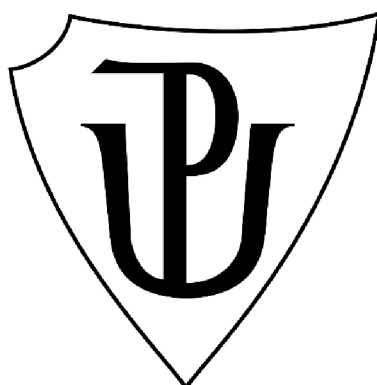


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Produkce antimikrobiálních peptidů v různých
vývojových stádiích včely medonosné**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Antonín Bednář
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Rok:	2023

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a 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. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....
Podpis studenta

Chtěl bych poděkovat Mgr. Jiřímu Danihlíkovi Ph.D. za trpělivost a cenné rady při vedení práce. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Zuzaně Žvátorové a Mgr. Janě Jemelkové za zaučení v metodách této bakalářské práce. Nakonec bych rád poděkoval všem zaměstnancům katedry biochemie za vstřícný přístup a příjemnou atmosféru během mé práce na experimentální části.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Antonín Bednář
Název práce	Produkce antimikrobiálních peptidů v různých vývojových stádiích včely medonosné (<i>Apis mellifera</i>)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Jiří Danihlík Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p>Pro včelu medonosnou jako zástupce eusociálního hmyzu je schopnost bránit se patogenům esenciální. Obranu proti cizím organismům zajišťuje pro včelu medonosnou imunitní systém, který na rozdíl od obratlovců tvoří jen vrozená imunita. Ta sestává z několika úrovní, fyzikální, buněčné a humorální. V této práci jsou popsány antimikrobiální peptidy jakožto součást humorální imunity hmyzu a včely medonosné. Jsou charakterizovány z hlediska jejich funkce, vlastností, struktury a mechanismu účinku. Dále jsou definovány rozdíly mezi různými vývojovými stádii, kastami a populacemi včely medonosné z hlediska imunitní odpovědi. V experimentální části je popsána detekce hymenoptaecinu, defensinu 1 a abaecinu pomocí metody ELISA, detekce apidaecinu 1 pomocí LC-MS techniky a stanovení celkových proteinů v plodu včely medonosné pomocí Bradfordovy metody. Pomocí Bradfordovy metody byla změřena koncentrace celkových proteinů v extraktu ze včelího plodu získaného precipitací velkých proteinů. Metodou ELISA byly ve včelím plodu detekovány antimikrobiální peptidy defensin 1, hymenoptaecin a abaecin, přičemž největší koncentrace byla detekována u larev těsně před zavíčkováním. Pomocí LC-MS byl v larvách včely medonosné detekován apidaecin 1. Detekován byl nejčastěji u starších larev těsně před zavíčkováním. Pro spolehlivou kvantifikaci apidaecinu 1 je ovšem potřeba</p>

provést optimalizaci metody tak, aby došlo k odstranění interferujících látek z homogenátu. U larev včely medonosné byla potvrzena produkce defensinu 1, abaecinu, hymenoptaecinu a apidaecinu 1. Tyto poznatky je třeba dále posílit dalšími měřeními na větších skupinách vzorků, aby bylo možno vypořádat případné trendy v produkci těchto antimikrobiálních peptidů v plodu včely medonosné.

Klíčová slova	Antimikrobiální peptidy, apidaecin, defensin, hymenoptaecin, abaecin, včela medonosná, plod, larvy, LC-MS, ELISA
Počet stran	53
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Antonín Bednář
Title	Production of antimicrobial peptides in various developmental stages of honeybee (<i>Apis mellifera</i>)
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Jiří Danihlík Ph.D.
The year of presentation	2023
Abstrakt	<p>The ability to defend against pathogens is essential for honeybee as an eusocial insect. Defense against foreign organisms is provided by honeybee's immune system, which, unlike in vertebrates, consists only of innate immunity. That consists of multiple levels, physical, cellular and humoral. In this thesis are described antimicrobial peptides as a part of the humoral immunity of insects and honeybees. They are characterised considering their function, properties, structure and mechanism of effect. Furthermore, differences between different developmental stages, castes and generations of honeybee in terms of their immune response are defined. In the experimental part, determination of total protein in honeybee brood using Bradford assay, detection of hymenoptaecin, defensin 1 and abaecin using the ELISA method and detection of apidaecin 1 using LC-MS technique are described. Concentration of total protein obtained after precipitation of large proteins was determined using the Bradford method. Using the ELISA method, antimicrobial peptides defensin 1, hymenoptaecin and abaecin were detected in honeybee brood, while highest concentrations were detected in larvae on the verge of capping. Using LC-MS, apidaecin 1 was detected in honeybee larvae. It was most frequently detected in older larvae and larvae on the verge of capping. Optimization of the method with the goal of removing</p>

interfering substances from the homogenate is required for reliable quantification of apidaecin 1. Production of defensin 1, abaecin, hymenoptaecin and apidaecin 1 was confirmed in honeybee larvae. It is necessary to further reinforce these findings with further experiments with bigger sample sets in order to find possible patterns in production of these antimicrobial peptides in honeybee brood.

Keywords	Antimicrobial peptides, apidaecin, defensin, hymenoptaecin, abaecin, honeybee, brood, larvae, LC-MS, ELISA
Number of pages	53
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Současný stav řešené problematiky	2
2.1	Včela medonosná	2
2.2	Imunita hmyzu a včely medonosné.....	3
2.2.1	Fyzikální bariéry	4
2.2.2	Buněčná imunita	5
2.2.2.1	Fagocytující hemocyty	5
2.2.2.2	Hemocyty zprostředkovávající enkapsulaci.....	6
2.2.2.3	Hemocyty produkující komponenty humorální imunity	6
2.2.3	Humorální imunita	7
2.2.3.1	Melanizační kaskáda	7
2.2.3.2	Lysozymy.....	8
2.2.3.3	Antimikrobiální peptidy.....	8
2.2.4	Antimikrobiální peptidy včely medonosné	9
2.2.4.1	Defensiny	9
2.2.4.2	Apidaeciny	10
2.2.4.3	Hymenoptaecin	10
2.2.4.4	Abaecin	11
2.2.4.5	Melittin a jiné peptidy včelího jedu	11
2.2.4.6	Jelleiny	12
2.2.5	Metody výzkumu antimikrobiálních peptidů.....	12
2.2.5.1	Původní metody detekce a charakterizace AmP	12
2.2.5.2	Moderní techniky detekce a kvantifikace	13
2.2.6	Signální dráhy	14
2.2.6.1	Spouštěče signálních drah.....	14
2.2.6.2	Toll signální dráha	15
2.2.6.3	Imd signální dráha.....	16
2.2.6.4	JAK/STAT signální dráha.....	17
2.3	Rozdíly v imunitních reakcích včel	17
2.3.1	Rozdíly mezi vývojovými stádii	17
2.3.2	Rozdíly mezi včelami různého stáří.....	18
2.3.3	Rozdíly mezi populacemi.....	19
2.3.4	Rozdíly mezi kastami.....	20
2.4	Sociální imunita	20
2.5	Patogeny včely medonosné.....	22
2.5.1	Virózy	22

2.5.2	Bakteriální nemoci	23
2.5.3	Houby napadající včelu medonosnou	23
2.5.4	Roztoči parazitující na včele medonosné	24
3	Experimentální Část.....	25
3.1	Chemikálie	25
3.2	Biologický materiál.....	26
3.3	Použité roztoky a pufrы	26
3.4	Přístroje	26
3.5	Software	27
3.6	Metody	27
3.6.1	Příprava vzorku.....	27
3.6.2	Bradfordova metoda.....	27
3.6.3	ELISA	28
3.6.4	LC-MS	29
4	Výsledky a diskuze	30
4.1	Stanovení koncentrace celkových proteinů v extraktu z plodu.....	30
4.2	Detekce AmP pomocí metody ELISA	31
4.3	Detekce a kvantifikace apidaecinu 1 ve včelím plodu pomocí metody LC-MS	34
5	Závěr	46
6	Literatura.....	47
7	Seznam zkratk	53

Cíle práce

- Zpracování literární rešerše o imunitních reakcích hmyzu/včel
- Zpracování literární rešerše o vývoji imunity v různých kastách a vývojových stádiích včel
- Zpracování informací aktuální vědecké literatury o významu včelích antimikrobiálních peptidů
- Vypracování literární rešerše o metodách výzkumu antimikrobiálních peptidů (stanovení struktury, genové exprese, měření hladiny – ELISA, LCMS apod.)
- Optimalizace stanovení koncentrace antimikrobiálních peptidů v tkáních larev, kukel a dospělců včel pomocí imunochemických metod nebo LCMS techniky.

