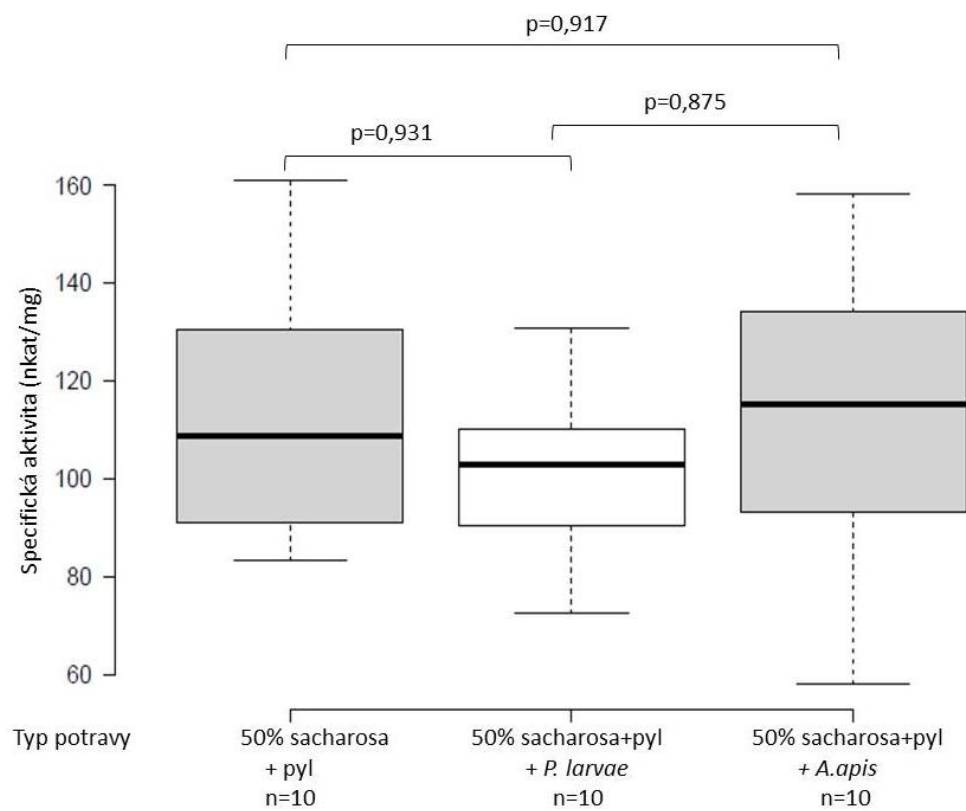
V hrudnicích včel se hodnoty specifických aktivit (Obr. 18) pohybovaly od 50 do 185 nkat/mg. V rámci jednotlivých včelstev se hodnoty průměrů specifických aktivit mezi daty odběru (květen vs. srpen) příliš nelišily ($p > 0,05$), obdobně jako u hlaviček.

V zadečcích včel byla nejnižší hodnota specifické aktivity 48 nkat/mg, naopak nejvyšší hodnota byla 437 nkat/mg. Jak je již z grafu (Obr. 19) evidentní, hodnoty průměrů v květnu a srpnu byly signifikantně odlišné v rámci včelstva 23 i 24 ($p < 0,05$), u včelstva 131 se hodnoty průměrů aktivit mezi porovnávanými měsíci statisticky nelišily. Z grafu dále plyne, že nejvyšší hodnoty specifické aktivity CAT byly v srpnu u včelstva 23. Nejnižší hodnoty byly naměřeny u včelstva 131 jak v květnu, tak v srpnu.

V zadečcích vykazoval enzym CAT nejvyšší aktivitu v porovnání s ostatními částmi. Weirich *et al.* (2002) publikovali článek, ve kterém uvádí měření aktivity CAT. Ovšem neměřili aktivitu v celých částech těla včel, ale pouze ve vybraných tkáních, přičemž nejvyšší aktivitu vykazovaly žaludky dělnic a sperma trubců. Pro měření aktivity enzymu vycházeli také z protokolu dle Aebi (1984). Na tento článek navázali Collins *et al.* (2004), kteří měřili vliv enzymu na životnost a reprodukčnost matek.



Obr. 20: Graf porovnání vlivu potravy včel na hodnoty specifické aktivity enzymu CAT.



Obr. 21: Graf porovnání vlivu potravy včel na hodnoty specifické aktivity enzymu CAT.

Grafy na Obr. 20 a 21 shrnují vliv výživy, která v experimentálních skupinách obsahuje také patogeny *P. larvae* a *A. apis*, na hodnoty specifických aktivit v hrudnicích včel podrobených tomuto *in vitro* experimentu. V Obr. 21 byl porovnáván nejprve vliv potravy obsahující pouze 50% sacharosu s 50% sacharosu s pylem na hodnotu specifické aktivity. Dle výsledků se ukázal jako méně oxidačně stresující přísun samotného cukru (50% sacharosa). Hodnota pravděpodobnosti vyšla velminízká ($p < 0,0001$). Dále byl porovnáván vliv potravy obsahující samotný cukr a cukr obsahující patogen *P. larvae*. Zde se průměry hodnot také významně lišily ($p < 0,05$). Potrava obsahující cukr s pylem vedla k vyšší aktivitě CAT než samotný cukr s *P. larvae*. Obdobný trend se objevil i v případě, kdy byl cukr s příměsí patogenní houby *A. apis*, zde se průměry specifické aktivity lišily opět výrazně ($p < 0,05$). Rozdíly ve specifické aktivitě CAT se neprojevily při porovnání mezi sledovanými patogeny ($p = 0,698$).

Z grafu Obr. 21 jsou patrné vysoké hodnoty specifické aktivity hrudníků včel, které byly krmeny pylem, což je jedna z komponent běžné potravy. Pyl obsahuje lipidy, steroly, mastné kyseliny, aminokyseliny i vitamíny, jejichž obsah je mnohem vyšší než u ostatních produktů s výjimkou mateří kašičky. Proteiny tvoří až $\frac{1}{3}$ sušiny pylu, přičemž větší část zaujímají enzymy (Veselý *et al.*, 1985). Di Pasquale *et al.* (2013) se ve své práci zabývali vlivem několika typů pylu o přesně definovaném množství daných komponent na zdraví včel. Dle výsledků má pyl významný vliv na expresi proteinu vitellogeninu, jehož antioxidační účinky jsou připisovány schopnosti tvořit vazbu se zinkem (Corona *et al.*, 2007). Vlivem pylu na zdraví včel se ve své práci zabýval také Huang (2012), z jehož výsledků je evidentní, že pyl má pozitivní vliv na životnost včel, jelikož včely, které byly nakazeny patogenem *Nosema* a krmeny zároveň pylem, žily déle, než včely, jejichž potrava pyl neobsahovala. Nikolic *et al.* (2015) zkoumali hladinu aktivity CAT u včel, které byly chovány v městské oblasti, v průmyslové zóně a na venkově. Nejvyšší CAT aktivita byla naměřena u včel pocházejících z městské části. Tuto skutečnost připisují negativnímu vlivu organických polutantů, jelikož se ukazuje, že látky uvolněné spalováním nafty, což jsou např. polycyklické aromatické uhovodíky a chinony, vyvolávají tvorbu superoxidu a poškozují tak buněčné membrány (Nikolic *et al.* 2015).