1 ÚVOD

Pro včelu medonosnou jako zástupce eusociálního hmyzu je imunita zásadní pro udržení zdraví celé kolonie. Jelikož v jedné kolonii žijí desetitisíce jedinců, je pro případný patogen velmi jednoduché se rozšířit. Aby k tomu nedocházelo, vyvinul se u včely medonosné efektivní imunitní systém sestávající z několika úrovní. Mezi tyto úrovně patří úroveň fyzikální, kam spadá kutikula a peritrofická membrána, buněčná imunita, kterou zprostředkovávají hemocyty a humorální imunita skládající se převážně z komponent melanizační kaskády a antimikrobiálních peptidů.

Antimikrobiální peptidy jsou malé molekuly proteinového charakteru produkované velkou škálou organismů. U hmyzu však tvoří podstatnou část imunitní odpovědi, proto jsou v posledních desetiletích cílem mnoha výzkumů. U včely medonosné byly detekovány čtyři druhy antimikrobiálních peptidů: defensiny, apidaeciny, hymenoptaecin a abaecin. Tyto antimikrobiální peptidy jsou schopny cílit bakteriální buňky bez akutní toxicity pro buňky hostitele, což z nich činí zajímavou alternativu dnešních antibiotik, na která si jsou bakterie schopny vytvořit rezistenci.

Výzkum antimikrobiálních peptidů zároveň napomáhá porozumět imunitním reakcím včel. V posledních letech jsou pozorovány trendy úhynů včelstev, přičemž včelstva, která nejsou kontrolována a léčena, prakticky nemají šanci přežít (Highfield et al., 2009; Higes et al., 2009). Jelikož jsou včely ekonomicky i ekologicky významným hmyzem, je potřeba vyřešit otázku jejich zdraví.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

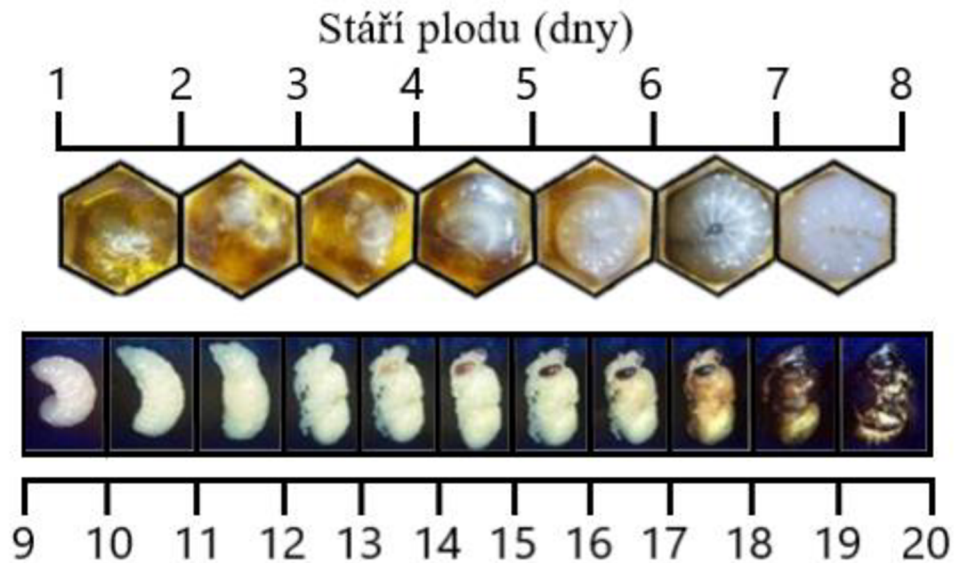
2.1 Včela medonosná

Včela medonosná patří do třídy hmyz, řádu blanokřídlý. Jedná se o sociální hmyz žijící v koloniích čítajících desetitisíce jedinců. Pro pochopení imunity včely medonosné je třeba znát její životní cyklus, dělbu práce v úle a rozdělení jedinců do kast. V každé kolonii můžeme mezi jednotlivci pozorovat anatomické i fyziologické rozdíly. Včely jsou v úlu rozděleny do tzv. kast, a to dle jejich fyziologie, ale také genetické výbavy. Kolonie sestává z dělnic, trubců a matky, ale většinu času je také přítomen plod, jako který označujeme vajíčka, larvy a kukly (Veselý, 2003).

Matka je v kolonii pouze jedna, výjimkou je období rojená, kdy se v úlu vyskytuje více mladých královen. Pokud se v kolonii za normálních podmínek vyskytuje více matek, jedná se o patologický jev, který může končit až kolapsem včelstva. Matka je zásadní součástí úlu, stará se o produkci nových jedinců a tvorbu feromonů tvořících identitu včelstva.

Dělnice jsou diploidní samičky zastávající veškeré pracovní úlohy ve včelstvu. Úloha, kterou dělnice ve včelstvu plní je závislá na jejím věku. Mladší dělnice tráví většinu času v úlu a starají se především o plod a úl, zatímco starší včely především sbírají suroviny mimo úl. Poslední kastou jsou trubci. Jedná se o haploidní samce, jejichž hlavním úkolem je opustit úl a spářit se s cizí mladou matkou (Veselý, 2003).

Larvy se líhnou z vajíček kladených matkou během tří dnů. Po vylíhnutí prochází larva pěti vývojovými stádii vymezenými jejím svlékáním. Jejich vývoj je řízen především stravou, která je jim poskytována dělnicemi. Larvy matek jsou například krmeny téměř výhradně mateří kašičkou, produktem hltanových žláz dělnic, přičemž larvy dělnic jsou krmeny především směsí pylu a medu, zatímco mateří kašička tvoří menší část jejich potravy především v raných fázích vývoje. Po dokončení vývoje larvy dochází k jejímu zakuklení. Buňka kukly je následně zavíčkovaná dělnicemi. Doba, po kterou probíhá vývoj v dospělce, je závislá na kastě. Nejkratší vývoj, dlouhý šestnáct dní, mají matky, dělnice se vyvíjejí dvacet jedna dní a trubci čtyřicet dní (Obr. 1). Po ukončení přeměny dojde ke svlečení kukly a dospělá včela kusadly odstraňuje víčko a vylézá z buňky (Veselý, 2003).



Obrázek 1: Schéma vývoje plodu dělnice od nakladení vajíčka. Od devátého dne se jedná o zavíčkovaný plod. Upraveno dle Human et al., 2015.

Kvůli blízkosti jednotlivců v úlu jsou jedinci obzvláště zranitelní vůči infekci patogenem. Právě eusociální způsob života včel umožnil některým parazitům vyvinout se tak, aby byli schopni podmínek ve včelstvu využít. Včelí úl tvoří ideální podmínky pro množení a vývoj těchto organismů, a proto musí mít včela efektivní imunitní systém schopný veškeré hrozby potlačit dříve, než dojde k napadení celé kolonie (Kurze et al., 2016).

2.2 Imunita hmyzu a včely medonosné

Hmyz je rozsáhlá, evolučně úspěšná třída živočichů. Jejich imunitní odpověď stojí především na vrozené imunitě (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Pro mapování hmyzí imunity je z důvodu její různorodosti výhodné použití modelového organismu. Jako příklad modelového organismu lze uvést zástupce řádu dvoukřídlých *Drosophila melanogaster*, studovanou hlavně díky jejímu jednoduchému chovu a krátkému životnímu cyklu, nebo druhy hmyzu významné pro člověka, jako jsou například komáři rodu *Anopheles* a *Aedes*, kteří slouží jako vektory pro lidské patogeny (Pan et al., 2012).

Patogen s cílem infikovat hmyzího jedince musí překonat několik úrovní obrany. Konečným cílem patogenu je úspěšně se rozmnožit. Aby k tomu nedošlo, hmyz vyvinul množství imunitních reakcí, které se snaží patogen co nejdříve zneškodnit (Lemaitre & Hoffmann, 2007). U hmyzu dělíme imunitu do tří hlavních úrovní: fyzikální bariéry,

buněčnou imunitu a humorální imunitu (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Kombinace těchto imunitních reakcí zajišťuje odolnost hmyzu vůči širokému spektru patogenů.

Včela medonosná disponuje všemi obranými prostředky, které nacházíme u modelových organismů i přesto, že její genom obsahuje méně genů s imunitní funkcí (Evans et al., 2006; The Honey Bee Genome Sequencing Consortium, 2006). Její imunita ovšem není tak dobře prozkoumána, jako u již zmíněných modelových organismů, proto se k popisu některých jejích imunitních mechanismů používá přirovnání, velmi často k octomilce (*Drosophila melanogaster*) (Evans et al., 2006).

2.2.1 Fyzikální bariéry

První obranou linií hmyzího organismu jsou fyzikální bariéry oddělující jej od vnějšího prostředí. U hmyzu ji tvoří chitinová kutikula pokrývající povrch těla a peritrofitická membrána, která tvoří výstelku žaludku (Lehane, 1997).