V grafu na Obr. 21 jsou porovnávány hodnoty vlivu potravy, která obsahovala cukr (50% sacharosu) s pylem vs. potrava obsahující 50% sacharosu s pylem a patogeny. Přítomnost pylu v potravě vede k vyšší specifické aktivitě CAT. Hodnoty srovnávaných

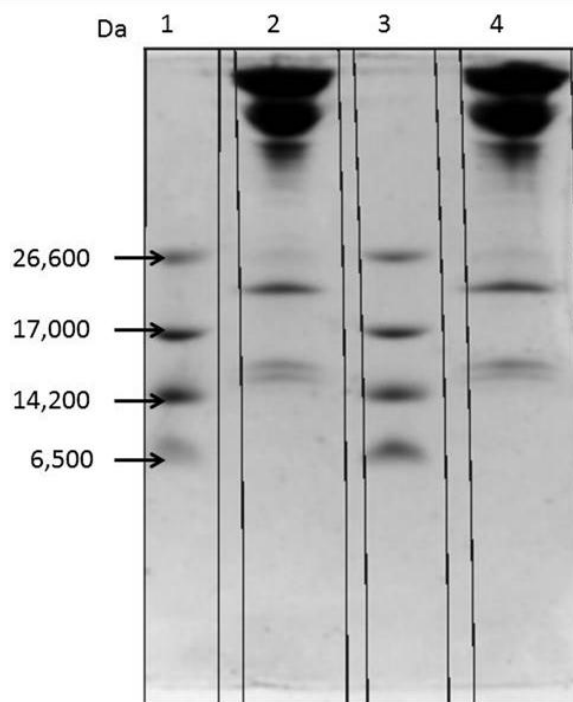
průměrů specifických aktivit naměřených v jednotlivých skupinách se dle t-testu nelišily ($p > 0,05$). Na specifickou aktivitu CAT neměla opět přítomnost patogena (*P. larvaevs. houba A. apis*) výrazný vliv ($p = 0,875$). Tyto výsledky, kdy je v potravě obsahující pyl přítomen také patogen, jsou shodné s výsledky Alaux *et al.* (2011), kteří testovali, jaký vliv má potrava složená z pylu, kterým byly krmeny zdravé a včely infikované roztočem *V. destructor*. Potrava ovlivnila expresi vitellogeninu i aktivitu PO. Pyl aktivuje mnoho metabolických drah a také aktivuje expresi genů zodpovědných za dlouhověkost nebo produkci Amp (Alaux *et al.*, 2011). V našem experimentu krmení včel 50% sacharosou s pylem ovlivnila specifickou aktivitu CAT více, než potrava složená z 50% sacharosy, pylu a patogenu.

4.4 SDS-PAGE – porovnání metod vizualizace proteinů na gelech

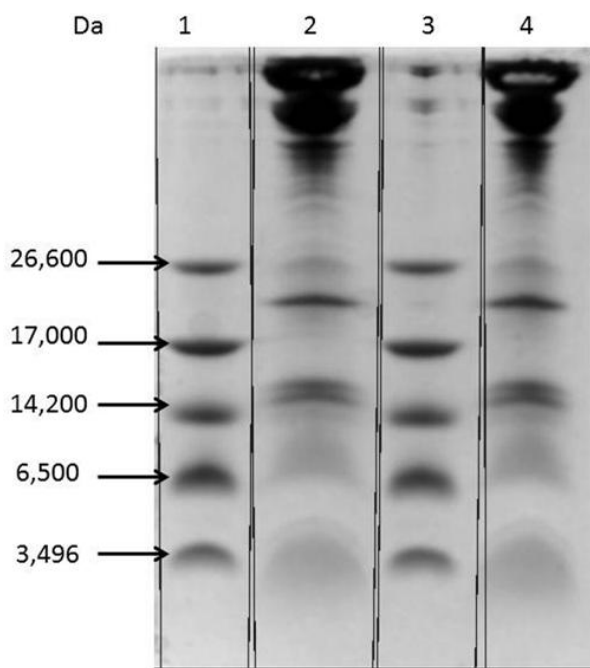
Srovnány byly jak metody vizualizace proteinů na gelech, tak i separační vlastnosti 16% tricínového gelu a 16% tricínového gelu s přísadkou 6M močoviny (Tab. 5) které byly připraveny podle původního protokolu dle Schäggera (2006).

Tab. 5: Optimalizace detekce proteinů na gelech.

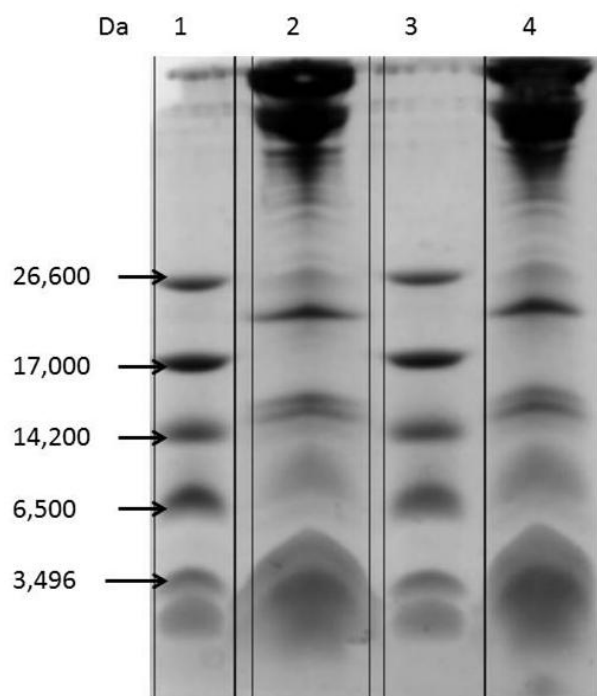
Typ gelu	Metoda detekce proteinů
16% tricínový	Klasické barvení CBB R-250 (Obr. 22)
	Koloidní barvení CBB G-250 (Obr. 23)
	Barvení roztokem CBB-G250 bez organického rozpouštědla (Obr. 24)
	Barvení stříbrem (Obr. 25)
16% tricínový + 6M močovina	Klasické barvení CBB R-250 (Obr. 26)
	Koloidní barvení CBB G-250 (Obr. 27)
	Barvení roztokem CBB-G250 bez organického rozpouštědla (Obr. 28)
	Barvení stříbrem (Obr. 29)