Kutikula je tvořena převážně krystalickou formou chitinu, dále pak proteiny, fenolickými látkami, vodou a v malé míře lipidy (Vincent & Wegst, 2004). Poměr těchto stavebních složek následně dává kutikule kýžené vlastnosti v závislosti na její lokalizaci. Hlavní funkcí kutikuly je mechanická opora hmyzího těla, ochrana proti vodě a z hlediska imunity tvorba mechanické bariéry neprostupné pro patogeny (Vincent & Wegst, 2004).

Uvnitř těla zajišťuje mechanickou fyzickou ochranu peritrofitická membrána. Jedná se o vrstvu chitinu, proteinů, glykoproteinů a proteoglykanů (Lehane, 1997). Vyvábí jakýsi rukáv lemující stěnu trávicí soustavy a brání tak epitel před útoky patogenů, mechanickým poškozením, toxiny, nebo jinými chemickými látkami (Lehane, 1997). U hmyzu můžeme pozorovat dva druhy peritrofitické membrány. První typ je produkován buňkami celého žaludku a jeho produkce je buď kontinuální, nebo stimulována příjmem potravy. Druhý typ je produkován specializovanými buňkami v přední části žaludku a je vždy produkován kontinuálně jako nerušený vak (Lehane, 1997).

Epitely, na kterých dochází k látkové výměně, velmi často nemohou být chráněny fyzickými bariérami. Jedná se především o epitel trachejí a trávicí soustavy, ale může jít i o obranu epidermis, nebo rozmnožovací soustavy (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Žaludek hmyzu sice je chráněn peritrofitickou matrix, ta však může být poškozena, nebo ji mohou patogeny cíleně narušovat (Lehane, 1997). Tyto epitely jsou proto chráněny expresí komponent humorální imunity, trávicích enzymů, nebo reaktivních

látek s krátkou životností (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Může se jednat o expresi konstantní, nebo indukovanou, přičemž indukovaná exprese je spuštěna kontaktem s patogenem a řízena signálními drahami.

2.2.2 Buněčná imunita

Velmi významnou součástí imunity je také buněčná imunita. U hmyzu zprostředkovávají buněčnou imunitu krevní buňky plující volně v hemolymfě, tzv. hemocyty (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Hemocyty lze dělit na několik skupin, ovšem v závislosti na druhu se mohou lišit v morfologii, v biochemických, nebo v histologických vlastnostech (Strand, 2008).

Nejčastěji dělíme hemocyty dle funkce na buňky obstarávající fagocytózu, buňky zajišťující enkapsulaci a neutralizaci větších těles a na buňky produkující enzymy a chemické látky podílející se na imunitních reakcích (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Všechny tyto buňky vznikají diferenciací z progenitorových buněk, tzv. prohemocytů (Strand, 2008). Tyto progenitorové buňky následně dle potřeby diferencují. Prohemocyty vznikají v hematopoetických žlázách během larválního stádia a stádia kukly, zatímco u dospělých včel vznikají nové hemocyty pouze mitózou (Hystad et al., 2017). V hemolymfě se hemocyty pohybují v neaktivní formě, až při kontaktu s patogenem dochází k jejich aktivaci a adhezi k cizímu tělesu (Nardi et al., 2006).

Přestože rozdělení hemocytů není vždy úplně jednoznačné, rozlišuje se u včely medonosné šest typů buněk, a to fagocytující granulární buňky, plasmatocyty, oenocytoidy, koagulocyty, dvoujaderné buňky, permeabilizované buňky. Toto rozdělení ovšem není tak závislé na jejich funkci, jako na typických znacích, případně způsobech značení, díky kterým je možné je pozorovat pod mikroskopem (Marringa et al., 2014; Gábor et al., 2017).

2.2.2.1 Fagocytující hemocyty

Mezi profesionální fagocyty můžeme zařadit například plasmatocyty (Lemaitre & Hoffmann, 2007) a granulocyty (Strand, 2008), ovšem plasmatocyty jsou někdy řazeny ne mezi fagocytující buňky, ale mezi buňky podílející se na enkapsulaci. Tyto neshody jsou způsobeny především nejednotnou nomenklaturou hmyzích hemocytů, přičemž dochází k rozdělení na hemocyty popsané u *Drosophila*, kde jsou plasmatocyty označovány jako fagocytující buňky, a hemocyty značené u jiných druhů hmyzu,

kdy se můžeme setkat s označením plasmatocyty právě pro enkapsulující buňky (Richardson et al., 2018).

U včely medonosné se tedy častěji setkáme s označením granulocyty. Ty tvoří většinu hemocytů v hemolymfě a primárně zprostředkovávají fagocytózu odumřelých buněk a jednobuněčných parazitických organismů. Jedná se prakticky o jednu z prvních imunitních reakcí při styku organismu s patogenem. Samotná fagocytóza probíhá v několika krocích. Nejprve dojde ke kontaktu hemocytu s cizím tělesem, jeho rozpoznání, následně dochází k tvorbě parapodií, totiž výčnělků cytoplasmatické membrány. Ta obklopuje cizí objekt a dochází k samotné fagocytóze (Gillespie and et al., 1997).

2.2.2.2 Hemocyty zprostředkovávající enkapsulaci

Poslední skupinou hemocytů jsou hemocyty podílející se na enkapsulaci. Nevyskytují se u zdravých larev, které se vyvíjely ve sterilních podmínkách, k jejich vzniku dochází až při napadení. Při napadení hmyzího organismu dochází k diferenciaci prohemocytů na tyto buňky. Tato diferenciace je spuštěna signálními látkami, které produkují plasmatocyty při kontaktu s tělesem, které není možno fagocytovat. Enkapsulujícími buňkami u včely medonosné jsou granulocyty a plasmatocyty (Negri et al., 2015). Při enkapsulaci se na povrchu objektu lokalizovaném granulocyty začnou shlukovat plasmatocyty, a za pomoci melanizace cizí těleso oddělí od prostředí a v případě živého organismu jej usmrtí, velmi pravděpodobně produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) nebo intermediátů melanizační kaskády (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Pro rozpoznání a adhezi hemocytů na cizí těleso jsou důležité některé proteiny komplementu, na které následně hemocyty reagují a dochází k jejich shlukování (Levin et al., 2005; Strand, 2008). Enkapsulaci často předchází nodulace, při které dochází ke shlukování hemocytů a cizích mikroorganismů. Mikroorganismy jsou tak eliminovány a celá nodula může být následně enkapsulována (Gillespie and et al., 1997).

2.2.2.3 Hemocyty produkující komponenty humorální imunity

Zbytek hemocytů u hmyzu tvoří buňky, které neinteragují s patogeny přímo, ale produkují látky a enzymy účastnící se dějů humorální imunity. K těmto dějům patří především spuštění melanizační kaskády. Produkují profenoloxidasu (proPO) a jiné komponenty melanizační kaskády, skladují je a po podráždění je vypouští do hemolymfy, kde dochází k jejich přeměně na aktivní formy enzymů (Lemaitre &

Hoffmann, 2007). Do této skupiny hemocytů patří u včely medonosné oenocytoidy, které jsou pozorovatelné také u jiných druhů hmyzu (Negri et al., 2015). Tyto hemocyty reagují na kontakt s patogenem prasknutím, při kterém dochází k vypuštění PPO, která je v hemolymfě aktivována (Shrestha & Kim, 2008).

2.2.3 Humorální imunita

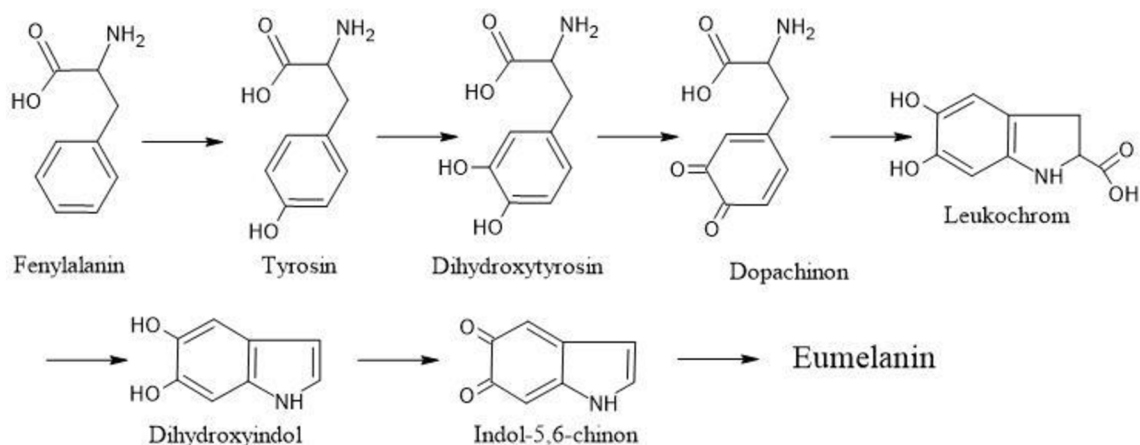
Jako humorální imunitu označujeme děje, při kterých dochází k produkci dílčích molekul eliminujících patogeny. K její indukci dochází převážně při průniku patogenu do těla jedince. U hmyzu do humorální imunity řadíme produkci antimikrobiálních peptidů, lysozymu a komponent melanizační kaskády (Stanley et al., 2009).