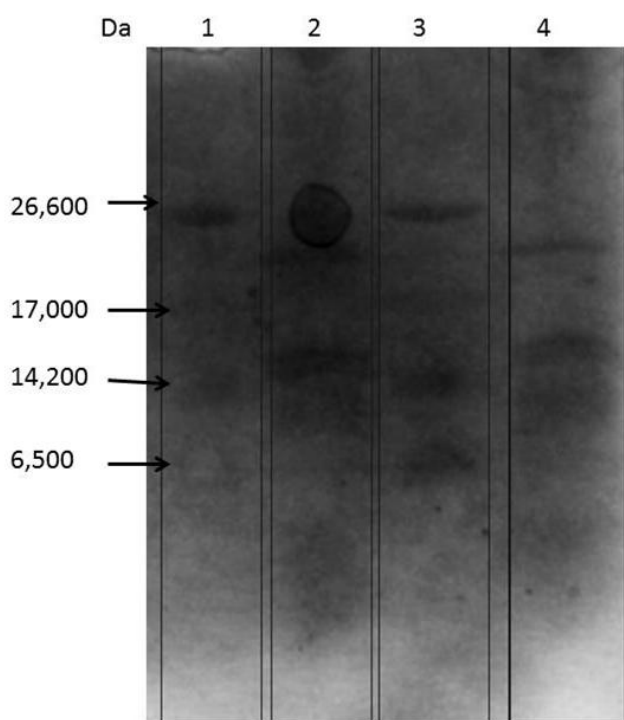
Obr. 22: Tricinový 16% gel, na kterém jsou proteiny vizualizovány klasickým CBB-R250 barvivem. V zónách jsou naneseny: 1,3 – standard ULMW; 2,4 – vzorek hemolymfy.



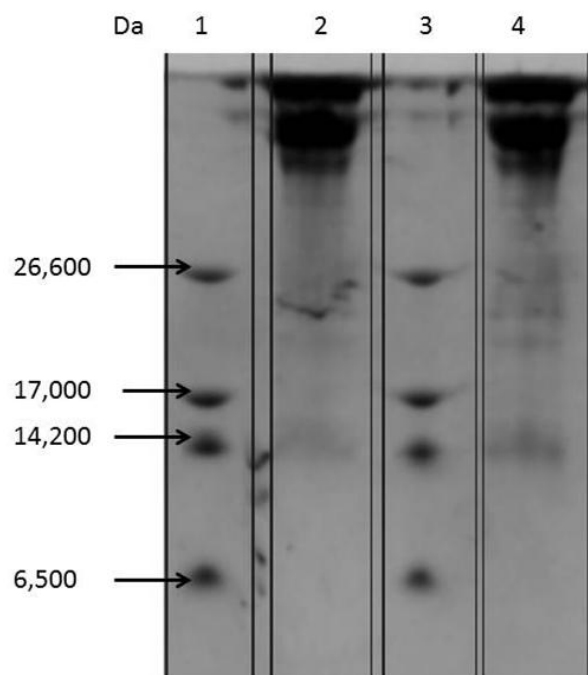
Obr. 23: Tricinový 16% gel, na kterém jsou proteiny vizualizovány koloidním CBB-G250 barvivem. V zónách jsou naneseny: 1,3 – standard ULMW; 2,4 – vzorek hemolymfy.



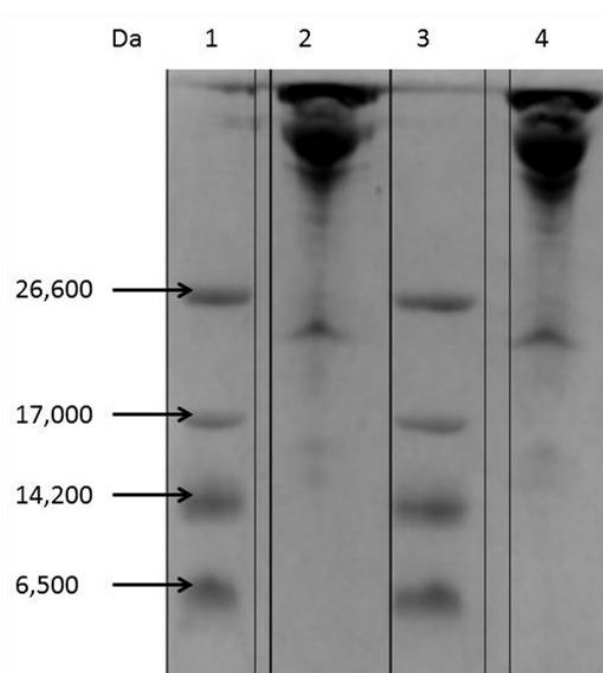
Obr. 24: Tricinový 16% gel, na kterém jsou proteiny vizualizovány barvivem CBB-G250 v mikrovlnné troubě. V zónách jsou naneseny: 1,3 – standard ULMW; 2,4 – vzorek hemolymfy.



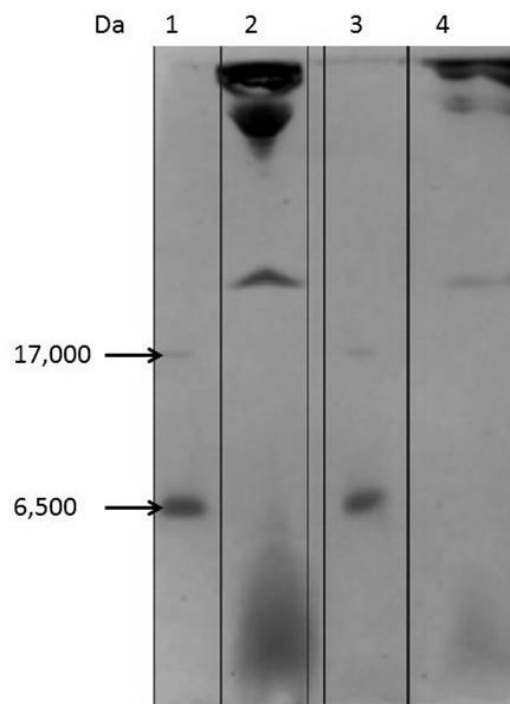
Obr. 25: Tricinový 16% gel, na kterém jsou proteiny vizualizovány stříbrem. V zónách jsou naneseny: 1,3 – standard ULMW; 2,4 – vzorek hemolymfy.



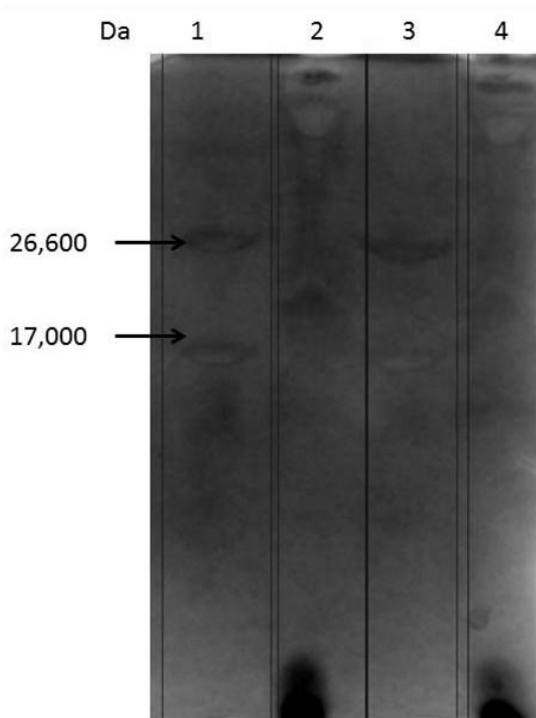
Obr. 26: Tricinový 16% gel s přidavkem 6M močoviny, na kterém jsou proteiny vizualizovány klasickým CBB-R250 barvivem. V zónách jsou naneseny: 1,3 – standard ULMW; 2,4 – vzorek hemolymfy.



Obr. 27: Tricinový 16% gel s přidavkem 6M močoviny, na kterém jsou proteiny vizualizovány koloidním CBB-G250 barvivem. V zónách jsou naneseny: 1,3 – standard ULMW; 2,4 – vzorek hemolymfy.



Obr. 28: Tricinový 16% gel s přidavkem 6M močoviny, na kterém jsou proteiny vizualizovány barvivem CBB-G250 bez organického rozpouštědla. V zónách jsou naneseny: 1,3 – standard ULMW; 2,4 – vzorek hemolymfy.



Obr. 29: Tricinový 16% gel s přidavkem 6M močoviny, na kterém jsou proteiny vizualizovány stříbrem. V zónách jsou naneseny: 1,3 – standard ULMW; 2,4 – vzorek hemolymfy.

V experimentu bylo provedeno porovnání dvou typů gelů – tricínového 16% a tricínového 16% s přidavkem 6M močoviny, kdy jako vhodnější se jevil gel bez

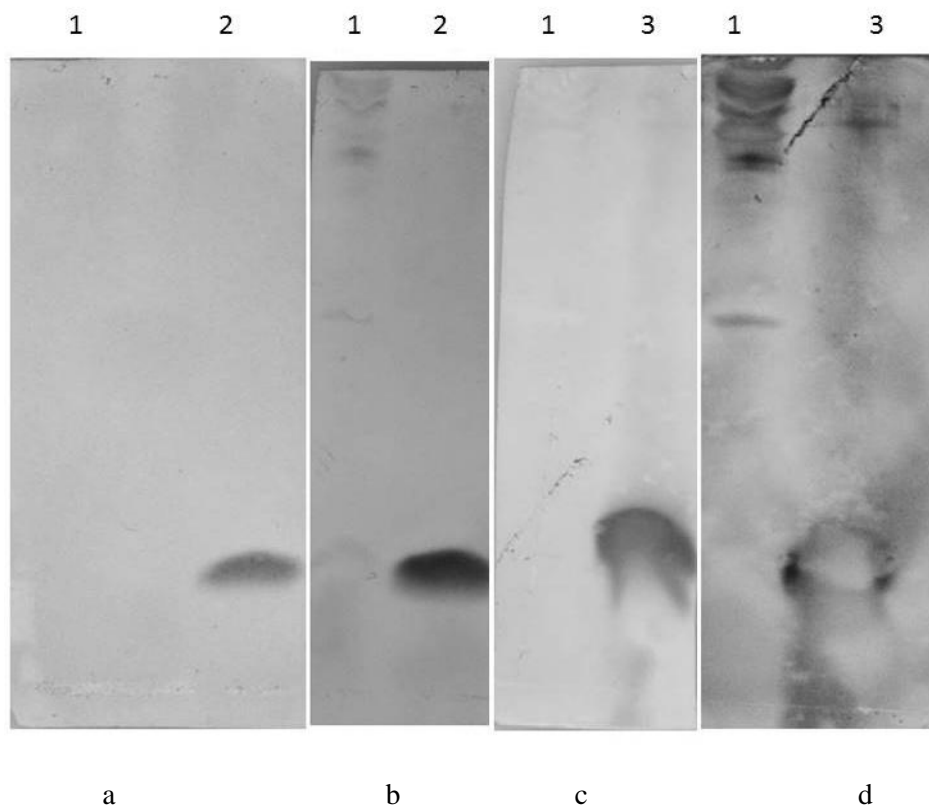
přídavku močoviny. Pro separaci proteinů o malé molekulové hmotnosti se ukázal jako optimální postup dle původního protokolu Schägger a von Jagdov (1987), kdy jde o tricínovou elektroforézu, díky které dochází k separaci proteinů od 1 do 100 kDa.

Jako optimální barvení pro detekci proteinů na obou gelech se ukázalo barvení koloidním CBB-G250 (Obr. 23 a Obr. 27), které vychází z protokolu dle Schäggera (2006), jelikož je možné pozorovat nejvíce vizualizovaných bandů. Velice citlivé se ukázalo také barvení tricínového 16% gelu, které proběhlo v mikrovlnné troubě v roztoku CBB-G250 (Obr. 24), provedené podle protokolu dle Lawrence a Besira (2009). Ze všech použitých metod je tato časově nejméně náročná (max. 20 minut), ovšem na gelu s přídavkem močoviny bylo vizualizováno menší množství bandů (Obr. 28). Metoda barvení stříbrem, která by měla být nejcitlivější, se ani v jednom případě použitých gelů jako vhodná neosvědčila (bandy nebyly dostatečně viditelné), což mohlo být způsobeno například nepřítomností některých aminokyselin (Asp, Glu, His, Cys, Met, Lys) v primární struktuře malých proteinů. Tato metoda opět vycházela z protokolu dle Schäggera (2006).

4.5 Imunodetekce antimikrobiálních peptidů abaecinu a defensinu po Western blotu

Nejprve byla provedena SDS-PAGE, kdy byly připraveny opět dva typy gelů – 16% tricínový a 16% tricínový s přídavkem 6M močoviny (Schägger, 2006). Do jamek na gely byla nanášena hemolymfa (zásobní roztok), 10 μ M roztok standardu AmP abaecinu a roztok CRK-defensinu o koncentraci 10mg/ml. Po ukončení elektroforézy byla provedena optimalizace Wb, která tedy spočívala jak v prověření typu gelu, typu membrány (NC, PVDF), tak v neposlední řadě ve složení blokovacího roztoku, kterými byly 5% (w/v) roztok sušeného odtučněného mléka a 5% (w/v) roztok BSA.