2.2.3.1 Melanizační kaskáda

Melanizační kaskáda zajišťuje tzv. melanizaci, která zahrnuje produkci monomerů melaninu a jejich polymerizaci. Polymery se následně vážou na membrány patogenních organismů a znemožňují jim vstup do buněk organismu, výměnu látek přes membránu, nebo přímo způsobují jejich smrt. (Nakhleh et al., 2017).

Tato kaskáda je napojena na signální dráhu Toll. Na konci kaskády dochází k aktivaci zymogenu proPO za vzniku enzymaticky aktivní fenoloxidasy (PO), která oxiduje tyrosin za vzniku dihydroxytyrosinu, který je tímto enzymem opět oxidován za vzniku dopachinonu (Obr. 2). Dochází k jeho spontánní cyklizaci a tento produkt je následně enzymaticky dekarboxylován za vzniku dihydroxyindolu. Ten je opět oxidován fenoloxidasou a produkované indolové chinony polymerizují za vzniku eumelaninu, jedné z forem melaninu (viz Obrázek č.1) (Nakhleh et al., 2017; Nappi & Vass, 1993).

Melanin následně tvoří vrstvu na povrchu patogenu a znemožňuje mu normální funkci. Samotné reakční intermediáty jsou velmi často poměrně reaktivní a mohou mít již samy o sobě toxické účinky na cílený organismus (Nappi & Christensen, 2005). Proces melanizace je významný jak v imunitní reakci, tak v reakci na poranění kutikuly hmyzu, kdy polymerizace melaninu přispívá ke sklerotizaci zacelené rány (Lemaitre & Hoffmann, 2007).



Obr. 2: Schéma vzniku eumelaninu během melanizační kaskády. Upraveno dle Nappi & Christensen, 2005 a Nappi & Vass, 1993

2.2.3.2 Lysozomy

Lysozomy jsou enzymy se schopností štěpit buněčnou stěnu bakterií. Jejich enzymová aktivita spočívá ve štěpení glykosidické vazby mezi N-acetylglukosaminem a kyselinou N-acetylmuramovou. Jejich produkce je v hemolymfě a žaludku konstantní, při kontaktu organismu s patogenem dochází k zvýšení jejich produkce (Huang et al., 2021). V žaludku hmyzu mohou také velmi často plnit funkci trávicích enzymů a tím zpřístupňovat možnost konzumace bakterií jako zdroje potravy (Huang et al., 2021).

2.2.3.3 Antimikrobiální peptidy

Antimikrobiální peptidy (AmP) jsou krátké peptidy o velikosti v řádu desítek aminokyselin. Tyto peptidy jsou především bazické a jejich antimikrobiální aktivita spočívá převážně v interakci s membránou cizí buňky, nebo v průchodu membránou a interakci s vitálními proteiny (Otvos, 2000). Při interakci s membránou tvoří AmP póry, které znemožňují buňce regulovat její vnitřní prostředí a díky tomu dochází k její smrti. Membránou prochází například apidaecin, který patří mezi tzv. proline rich peptides (PRPs), neboli peptidy bohaté na prolin. Po průchodu membránou se váže na skládací proteiny a zamezuje dalšímu dělení bakterie (Li et al., 2006). AmP cílí pouze prokaryotické buňky a houby, díky čemuž se jedná o předmět výzkumu nových léčiv schopných nahradit antibiotika, která u bakterií postupně způsobují rezistenci. Tato selektivita AmP je umožněna nižším membránovým potenciálem u prokaryotických buněk (Wimley & Hristova, 2011).

Produkcí AmP zajišťuje především tukové těleso, což je orgán zajišťující velké množství metabolických dějů, jde o jakýsi ekvivalent jater vyšších živočichů. Ovšem k produkci AmP dochází také v rámci již zmíněné epiteliální imunity, a to právě přímo v buňkách epitelu, nebo hemocyty (Lemaitre & Hoffmann, 2007).

2.2.4 Antimikrobiální peptidy včely medonosné

Jak již bylo zmíněno, AmP plní důležitou úlohu v humorální imunitní reakci včel, především pak dospělých jedinců. U včel bylo zatím detekováno několik AmP, spadajících do čtyř rodin. Jedná se o defensiny, apidaeciny, abaecin a hymenoptaecin (Daníhlík et al., 2016). Všechny tyto AmP cílí na bakterie, případně houby napadající včelí organismus. K AmP včely jsou také přiřazovány peptidy tvořící složky včelího jedu, nebo jiných včelích produktů, které ale nejsou detekovatelné v hemolymfě. U včelího jedu se jedná především o melittin a apamin, zatímco v mateří kašičce byla detekována rodina peptidů nazvaných jelleiny (Daníhlík et al., 2016).

2.2.4.1 Defensiny

Defensiny jsou AmP bohaté na cystein specifické disulfidickými vazbami. Včela medonosná produkuje dvě isoformy defensin 1 a defensin 2. Přesto, že spadají do stejné skupiny, jsou z hlediska aminokyselinového složení homologní pouze z 55,8 % (Ilyasov et al., 2013).

Defensin 1 má tři isoformy, jedna je specifická pro hemolymfu a zbylé dvě byly detekovány v mateří kašičce. Defensiny nacházející se v mateří kašičce jsou také někdy nazývány royalasiny, podle anglického výrazu pro mateří kašičku, royal jelly (Fujiwara et al., 1990). Tyto dvě isoformy se od defensinu v hemolymfě liší složením ve dvou aminokyselinách. Sekvence všech isoform defensinu 1 sestává z 51 aminokyselin a je kódována jedním společným genem nazvaným *defensin 1*. Oproti tomu defensin 2 kódovaný svým vlastním genem *defensin 2* je tvořen 43 aminokyselinovými zbytky. Jedná se o cyklické peptidy propojené třemi disulfidickými můstky. Jsou produkovány ve formě inaktivních prepeptidů, jejichž úpravou dojde k jejich aktivaci (Ilyasov et al., 2013).

Zatímco v hrudích včel byla detekována mRNA kódující defensin 1 i defensin 2, v hltanových a kusadlových žlázách byla detekována pouze mRNA kódující defensin 1, což poukazuje na tkáňovou specifitu jeho exprese. Tento fakt zároveň koreluje s detekcí royalisinů v mateří kašičce. (Ilyasov et al., 2013).

Defensiny projevují antimikrobiální aktivitu především vůči Gram-pozitivním bakteriím, vykazují ovšem také aktivitu vůči některým Gram-negativním bakteriím (Casteels-Josson et al., 1994). Mechanismem, kterým defensiny usmrcují bakterie, je včlenění do cytoplasmatické membrány patogenu a vytvoření pórů. Kvůli tomu dochází k úniku cytoplasmatických draselných iontů a inhibice dějů vitálních pro život bakterie (Ilyasov et al., 2013). Ke spuštění syntézy defensinů nedochází tak rychle po infekci, jako u jiných AmP, ovšem jejich zvýšená hladina je pozorovatelná až po dvou týdnech od prvního kontaktu s patogenem (Ilyasov et al., 2013).

2.2.4.2 Apidaeciny

Apidaeciny jsou malé, lineární, kladně nabitě AmP. Jejich sekvence obsahuje 18 aminokyselinových zbytků, z toho tvoří poměrně velkou část aminokyselina prolin. Právě díky tomu jsou apidaeciny řazeny mezi tzv. proline-rich peptides (PRP), neboli peptidy bohaté na prolin, kam patří také abaecin (Daníhlík et al., 2016; Zhou et al., 2008). V hemolymfě včely medonosné byly detekovány tři isoformy apidaecinu: apidaecin 1a, apidaecin 1b a apidaecin 2. Tyto formy apidaecinu jsou často kódovány jedním genem jako jeden společný prekurzor, jehož štěpením vznikají jednotlivé peptidy. Rozdíly mezi jednotlivými formami tvoří převážně aminokyselinové složení N-konce peptidů, zatímco C-konec je vysoce konzervovaný (Daníhlík et al., 2016).

Apidaecin a jiné PRP vykazují antimikrobiální aktivitu převážně vůči Gram-negativním bakteriím. Na rozdíl od jiných AmP netvoří PRP póry v cytoplasmatické membráně bakterie, ale prochází do cytoplasmy organismu. Zde nespecificky interagují s komplexy zajišťujícími skládání proteinů, jako je DnaK chaperon, nebo součást chaperoninového komplexu GroEL (Kragol et al., 2001). Tato interakce koreluje s antimikrobiální aktivitou peptidu, pokud byla struktura peptidu pozměněna tak, že nedocházelo k interakci s proteinovými komplexy, nebyla zároveň pozorována antimikrobiální aktivita. Tyto peptidy mají spíše cytostatický účinek, jejich působení bakterii neusmrcuje, ale spíše znemožňuje její růst (Kragol et al., 2001).