Bylo provedeno srovnání nitrocelulosových membrán po přenosu proteinů z 16% tricínového gelu (Obr. 30a-d), dále pak porovnání PVDF membrán po přenosu proteinů z 16% tricínového gelu, NC membrán po přenosu proteinů z 16% tricínového gelu s přídavkem 6M močoviny a srovnání PVDF membrán po přenosu proteinů z 16% tricínového gelu s přídavkem 6M močoviny.



Obr. 30a: Detekce antimikrobiálního peptidu abaecinu a defensinu1 metodou Western blot. NC membrána po přenosu proteinů z tricínového 16% gelu, blokování – roztok 5% sušeného mléka, v zónách jsou 1 – hemolymfa, 2 – 10µM abaecinu; Obr. 30b: NC membrána po přenosu proteinů z tricínového 16% gelu, blokování - roztok 5% BSA, v zónách jsou 1 – hemolymfa, 2 – 10µM abaecinu; Obr. 30c: NC membrána po přenosu proteinů z tricínového 16% gelu, blokování - roztok 5% sušeného mléka, v zónách jsou 1 – hemolymfa, 3 – CRK-defensin (10 mg/ml); Obr. 30d: NC membrána po přenosu proteinů z tricínového 16% gelu, blokování - roztok 5% BSA, v zónách jsou 1 – hemolymfa, 3 – CRK-defensin (10 mg/ml). Membrány na Obr. 30a,b byly inkubovány s protilátkou proti AmP abaecinu, membrány na Obr. 30c,d byly inkubovány s protilátkou proti AmP defensinu.

Po provedení Wb, kdy došlo k přenosu daných proteinů na membrány, byly výsledky vizualizovány enzymatickou reakcí alkalickou fosfatase s barvivem obsahující AP pufr, NBT a BCIP. Jako vhodné se dle srovnávaných výsledků projevilo spojení přenosu proteinů z tricínového 16% gelu na NC membránu (Obr. 30). Zde byly nejlépe viditelné pásy detekovaných proteinů. Na Obr. 30a a 30b došlo k pozitivní detekci AmP abaecinu, při srovnání těchto dvou membrán se ukázal jako vhodnější blokovací roztok 5% BSA (Obr. 30b), kdy je tento peptid detekovatelný také ve vzorku hemolymfy, ovšem nerozseparovaný, ale navázaný zřejmě na větších proteinech, protože vizualizované bandy se vyskytují v horní části membrán. Totéž platí pro srovnání Obr. 30c a Obr. 30d, kde však byl nanesen místo abaecinu CRK-defensin. Jelikož jsou oba antimikrobiální peptidy přítomny také v hemolymfě, mohly být včely infikovány jak G^+ , tak G^- bakterií (Casteel *et al.*, 1990).

Z výsledků je tedy patrné, že optimální volbou pro detekci AmP včel je membrána NC. Negativní výsledky na PVDF membránách mohou být způsobeny jejich vyšším pozadím, čemuž se dá předejít pečlivým promytím (Mahmood a Young, 2012), nebo tím, že je PVDF membrána v porovnání s NC membránou více hydrofobní a tudíž špatněinteraguje s AmP (Kang a Cao, 2014).

5 Závěr

V teoretické části byla vypracována rešerše na téma signálních drah a regulace exprese a hladiny komponent humorální složky imunitního systému hmyzu se zaměřením na včelu medonosnou, včetně přehledu metod analýzy složek humorální imunity včel.

V praktické části byla provedena analýza vybraných fyziologických a biochemických parametrů na vzorcích včel odebraných ze včelstev v různou roční dobu. V některých vzorcích homogenátů částí těl včel se porovnávají hodnoty koncentrací proteinů a také specifických aktivit enzymu katalasy mezi jednotlivými měsíci odběru v rámci včelstev signifikantně lišily, i když v některých případech se tento trend neopakoval. V práci byl porovnán také vliv obsahu potravy včetně patogenů (*A. apis*, *P. larvae*) na oxidační stres hmyzu. Z výsledků plyne, že potrava obsahující pyl vedla k vyšší aktivitě CAT.

Dále byly optimalizovány metody detekce antimikrobiálních peptidů elektroforetickými a imunochemickými metodami. Bylo zjištěno, že pro detekci proteinů na gelu jak 16% tricínovém, tak 16% tricínovém s přídavkem močoviny je optimální vizualizace koloidním barvivem Coomassie Brilliant Blue G-250, přičemž gel bez přídavku močoviny je pro separaci vhodnější. Pro imunodetekci Western blotem vykazovalo optimální výsledky spojení přenosu proteinů z gelu tricínového 16% na nitrocelulosovou membránu. Pro blokování membrány vykazoval optimální výsledky blokovací roztok obsahující 5% (w/v) BSA v TBS roztoku.

6 Literatura

Aebi H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* **105**, 121-126.

Alaux C., Dantec Ch., Parrinello H., Le Conte Y. (2011): Nutrigenomics in honey bees: digital gene expression analysis of pollen's nutritive effects on healthy and varroa-parasitized bees. *BMC Genomics* **12**:496, <https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-12-496>.

Anderson N. L., Esquer-Blasco R., Hofmann J., Anderson N. G. (1991): A two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effect studies. *Electrophoresis* **12**, 907-930.

Antunez K., Martin-Hernandez R., Prieto L., Meana A., Zunino P., Higes M. (2009): Immune suppression in the honey bee (*Apis mellifera*) following infection by *Nosema ceranae* (*Microsporidia*). *Environmental Microbiology* **11**, 2284-2290.

Apel K., Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 373-399.

Aronstein K. A., Murray K. D. (2010): Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, 20-29.

Arslan A, Standifer L. N., Don H. (1986): Carbohydrates in honey bee hemolymph. *Comparative Biochemistry and Physiology* **84**, 363-367.

Ashida M., Brey P. (1997). Recent advances on the research of the insect prophenoloxidase cascade. In: *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects* (eds Brey P., Hultmark D., editors), Chapman & Hall, Londýn, 135–172.

Bachanová K., Klaudivy J., Kopernický J., Šimúth J. (2002): Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae larvae* through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie* **33**, 259-269.

Baracchi D., Turillazzi S. (2010): Differences in venom and cuticular peptides in individuals of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) determined by MALDI-TOF MS. *Journal of Insect Physiology* **56**, 366-375.