2.2.4.3 Hymenoptaecin

Hymenoptaecin je největším AmP detekovaným v hemolymfě včely medonosné. Jedná se o lineární peptid tvořený sekvencí 93 aminokyselin. Jako většina AmP je kladně nabitý a jeho specifikem je to, že je bohatý na glycin. Jeho N-konec tvoří helikální strukturu a C-konec bohatý na glycin je zodpovědný za jeho antimikrobiální aktivitu

(Gao & Zhu, 2010). Oproti defensinu neobsahuje žádné disulfidické můstky. Projevuje antimikrobiální aktivitu proti Gram-pozitivním i Gram-negativním bakteriím (Casteels et al., 1993). Tento peptid je součástí rychlé imunitní odpovědi a jeho koncentrace v hemolymfě stoupá brzy po infekci. Jedná se o AmP interagující s cytoplasmatickou membránou bakterií, který tvoří póry a tím usmrcuje patogenní buňky (Daníhlík et al., 2016).

2.2.4.4 Abaecin

Abaecin je druhým AmP produkovaným včelou medonosnou ze skupiny PRP. Skládá se ze 34 aminokyselin, z nichž 10 činí aminokyselina prolin (Casteels et al., 1990). Včela medonosná produkuje pouze jednu isoformu tohoto peptidu, a to abaecin 1. U včely východní byla detekována druhá isoforma tohoto AmP, abaecin 2. Abaecin 1 je při infekci produkován mladými larvami, pravděpodobně tedy hraje důležitou roli v jejich imunitních reakcích (Evans, 2004). Abaecin svým účinkem cílí Gram-pozitivní bakterie, ovšem mechanismus jeho účinku se liší od druhého PRP apidaecinu.

U čmeláků neprojevuje abaecin ani v poměrně vysokých koncentracích aktivitu proti Gram-negativním bakteriím, ovšem i jeho nízké koncentrace posilovaly inhibiční účinek hymenoptaecinu. Tento fakt poukazuje na možné synergistické účinky AmP (Rahnamaeian et al., 2016). Je nutno podotknout, že mezi abaecinem produkovaným čmeláky a včelami jsou chemické rozdíly, abaecin produkovaný čmeláky je O-glykosylovaný. (Daníhlík et al., 2016).

2.2.4.5 Melittin a jiné peptidy včelího jedu

Mellitin je nejvýznamnější složkou včelího jedu. Sám tvoří 40–60 % sušiny. Stejně jako u ostatních AmP se jedná o malý, záporně nabitý peptid (Daníhlík et al., 2016). Jeho sekvence sestává z 26 aminokyselin tvořící dvě alfa-šroubovice propojené dvěma aminokyselinovými zbytky. Jeho hlavní funkcí je interakce s cytoplasmatickou membránou a tvorba pórů (Memariani et al., 2019). Je produkován jako neaktivní tetramer a až při jeho vypuštění do cílového organismu dochází k disociaci na jednotlivé monomery (Picoli et al., 2017).

Dalšími dvěma významnými peptidy obsaženými ve včelím jedu je apamin a MCD (mast cell degranulating) peptid. Apamin je malý peptid složený z 18 aminokyselin s neurotoxickými účinky. Váže se na sodné a vápenaté kanály a blokuje inhibiční signály nervové soustavy (Lima & Brochetto-Braga, 2003). MCD peptid je chemicky

podobný apaminu. Je tvořen 22 aminokyselinovými zbytky a je bohatý na alfa-šroubovice. Jeho účinkem dochází k uvolňování histaminu z žírných buněk (Lima & Brochetto-Braga, 2003).

2.2.4.6 Jelleiny

Jelleiny jsou malé AmP obsažené v mateří kašičce. Skládají se z 8-9 aminokyselin, mají kladný náboj a jejich C-konec je amidován. Byly objeveny čtyři jelleiny, pojmenované jellein I-IV (Romanelli et al., 2011). Jejich antimikrobiální aktivita je poměrně široká. Jelleiny I-III jsou aktivní proti Gram-pozitivním bakteriím, Gram-negativním bakteriím a kvasinkám, ovšem AmP podílející se na imunitě včely projevují antimikrobiální aktivitu již při nižších koncentracích. Jellein IV naopak žádnou antimikrobiální aktivitu neprojevuje (Fontana et al., 2004).

2.2.5 Metody výzkumu antimikrobiálních peptidů

Na začátku výzkumu antimikrobiálních peptidů stojí jejich detekce a charakteristika. Na základě těchto dat lze následně AmP dále přesněji detekovat a kvantifikovat. Jelikož je jejich exprese regulována na úrovni transkripce, velmi často se také pracuje s mRNA, či DNA (Casteels et al., 1993).

2.2.5.1 Původní metody detekce a charakterizace AmP

Antimikrobiální peptidy včely medonosné byly poprvé detekovány při hledání složek včelích produktů a hemolymfy, které způsobovaly jejich antimikrobiální vlastnosti. Tato antimikrobiální aktivita je měřena difusním testem, při kterém se na agarovou plotnu s rovnoměrně aplikovanou bakteriální suspenzí aplikují látky, jejichž účinky na daný bakteriální kmen chceme pozorovat. Tohoto postupu bylo využito například při objevu royalisinu, kdy byla měřena antimikrobiální aktivita jednotlivých frakcí získaných z gelové permeační chromatografie proteinů izolovaných z mateří kašičky (Fujiwara et al., 1990).

Právě také chromatografické metody hrají velkou roli při detekci AmP. Při správném zvolení techniky lze separovat a izolovat jednotlivé AmP. Nejčastěji je používáno vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). V kombinaci s použitím hydrofobní stacionární fáze byla tato metoda použita při detekci a popisu většiny včelích AmP (Fujiwara et al., 1990; Casteels et al., 1993; Casteels et al., 1990).

Po identifikaci peptidu s antimikrobiálními vlastnostmi je potřeba detailnější analýzy, tj. aminokyselinová sekvence, sekundární struktury peptidu, či obsah disulfidických můstků. Sekvence byla v případě royalisinu, abaecinu a hymenoptaecinu určena Edmanovým odbouráním. Při tomto postupu se nejprve kompletně hydrolyzuje analyzovaný protein a jednotlivé aminokyseliny reagují s Edmanovým činidlem, fenylisothiokyanátem. Deriváty aminokyselin jsou následně rozdělovány HPLC na reverzní fázi a spektrofotometricky detekovány v blízké UV oblasti (Heinrikson & Meredith, 1984). Pro stanovení molekulové hmotnosti AmP bylo používáno gelové elektroforézy v polyakrylamidovém gelu za redukujících podmínek (Casteels et al., 1993).

2.2.5.2 Moderní techniky detekce a kvantifikace

Při výzkumu AmP se dnes používá především hmotnostní spektroskopie (MS), metod ELISA a technik studujících jejich genové exprese, jako je polymerasová řetězová reakce (PCR). Velmi důležitou součástí detekce AmP je také příprava vzorku, která zahrnuje separaci, extrakci a izolaci AmP. Metody přípravy vzorku se liší podle materiálu, který je použit pro izolaci a analýzu AmP.

Pro přesnou analýzu je důležitá příprava vzorku. Většinou se setkáváme se dvěma typy materiálu, a to hemolymfou, nebo určitou částí těla hmyzu, případně mohou být analyzovány včelí produkty (Daníhlík et al., 2014; Bíliková & Šimúth, 2010). Větších molekul a částic se zbavuje centrifugací o velkém přetížení. Po ukončení centrifugace jsou AmP obsaženy v supernatantu, který je následně podroben dalším procesům.

AmP je možno izolovat kyselou extrakcí a následným zahřátím vzorku, jelikož jsou jako krátké peptidy s mnohonásobným kladným nábojem v kyselém roztoku stabilní i za poměrně extrémních podmínek (Casteels et al., 1989). Pro získání čisté směsi proteinů a peptidů může být pro oddělení precipitátu vzorek lyofilizován a rozpuštěný lyofilizát následně odsolen pomocí adsorpční chromatografie, nebo dále separován pomocí HPLC (Daníhlík et al., 2014).

Moderní metody analýzy AmP jsou HPLC, gelové elektroforéza, MS a cirkulární dichroismus. Genová exprese AmP sledována pomocí kvantitativní PCR. Ta umožňuje sledovat odpověď organismu na stimulaci imunitního systému, ovšem množství mRNA nemusí být v přímé závislosti na následném množství produkováných AmP (Daníhlík et al., 2016). Pro charakterizaci AmP se dnes používá vícerozměrná elektroforéza a MS,

většinou spojena s HPLC. Elektroforéza umožňuje určit molekulovou hmotnost peptidu a jeho základní chemické charakteristiky, zatímco MS umožňuje po fragmentaci peptidu přečtení jeho aminokyselinové sekvence (Fontana et al., 2004; Albert et al., 2011). MS také umožňuje kvantifikaci AmP v různých typech vzorku, jako jsou například hemolymfa, či celé tělní části (Daníhlík et al., 2014). Alternativou MS pro kvantifikaci může být také ELISA (Bíliková & Šimúth, 2010).

Pro studium genů kódujících AmP, případně pro jejich rekombinantní produkci a následný výzkum je izolována DNA nebo RNA a je převedena na cDNA (komplementární DNA) pomocí PCR. Tato cDNA může být následně analyzována a porovnávána s databázemi, nebo upravena a vložena do vhodných mikroorganismů (Jin et al., 2012). Takto je možno produkovat čisté AmP pro jejich následné studium. Pro studium imunitních drah regulujících produkci AmP může být využito RNA interference. Umlčením určitých genů můžeme pozorovat, jakou funkci mají (Kaneko et al., 2004)

2.2.6 Signální dráhy

Indukovaná exprese komponent humorální imunity je řízena několika cestami. Nejprozkoumanějšími z nich jsou signální dráhy Toll, Imd a JAK/STAT. Tyto dráhy jsou řízeny proteolytickými kaskádami, které iniciuje kontakt s buněčnou stěnou patogenu, kdy se proteiny rozpoznávající látky obsažené ve stěně mikroorganismu jeho vazbou aktivují a zahajují celou kaskádu končící nastartováním exprese proteinu s imunitní funkcí (Evans et al., 2006).

2.2.6.1 Spouštěče signálních drah

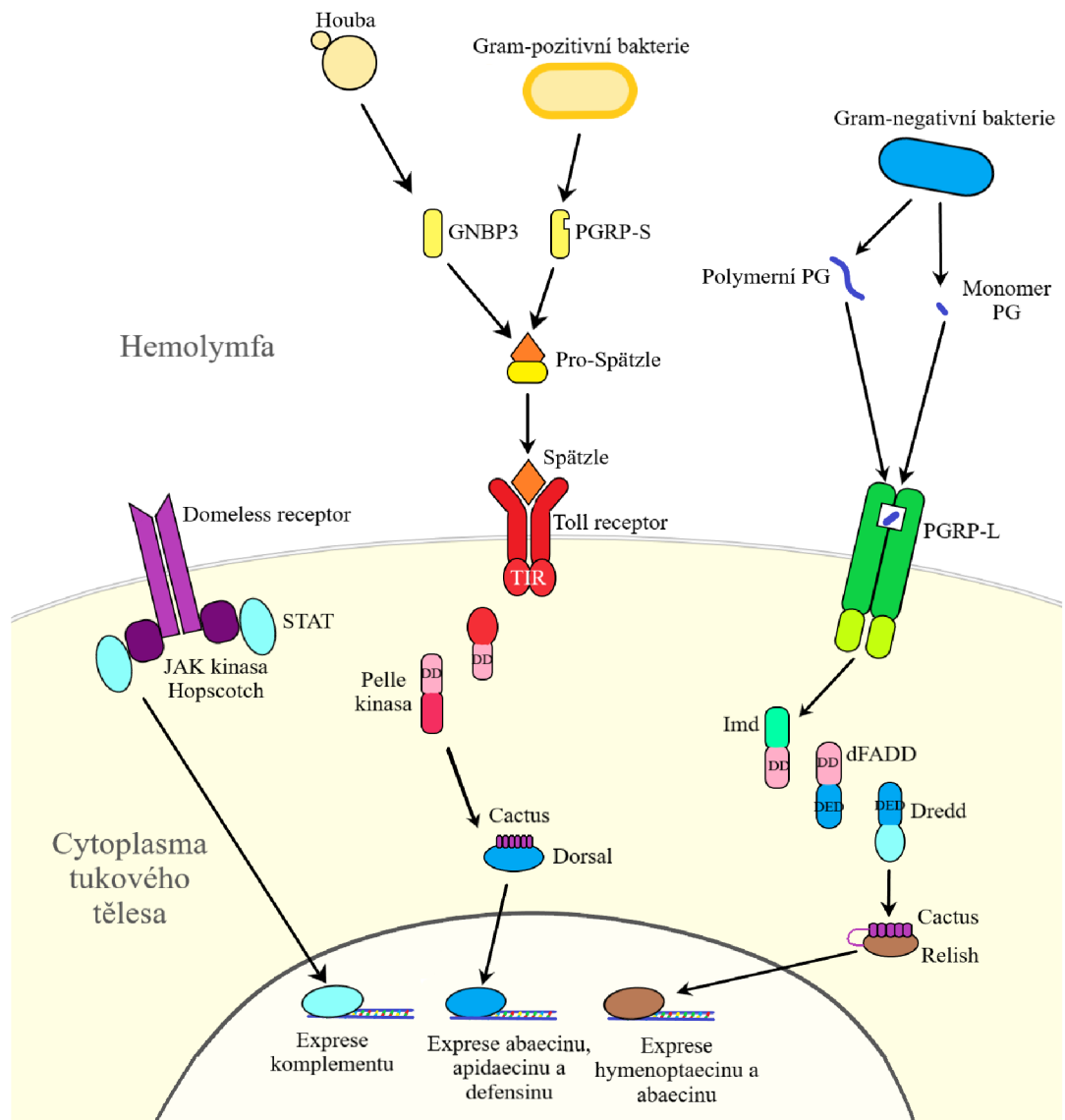
Na začátku signálních drah stojí proteiny, jejichž úkolem je rozpoznat molekuly specifické pro cizí organismus. Nejrozšířenější skupinou těchto proteinů jsou peptidoglykan rozpoznávající proteiny, zkracované jako PGRPs (z anglického peptidoglycan recognition proteins) (Dziarski, 2004). Tyto proteiny interagují s peptidoglykany (PG), což jsou polymery N-acetylglukosaminu a N-acetylmuramové kyseliny. Tyto řetězce jsou následně vertikálně propojeny krátkými peptidovými sekvencemi, jejichž složení závisí na typu bakterie (Dziarski, 2004). PGRPs rozdělujeme do dvou tříd: krátké PGRPs (PGRP-S), malé extracelulární proteiny iniciující signální dráhy v hemolymfě, a dlouhé PGRPs (PGRP-L), které jsou delší, často obsahují transmembránové membrány a jsou lokalizovány v membránách

a cytoplazmě buněk (Werner et al., 2000). V závislosti na typu PGRP dochází ke spuštění různých signálních cest, na jejichž konci stojí produkce látek, které usmrcují cizí organismus.

2.2.6.2 Toll signální dráha

Toll dráha je pojmenována podle jejího ústředního transmembránového receptoru. Jedná se o evolučně konzervovanou signální dráhu, velmi podobné proteiny můžeme pozorovat například u savců (Evans et al., 2006). Jedná se o signální dráhu úzce spjatou jak s imunitní reakcí, tak s vývojem jedince během ontogeneze, kdy hraje tato signální dráha klíčovou roli při rozlišování polohy na dorso-ventrální ose. To je důležité pro orientaci buněk v rámci celého organismu (Lemaitre & Hoffmann, 2007).

Tato dráha má několik klíčových komponent, při jejichž odstranění dochází ke snížení imunitní odpovědi. Patří sem cytokin Spätzle, již zmíněný transmembránový receptor Toll, Pelle kinasa, protein Cactus a aktivátory transkripce Dorsal a Dif. Při rozpoznání peptidoglykanu dojde ke spuštění kaskády a následnému vzniku cytokinu Spätzle rozštěpením proSpätzle. K těmto dějům dochází v hemolymfě. Spätzle následně interaguje s Toll receptorem, spřažené proteiny již v cytoplazmě aktivují Pelle kinasu s takzvanou death domain (DD), která degraduje protein Cactus tvořící komplex s aktivátory Dorsal a Dif. Tyto aktivátory se uvolní a mohou regulovat transkripci genů kódujících AmP (Obr. 3) (Belvin & Anderson, 1996). Toll signální dráha je aktivována především Gram-pozitivními bakteriemi a houbami, což je v souladu s produkcí antimikrobiálních peptidů, jejichž produkci tato cesta iniciuje, a které právě na tyto patogeny cílí (Daníhlík et al., 2016). U včely medonosné lze poukázat na určitá specifika této signální dráhy. Zatímco pro octomilku je typický transkripční faktor Dif, u včely a jiných zástupců hmyzu jeho roli zastává transkripční faktor Dorsal. Ten má stejnou funkci jako Dif, ale má rozdílnou strukturu a kóduje jej odlišný gen. Toll dráha u včely medonosné iniciuje produkci defensinů, apidaecinu, abaecinu a lysozymů (Evans et al., 2006).



Obr. 3: Schéma imunitních drah Toll, Imd a JAK/STAT u včely medonosné. Proteiny rozpoznávající cizí částice GNB3, PGRP-S a PGRP-L spouští vazbou ligandu jednotlivé kaskády končící uvolněním transkripčního faktoru, jeho přenosu do jádra a aktivace transkripce daných genů. Upraveno dle Lemaitre & Hoffmann, 2007 a Evans et al., 2006.