Bidla G., Lindgren M., Theopold U., Dushay M. S. (2005): Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila larvae*. *Developmental and Comparative Immunology* **29**, 669-679.

Bíliková K., Wu G., Šimúth J. (2001): Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie* **32**, 275-283.

Boecking O., Spivak M. (1999): Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud. *Apidologie* **30**, 141-158.

Borba R. S., Klyczek K. K., Mogen K. L., Spivak M. (2015): Seasonal benefits of a natural propolis envelope to honey bee immunity and colony health. *Journal of Experimental Biology* **218**, 3689-3699.

Bradford M. M. (1976): Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.

Brandt A., Gorenflo A., Siede R., Meixner M., Büchler R. (2016): The neonicotinoids thiacloprid, imidacloprid, and clothianidin affect the immunocompetence of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology* **86**, 40-47.

- Bulet P., Hetru Ch., Dimarcq J., Hoffman D. (1999): Antimicrobial peptides in insects; structure and function. *Developmental and Comparative Immunology* **23**, 329-344.
- Callewaert L., Michiels C. W. (2010): Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences* **351** 127-160.
- Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G. M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P. G. (2004): Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis* **25**, 1327-1333.
- Casteels P., Ampe Ch., Jacobs F., Vaenck M., Tempst P. (1989): Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal* **8**, 2387-2391.
- Casteels P., Ampe C., Riviere L., Vandamme J., Elicone C., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. (1990): Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry* **187**, 381-386.
- Casteels P., Ampe Ch., Jacobs F., Tempst P. (1993): Functional and Chemical Characterization of *Hymenoptaecin*, an Antibacterial Polypeptide That Is Infection-inducible in the Honeybee (*Apis mellifera*). *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 7044-7054.
- Cerenius L., Lee B. L., Söderhäll K. (2008): The proPO-system: pros and cons for its role in invertebrate immunity. *Trends in Immunology* **29**, 263-271.
- Collins A. M., Williams V., Evans J. D. (2004): Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **13**, 141-146.
- 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 of the United States of America* **104**, 7128-7133.
- Cremer S., Armitage S. A. O., Schmid-Hempel P. (2007): Social immunity. *Current Biology* **17**, 693-702.
- Danihlík J., Aronstein K., Petřivalský M. (2015): Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research* **54**, 123-136.
- Di Pasquale G., Salignon M., Le Conte Y., Belzunces L. P., Decourtye A., Kretzschmar A., Suchail S., Brunet J., Alaux C. (2013): Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter?. *PLoS ONE* **8**(8): e72016, <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0072016>.
- Doležilková I., Macková M., Macek T. (2011): Antimikrobiální peptidy: Vztah mezi jejich strukturou a antibakteriální aktivitou. *Chemické listy* **105**, 346-355.
- Dong J., Ying B., Huang S., Ma S., Long P., Tu X., Yang W., Wu Z., Chen W., Miao X. (2015): High-performance liquid chromatography combined with intrinsic fluorescence detection to analyse melittin in individual honeybee (*Apis mellifera*) venom sac. *Journal of Chromatography B* **1002**, 139-143.
- Dyballa N., Metzger S. (2009): Fast and sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteins in polyacryamide gels. *Journal of Visualized Experiments* **30**, 1431.
- Ebeling J., Knispel H., Hertlein G., Fünfhaus A., Genersch E. (2016): Biology of *Paenibacillus larvae*, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**, 7387-7395.

- Eleftherianos I., Revenis C. (2011): Role and Importance of Phenoloxidase in Insect Hemostasis. *Journal of Innate Immunity* **3**, 28-33.
- Evans J. D. (2004): Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **85**, 105-111.
- Evans J. D., Aronstein K., Chen Y.P., Hetru C., Imler J.L., Jiang H., Kanost M., Thompson G.J., Zou Z., Hultmark D. (2006) Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **15**, 645-656.
- Fazekas De St. Groth S., Webster R. G., Datyner A. (1963): Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochimica et Biophysica Acta* **71**, 377-391.
- Felton G. W., Summers C. B. (1995): Antioxidant System in Insect. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **29**, 187-197.
- Fontana R., Mendes M. A., de Souza B. M., Konno K., César L. M. M., Malaspina O., Palma M. S. (2004): Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* **25**, 919-928.
- Forsgren E. (2010): European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, 5-9.
- Fridovich I. (1978): The biology of oxygen radicals. *Science* **201**, 875-880.
- Fries I. (2010): *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*). *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, 73-79.
- Ganz T. (2003): Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nature Reviews Immunology* **3**, 710-720.
- Garfin D. E. (2002): Chapter 29 One-Dimensional Gel Electrophoresis. *Methods in Enzymology* **463**, 497-513.
- Genersch E. (2010): American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, 10-19.
- Gillespie J. P., Kanost M. R., Trenczek T. (1997): Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* **42**, 611-643.
- González-Santoyo I., Córdoba-Aguilar A. (2012): Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **142**, 1-16.
- Goulson D., Nicholls E., Botías C., Rotheray E. L. (2015): Bee declines driven by combined stress from parasites, pesticides, and lack of flowers. *Science* **347**, <http://science.sciencemag.org/content/347/6229/1255957>.
- Granvogl B., Plöschner M., Eichacker L. A. (2007): Sample preparation by in-gel digestion for mass spectrometry-based proteomics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 991-1002.
- Groth S. F. S., Webster R. G., Datyner A. (1963): Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins in electrophoresis strips. *Biochimica et Biophysica Acta* **71**, 377-391.
- Guaní-Guerra E., Santos-Mendoza T., Lugo-Reyes S. O., Terán L. M. (2010): Antimicrobial peptides: General overview and clinical implications in human health and disease. *Clinical Immunology* **135**, 1-11.