2.2.6.3 Imd signální dráha

Tato dráha je pojmenována podle mutace pojmenované immune deficiencí (*imd*), která způsobovala sníženou expresi genů kódujících některé antimikrobiální peptidy. Při potlačení exprese genů kódujících její komponenty byly pozorovány stejné vlastnosti jedince, jako u *imd* mutantů, odtud tedy pramení její pojmenování (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Na rozdíl od Toll signální dráhy neovlivňuje Imd dráha vývoj jedince, *imd* mutantní jedinci do kontaktu s patogenem prakticky neprojevují žádné

fenotypické rozdíly (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Tato signální dráha tedy slouží jen jako způsob indukce imunitní odpovědi ve formě produkce antimikrobiálních peptidů.

Imd dráha je aktivována rozpoznáním peptidoglykanu pomocí PRPG-L, celá následná kaskáda je tedy lokalizována v cytoplazmě buňky. Dochází k aktivaci kinasy a spuštění kaskády sestávající z proteinkinasy dFADD a Dredd, která končí uvolněním transkripčního faktoru Relish, jenž aktivuje transkripci širokého spektra antimikrobiálních peptidů (viz Obrázek č.2) (Evans et al., 2006).

K stimulaci této signální dráhy dochází při vazbě peptidoglykanů produkovaných Gram-negativními bakterií. U včely medonosné spouští expresi hymenoptaecinu a také abaecinu. Exprese těchto AmP je významně snížena, pokud dojde k umlčení genu kódujícího transkripční faktor Relish (Schlüns & Crozier, 2007). Snížení produkce abaecinu poukazuje na fakt, že exprese tohoto peptidu je řízena jak signální drahou Toll, tak Imd.

2.2.6.4 JAK/STAT signální dráha

Ve jménu této signální dráhy figurují dva její komponenty: Janus kinasa Hopscotch (JAK) a transkripční faktor STAT (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Při genetické supresi této signální dráhy nebylo pozorováno snížení exprese antimikrobiálních peptidů, došlo však ke zvýšení náchylnosti jedinců vůči virovým onemocněním (Lemaitre & Hoffmann, 2007). Tato dráha reaguje na cytokinům podobné proteiny, které vazbou na receptor zvaný Domeless spouští kaskádu. Tato dráha reguluje produkci imunitně aktivních proteinů a je předpokládáno, že hraje významnou roli při fagocytóze patogenů hemocyty (Evans et al., 2006).

2.3 Rozdíly v imunitních reakcích včel

Imunita jednotlivých včel v kolonii je závislá na stáří jedince, příslušnosti jedince ke kastě, nebo populaci. Je možno pozorovat různou intenzitu jednotlivých částí imunitní odpovědi jak mezi různými vývojovými stádii a kastami, tak i u jedinců různého stáří patřících ke stejné kastě (Schmid et al., 2008; Randolt et al., 2008).

2.3.1 Rozdíly mezi vývojovými stádii

Pokud hovoříme o vývojových stádiích včely medonosné, myslíme tím rozdělení na tři základní stádia: larva, kukla a dospělý jedinec. Každé z těchto stádií je vystaveno jiným podmínkám, lze tedy předpokládat rozdílné imunitní odpovědi. Sleduje se především aktivita buněčné imunity, produkce antimikrobiálních peptidů a produkce komponent melanizační kaskády.

Larvy jsou schopné obrany před patogeny, ovšem jejich imunitní odpověď není tak silná, jako u dospělých včel. Zároveň oproti dospělým včelám dochází k expresi užšího spektra proteinů a peptidů podílejících se na humorální imunitě. Při napadení bakteriemi dochází k produkci AmP, zatímco komponenty melanizační kaskády nejsou exprimovány v tak velké míře (Randolt et al., 2008). Jejich imunitní reakce je postavená především na buněčné imunitě, která je u dospělých včel upozaděna ve prospěch humorální imunity (Wilson-Rich et al., 2008).

Naopak ve fázi kukly ztrácí včela většinu schopnosti bránit se patogenům. Při napadení virem i bakterií dochází poměrně rychle k smrti jedince. Zároveň je u kulek možno jako u jediného stádia pozorovat zvýšení bakteriální aktivity v hemolymfě po napadení. Kukly jsou sice schopny produkovat složky humorální imunity, exprese je ale tak slabá a opožděná, že na již namnožený patogen nemá významný účinek (Gätschenberger et al., 2013).

Hemolymfa mladých dospělých včel vykazuje, stejně jako hemolymfa larev, antimikrobiální aktivitu, ovšem dochází k produkci více komponent imunity. Na rozdíl od larev lze v jejich hemolymfě pozorovat vznik nodul, které vznikají aktivitou hemocytů a melanizační kaskády (Gätschenberger et al., 2013; Tokura et al., 2014). Zároveň je možno pozorovat změnu charakteru hemocytů v hemolymfě. Po prodělání metamorfózy projevují hemocyty jedince rozdílnou morfologii a vzorce chování (Negri et al., 2015). U dospělých včel hraje primární roli humorální imunita, zatímco s věkem dochází ke snížení počtu hemocytů v hemolymfě (Schmid et al., 2008).

2.3.2 Rozdíly mezi včelami různého stáří

U imunitních reakcí včel hraje roli také její stáří. Včely v závislosti na stáří v úlu vykonávají různé funkce, tím pádem jsou i vystavovány různým prostředím. Mladé včely se především starají o plod a úl, zatímco starší včely mají za úkol především sběr surovin mimo kolonii (Bull et al., 2012).

Mladé včely vykazují silnější imunitní reakci, ovšem i přes to jsou náchylnější k infekci než starší včely. Při infekci u nich dochází k expresi mnohem širšího spektra komponent imunity. Ty však při obraně organismu nejsou tak efektivní, jako selektivní imunitní reakce starých včel. U nich dochází k expresi pouze několika specifických AmP a komponent melanizační kaskády, které jsou schopné poměrně efektivně eliminovat patogen (Bull et al., 2012). Zde může hrát roli tzv. imunitní priming, kdy jsou včely schopné efektivněji eliminovat patogen, se kterým se již dříve v subletální dávce setkaly (Burciaga et al., 2023).

S věkem u včel dochází ke zvyšování fenoloxidasové aktivity, zatímco počet hemocytů v lymfě se postupně snižuje, což se projevuje jako snížené množství nodul v hemolymfě včely po infekci. Zvýšení aktivity fenoloxidas na úkor buněčné imunity je připisováno nižší energetické náročnosti melanizační kaskády oproti udržování aktivních hemocytů připravených bránit tělo před patogenem. Zároveň je melanizační kaskáda jednou z nejdůležitějších součástí hmyzí imunity, tudíž je organismus schopen se ubránit patogenům (Laughton et al., 2011).

2.3.3 Rozdíly mezi populacemi

Včela medonosná je přizpůsobena klimatu mírného podnebného pásu střídáním generací, přičemž rozlišujeme populace letní a zimní. Letní populace zahrnuje včely líhnoucí se od konce zimy do konce léta (Mattila et al., 2001). Tato populace zajišťuje veškeré potřeby úlu, a především sběr surovin a vytváření zásob. Včely letní populace mají vzhledem k aktivnímu životnímu stylu poměrně krátkou dobu dožití, a to přibližně 30 dní (Fukuda & Sekiguchi, 1966). Na konci srpna se začínají objevovat první včely zimní populace, které mají dobu dožití až přes půl roku. Musí totiž přežít zimu, kdy včelstvo přežívá v zimním chomáči a matka neploduje. Tyto včely především zajišťují udržování vnitřního prostředí v úlu a výživu prvních včel letní populace.

V zimním období jsou včely vystaveny menšímu množství patogenů, jelikož neopouští úl. I přes to je jejich imunitní reakce srovnatelná s imunitní reakcí letních včel, po imunostimulaci vykazuje dokonce jejich hemolymfa vyšší antimikrobiální aktivitu. Zároveň se v jejich hemolymfě vyskytuje větší množství proteinů, což vyšší antimikrobiální aktivitu hemolymfy může vysvětlovat (Kunc et al., 2019). Aktivitu buněčné imunity zimní včely nevykazují prakticky žádnou (Gätschenberger et al., 2013). To je v souladu s trendem snižování počtu hemocytů s věkem (Schmid et al., 2008).

Mezi těmito dvěma generacemi dochází také k rozdílným expresím antimikrobiálních peptidů. Zatímco u letních včel je pozorovatelná vyšší relativní exprese AmP apidaecinu a abaecinu, u zimní generace došlo k vyšší relativní expresi defensinů a hymenoptaecinu (Dostálková et al., 2020).