- Henry M. (2012): A Common Pesticide Decreases Foraging Success and Survival in Honey Bees. *Science* **336**, 348-350.
- Holak T. A., Engström A., Kraulis P. J., Lindeberg G., Bennich H., Jones T. A., Gronenborn A. M., Clore G. M. (1988): The Solution Conformation of the Antibacterial Peptide Cecropin A: A Nuclear Magnetic Resonance and Dynamical Simulated Annealing Study. *Biochemistry* **27**, 7620-7629.
- Hořejší V., Bartůňková J (2005): Základní pojmy, funkce a složky imunitního systému. In: *Základy imunologie*. 4 (Britnická R. ed.), TRITON, Praha, 23.
- Huang Z. (2012): Pollen nutrition affects honey bee stress resistance. *Terrestrial Arthropod Reviews* **5**, 175-189.
- Chaimanee Y., Chantawannakul P., Chen Y., Evans J. D., Pettis J. S. (2012): Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology* **58**, 1090-1095.
- Chan Q. W. T., Melathopoulos A. P., Pernal S. F., Foster L. J. (2009): The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *BMC Genomics* **10**:387, <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-387>.
- Chelikani P., Fita I., Loewen P. C. (2004): Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 192-208.
- Chen Y. P., Siede R. (2007): Honey Bee Viruses. *Advances in Virus Research* **70**, 33-80.
- Chevallet M., Luche S., Rabilloud T. (2006): Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Nature protocols* **1**(4), 1852-1858.
- Issaq H. J., Veenstra T. D. (2008): Two-dimensional polyacrylamide gel electro-phoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *BioTechniques* **44**, 697-700.
- James R. R., Xu J. (2012): Mechanism by which pesticides affect insect immunity. *Journal of Invertebrate Pathology* **109**, 175-182.
- Johnson R. M. (2015): Honey Bee Toxikology. *Annual Review of Entomology* **60**, 415-434.
- Kang D. H., Gho Y. S., Suh M. K., Kang C. H. (2002): Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **23**, 1511-1512.
- Kang G., Cao Y. (2014): Application and modification of poly(vinylidene fluoride) (PVDF) membranes – A review. *Journal of Membrane Science* **463**, 145-165.
- Kanost M. R., Kawooya J. K., Law J. H., Ryan R. O., Van Heusden M. C., Ziegler R. (1990): Insect haemolymph proteins. *Advances in Insect Physiology* **22**, 299-396.
- Kanost M. R., Jiang H., Yu X. (2004): Innate immune responses of a lepidopteran insect, *Manduca sexta*. *Immunological Reviews* **198**, 97-105.
- Kinter M., Sherman N. E. (2005): Basic Polyacrylamide Gel Electrophoresis. In: *Protein sequencing and identification using tandem mass spektrometry*. 9 (Desiderio D. M., Nibbering N. M. M. ed.), John Wiley & Sons.
- Klaudiny J., Bachanová K., Albert Š., Halgašová L., Džurová M., Kopernický J. (2009): Honeybee defensin: their characterization and studies of their expression in honeybee colonies. *Collection Symposium Series* **11**, 59-63.

- Kodrík D. (2004): *Fyziologie hmyzu*. České Budějovice: Entomologický ústav Akademie věd České republiky, Biologická fakulta, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích.
- Kotani E., Yamakawa M., Iwamoto S., Tashiro M., Mori H., Sumida M., Matsubara F., Taniai K., Kadono-Okuda K., Kato Y., Mori H. (1995): Cloning and expression of the gene of hemocytin, an insect humoral lectin which is homologous with the mammalian von Willebrand factor. *Biochimica et Biophysica* **1260**, 245-258.
- Kurien B. T., Scofield R. H. (2006): Western blotting. *Methods* **38**, 283-293.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lalouette L., Williams C. M., Hervant F., Sinclair B. J., Renault D. (2011): Metabolic rate and oxidative stress in insects exposed to low temperature thermal fluctuations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **158**, 229-234.
- Lampeitl F. (1996): Nemoci, nepřítelé a škůdci včel. In: *Chováme včely*. 103 (Škoda V.), Vydavatelství a nakladatelství BLESK, Ostrava 2.
- Lapidge K. L., Oldroyd B. P., Spivak M. (2002): Seven suggestive quantitative trait loci influence hygienic behavior of honey bees. *Naturwissenschaften* **89**, 565-568.
- Laughton A. M., Siva-Johty M. T. (2011): A standardised protocol for measuring phenoloxidase and prophenoloxidase in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **42**, 140-149.
- Lavine M. D., Strand M. R. (2002): Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 1295-1309.
- Lawrence A., Besir H. (2009): Staining of Proteins in Gels with Coomassie G-250 without Organic Solvent and Acetic Acid. *JoVE* **30**, <https://www.jove.com/video/1350/staining-proteins-gels-with-coomassie-g-250-without-organic-solvent>.
- Li D., Scherfer C., Korayem A. M., Zhao Z., Schmidt O., Theopold U. (2002): Insect hemolymph clotting: evidence for interaction between the coagulation system and the prophenoloxidase activating cascade. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 919-928.
- Li W., Ma G., Zhou X. (2006): Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure–function relationships and mode of action. *Peptides* **27**, 2350-2359.
- Lipinski Z., Zoltowska K. (2005): Preliminary evidence associating oxidative stress in honey bee drone brood with *Varroa destructor*. *Journal of Apicultural Research* **44**, 126-127.
- Mahmood T., Yang P. (2012): Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting. *North American Journal of Medical Sciences* **4**, 429-434.
- Matés J. M., Pérez-Gómez C., de Castro I. N. (1999): Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clinical Biochemistry* **32**, 595-603.
- Matoušková M., Ruttkay-Nedecký B., Kizek R. (2014): Antioxidační enzymy-biochemické markery oxidačního stresu. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies* **3**, 53-56.
- Merril C. R., Goldman D., Van Keuren M. L. (1983): Silver staining methods for polyacrylamide gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* **96**, 230-239.
- Misra J. R., Horner M. A., Lam G., Thummel C. S. (2011): Transcriptional regulation of xenobiotic detoxification in *Drosophila*. *Genes & Development* **25**, 1796-1806.

- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.
- Nakamura J., Seeley T. D. (2006): The functional organization of resin work in honeybee colonies. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **60**, 339-349.
- Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W. (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- Nielsen S. L., Nicolaisen M., Kryger P. (2008): Incidence of acute bee paralysis virus, black queen cell virus, chronic bee paralysis virus, deformed wing virus, Kashmir bee virus and sacbrood virus in honey bees (*Apis mellifera*) in Denmark. *Apidologie* **39**, 310-314.
- Nikolić T. V., Purać J., Orčić S., Kojić D., Vujanović D., Stanimirović Z., Gržetić I., Ilijević K., Šikoparija B., Blagojević D. P. (2015): Environmental effects on Superoxide dismutase and Catalase activity and expression in honey bee. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **90**, 181-194.
- Otvos L. (2000): Antibacterial peptides isolated from insect. *Journal of Peptide Science* **6**, 497-511.
- Ownby Ch. L., Powell J. R., Jiang M., Fletcher J. E. (1997): Melittin and phospholipase A2 from bee (*Apis mellifera*) venom cause necrosis of murine skeletal muscle *in vivo*. *Toxicon* **35**, 67-80.
- Parkinson A. (2001): *Biotransformation of xenobiotics*. McGraw-Hill, New York, USA, 224 stran.
- Paoletti F., Aldinucci D., Mocali A., Caparrini A. (1986): A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide-dismutase activity in tissue-extracts. *Analytical Biochemistry* **154**, 536-541.
- Paoletti F., Mocali A. (1990): Determination of superoxid-dismutase activity by purely chemical-system based on NAD(P)H oxidation. *Methods in Enzymology* **186**, 209-220.
- Pink M., Verma M., Rettenmeier A. W., Schmitz-Spanke S. (2010): CBB staining protocol with higher sensitivity and mass spectrometric compatibility. *Electrophoresis* **31**, 593-598.
- Pratavieira M., da Silva Menegasso A. R., Caviquioli Garcia A. M., dos Santos D. S., Gomes P. C., Malaspina O., Palma M. S. (2014): MALDI Imaging Analysis of Neuropeptides in the Africanized Honeybee (*Apis mellifera*) Brain: Effect of Ontogeny. *Journal proteome research* **13**, 3054-3064.
- Ponnuvel K. M., Yamakawa M. (2002): Immune responses against bacterial infection in *Bombyx mori* and regulation of host gene expression. *Current Science* **83**, 447-454.
- Randolt K., Gimple O., Geissendörfer J., Reinders J., Prusko C., Mueller M. J., Albert S., Tautz J., Hildburg B. (2008): Immune-Related Proteins Induced in the Hemolymph After Aseptic and Septic Injury Differ in Honey Bee Worker Larvae and Adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **69**, 155-167.
- Reddy K. V. R., Yedery R. D., Aranha C. (2004): Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents* **24**, 536-547.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1-Kda to 100-Kda. *Analytical Biochemistry*, **166**, 368-379.

- Schägger H. (2006) Tricine SDS-PAGE, *Nature Protocols***1**, 16-23.
- Söderhäll K., Cerenius L. (1998): Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Current Opinion in Immunology* **10**, 23-28.
- Stoscheck Ch. M. (1990): Quantitation of protein. *Methods in Enzymology* **182**, 50-68.
- Strand M. R. (2008): The insect cellular immune response. *Insect Science***15**, 1-14.
- Strandberg E., Ulrich A. S. (2004): NMR methods for studying membrane-active antimicrobial peptides. *Concepts in Magnetic Resonance* **23**, 89-120.
- Tautz J. (2010): *Fenomenální včely*. 2nd ed., Brázda, Praha, 270 stran.
- Tseng J., Huang J., Huang H., Tzen J. T. C., Chou W., Peng Ch. (2011): Facilitative production of an antimicrobial peptide royalisin and its antibody via an artificial oil-body system. *Biotechnology Progress* **27**, 153-161.
- Turillazzi S., Mastrobuoni G., Dani F. R., Moneti G., Pieraccini G., la Marca G., Bartolucci G., Perito B., Lambardi D. (2006): Dominulin A and B: Two New Antibacterial Peptides Identified on the Cuticle and in the Venom of the Social Paper Wasp *Polistes dominulus* Using MALDI-TOF, MALDI-TOF/TOF, and ESI-Ion Trap. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **17**, 376-383.
- Veselý V., Bacílek J., Drobníková V., Haragsim O., Kamler F., Knížek F., Kodoň S., Krieg P., Kubišová S., Peroutka M., Ptáček V., Škrobal D., Tempír Z., Titěra D. (1985): *Včelařství*. 1st ed., Státní zemědělské nakladatelství, Praha.
- Vilmos P., Kurucz É. (1998): Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters***62**, 59-66.
- Vizioli J., Salzet M. (2002): Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends in Pharmacological Sciences* **23**, 494-496.
- Voet D., Voetová J. G. (1995): *Biochemie*. 1st ed., Victoria Publishing, Praha, 1325 stran.
- Wang X., Li X., Li Y. (2007): A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnology Letters* **29**, 1599-1603.
- Weirich G. F., Collins A. M., Williams V. P. (2002): Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie* **33**, 3-14.
- Westermeyer R., Marouga R. (2005): Protein detection methods in proteomics research. *Bioscience Reports* **25**, 19-32.
- Williams G. R., Alaux C., Costa C., Csáki T., Doublet V., Eisenhardt D., Fries I., Kuhn R., McMahon D. P., Medrzycki P., Murray T. E., Natsopoulou M. E., Neumann P., Oliver R., Paxton R. J., Pernal S. F., Shutler D., Tanner G., van der Steen J. J. M., Brodchneider R. (2013): Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under in vitro laboratory conditions. *Journal of Apicultural Research* **52**, 1-36.
- Wu M., Maier E., Benz R., Hancock R. E. W. (1999): Mechanism of Interaction of Different Classes of Cationic Antimicrobial Peptides with Planar Bilayers and with the Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry***38**, 7235-7242.
- Yang X., Cox-Foster D. L. (2005): Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: Evidence for host immunosuppression and viral amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **102**, 7470-7475.

- Yue C., Genersch E. (2005): RT-PCR analysis of *Deformed wing virus* in honeybees (*Apis mellifera*) and mites (*Varroa destructor*). *Journal of General Virology* **86**, 3419-3424.
- Zámocký M. (1998): Spektroskopické a enzymologické vlastnosti kvasinkovej peroxidázovej katalázy. *Chemické listy* **92**, 875-882.
- Zámocký M., Koller F. (1999): Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **72**, 19-66.
- Zasloff M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.
- Zelko I. N., Mariani T. J., Folz R. J. (2002): SUPEROXIDE DISMUTASE multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology & Medicine* **33**, 337-349.
- Zhou J., Zhao J., Zhang S., Shen J., Qi Y., Xue X., Li Y., Wu L., Zhang J., Chen F., Chen L. (2010): Quantification of melittin and apamin in bee venom lyophilized powder from *Apis mellifera* by liquid chromatography–diode array detector–tandem mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* **404**, 171-178.

7 Seznam použitých zkratek

ABPV	virus akutní paralýzy včel
AmP	antimikrobiální peptidy
AP	alkalická fosfatasa
AS	aktivační systém
β -1,3-G	β -1,3-glukan
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát
BQCV	virus černání matečnicků
BSA	hovězí sérový albumin
CAT	katalasa
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CBPV	virus chronické paralýzy včel
Cp	ceruloplasmin
DWV	virus deformující křídla
GPX	glutathionperoxidasa
G ⁻	Gram-negativní bakterie
G ⁺	Gram-pozitivní bakterie
KBV	Kašmírský virus
LPS	lipopolysacharid
MCD-peptid	Mast cell degranulating peptid
NBT	nitrotetrazoliová modř
NC	nitrocelulosa
PG	peptidoglykan
PO	fenoloxidasa
ProPO	profenoloxidasa
Pro-AS	profenoloxidasový aktivační systém
PVDF	polyvinyliden fluorid
ROS	reaktivní formy kyslíku
SBV	virus pytlíčkovitého plodu

SDS	dodecylsulfát sodný
SOD	superoxiddismutasa
ULMW	Ultra Low range Molecular Weight
Wb	Western blotting