2.3.4 Rozdíly mezi kastami

Trubci jsou méně vystavováni vnějšímu prostředí, ve kterém může častěji docházet ke kontaktu s patogenem, přesto je pro ně a pro další generace velmi důležitá jejich imunitní odpověď (Gätschenberger et al., 2012). Jejich imunitní reakce je velmi podobná imunitě dělnic. Jediným rozdílem je produkce proPO jako komponenty melanizační kaskády, jejíž koncentrace se při stimulaci imunitního systému po celý život trubce nemění. Produkce AmP po infekci s věkem trubce klesá, buněčná imunita je stejně jako u dělnic upozaděna brzy po dosažení dospělosti (Gätschenberger et al., 2012).

Matky jsou po celý svůj život, kromě snubního letu, v prostředí úlu, jsou ale výhradně krmeny dělnicemi, je u nich tedy velké riziko infekce (Gätschenberger et al., 2013). Zároveň jsou vitálními členkami včelího společenství, v některých případech závisí na jejich imunitních reakcích osud celé kolonie. Jejich imunitní reakce má stejný profil, jako imunitní reakce dělnic (Gätschenberger et al., 2013)

2.4 Sociální imunita

Sociální imunita je specifikem eusociálních druhů hmyzu, jako jsou například včely, vosy, mravenci, nebo všekazi. Tento způsob života umožnil vývoj nových způsobů potlačování šíření patogenů a parazitických organismů. U včel lze například pozorovat vzorce chování, které mají za účel potlačovat šíření parazita, nebo jej přímo odstraňovat (Kurze et al., 2016).

Můžeme pozorovat několik druhů chování, které lze označit jako projevy sociální imunity. Lze sem zařadit hygienické chování, jako je odklizení těl uhynulých jedinců, grooming a Varroa Sensitive Hygiene, nebo jiné druhy chování, jako je rojení v momentech vysoké míry infestace, zvyšování teploty úlu, nebo pokrývání stěn úlu antimikrobiálními materiály, například propolisem.

Jako Varroa Sensitive Hygiene se označuje chování dělnic, které má za úkol snížit infestaci *V. destructor*. Toto chování spočívá v odvíčkování napadených kukel a jejich vynášení z úlu (Kurze et al., 2016). Jedná se o typ chování projevující se jen u některých včelstev, což je důsledkem pozdní introdukce *V. destructor* včele medonosné. Nevýhodou tohoto chování je, že velmi často dochází k odstraňování zdravého plodu. Tím pádem u včelstev projevujících nízkou úroveň napadení je tento typ chování spíše nevýhodný (Vandame et al., 2002).

Grooming je možné volně přeložit jako vyčesávání. Jedná se o specifický typ chování projevující se při napadení ektoparazity, jako je například již několikrát zmiňovaný *V. destructor*. Včela se buď čistí sama končetinami, nebo, pokud není schopna se parazita zbavit sama, dává signál ostatním včelám, které ji následně čistí kusadly. Dochází k odstranění ektoparazita a někdy také k jeho usmrcení kusadly (Vandame et al., 2002).

Jako propolis označujeme látky rostlinného původu, které včely sbírají, mísí s voskem a využívají je k pokrývání povrchů v úlech (Seeley & Morse, 1976). Jedná se především o rostlinné pryskyřice obsahující fenolické látky s antimikrobiálními účinky (Simone-Finstrom et al., 2017). Z toho důvodu také včely propolis používají k mumifikaci větších živočichů, které včely při obraně kolonie usmrtily, ale nebyly schopny je z úlu odklidit. Propolis je také aplikován na stěny buněk, ve kterých se vyvíjí larvy a pomáhá tak vytvářet sterilní prostředí pro vývoj plodu, případně potlačuje vývoj a reprodukci ektoparazitů parazitujících na kuklách (Pusceddu et al., 2021).

Termoregulace může být také způsobem, jak se kolonie může ubránit patogenu. Zvyšování teploty včely obstarávají vibrací křídlových svalů (Heinrich & Esch, 1994). V některých případech lze sledovat zvyšování teploty kolonie při celoplošné nákaze patogenem citlivým na teplotu, například plísní *Ascosphaera apis*. Při napadení včely zvyšují teplotu v úlu, což vede minimálně k oslabení patogenu (Starks et al., 2000).

2.5 Patogeny včely medonosné

S životním cyklem včely medonosné je spojeno velké množství patogenů a parazitů, kteří se přizpůsobili podmínkám panujícím v kolonii a využili jich pro svůj prospěch. Mezi patogeny včely medonosné řadíme mnoho druhů patřící mezi viry, bakterie, houby nebo roztoče.

2.5.1 Virózy

Až na výjimku patří všechny známé viry napadající včelu medonosnou mezi ssRNA viry obalené proteinovou kapsidou (Chen et al., 2006). Mezi nejvýznamnější viry patří virus deformovaných křídel (DWV), virus pytlíčkovitého plodu (SBV), virus akutní paralýzy včel (ABPV) a virus černání matečnic (BQCV). Viry jsou velmi často úzce spjaty s parazitickým roztočem kleštíkem včelím (*Varroa destructor*), který slouží jako jejich vektor (Chen & Siede, 2007).

DWV, anglicky deformed wing virus je jedním z majoritních patogenů způsobujících úhyn včelstev. Tento virus je rozšiřován primárně již zmiňovaným roztočem *V. destructor*, který virus přenáší z jedné včely na druhou. DWV napadá všechna vývojová stádia včely, ovšem pojmenován je podle jeho vlivu na čerstvě vylíhlé mladé včely, které mají malá, deformovaná křídla, nejsou schopné letu a jsou menšího věku. Dospělé včely nakažené DWV neprojevují fyziologické změny, projevuje se u nich ovšem zkrácení doby života (Chen & Siede, 2007).

SBV, anglicky sacbrood virus také napadá všechna vývojová stádia včel, výrazné příznaky však můžeme pozorovat pouze u larev. Virus rozšiřují krmičky, kterým se virus usazuje v podhltanových žlázách, odkud se uvolňuje při krmení nebo trofalaxi. Napadené larvy tmavnou a ztrácí anatomický tvar, odtud název tohoto viru (Chen & Siede, 2007).

BQCV, anglicky black queen cell virus, je virus převážně postihující larvy a kukly matek. Infikovat se mohou i dospělé včely, u nich však nedochází k žádným projevům onemocnění. Onemocnění se projevuje podobně jako u SBV, larva matky tmavne, její kutikula nedrží tvar, a nakonec dojde i ke zčernání matečnic (Chen & Siede, 2007).

Posledním významným virem je ABPV, anglicky acute bee paralysis virus. Tento virus postihuje všechna stádia včely, přičemž nejtypičtější projevem je nelétavost včel a jejich následný úhyn. Virus se šíří jak trofalaxi, tak pro něj může být vektorem *V. destructor* (Chen & Siede, 2007).

2.5.2 Bakteriální nemoci

Bakteriální onemocnění velmi často působí kolaps celého včelstva. Právě kvůli tomu jsou tato onemocnění bedlivě sledována a včelstva se symptomy nákazy likvidována. Nejvýznamnějším bakteriálním onemocněním včel je mor včelího plodu, anglicky pojmenované American foulbrood, postihující larvální stádium včely medonosné. Toto onemocnění je způsobeno tyčinkovitou Gram-pozitivní sporující bakterií *Paenibacillus larvae* (Genersch, 2010). Patogenními jsou v případě této bakterie spory, které jsou schopné infikovat pouze larvy, zatímco dospělé včely nejsou nijak postiženy (Wilson, 1971).

Larva je infikována skrze potravu, kterou jí poskytují krmičky a spory se přesouvají do jejího střeva, kde dochází ke klíčení. Po vyklíčení a přechodu do vegetativního stavu bakterie proliferují ve střevě. Až poté dochází k průchodu buněk peritroficičnou matrix a epitelem střeva (Genersch, 2010). *P. larvae* následně infikuje hemolymfu larvy, usmrtí ji a rozloží. Z těl postižených larev se stává hnědá, neforemná hmota, která se stává ohniskem další nákazy. Jelikož včely vyklízí buňky po jídání napadených larev, samy se infikují sporami, které se následně rozšiřují exkrementy (Lindström et al., 2008). Samotné spory jsou schopné přežít v úlu až desítky let, proto se jedná o velmi rizikovou a sledovanou nemoc včelstev (Genersch, 2010).

Dalším bakteriálním onemocněním je hniloba včelího plodu, anglicky pojmenované European foulbrood. Toto onemocnění je způsobeno Gram-pozitivním kokem *Melissococcus plutonius*. Stejně jako *P. larvae* napadá včelí larvy a poměrně rychle je usmrcuje. Zároveň se i stejně šíří tím, že dospělé včely infikují larvy kontaminovanou potravou (Forsgren, 2010).

2.5.3 Houby napadající včelu medonosnou

Za nejvýznamnější škůdce včely medonosné z říše hub řadíme houby rodu *Nosema* patřící do mikrosporidií a *Ascospaera apis* patřící mezi vřeckovýtrusné houby. Z rodu *Nosema* napadají včelu dva druhy: *Nosema apis* a *Nosema ceranae* (Fries et al., 2015). *N. apis* je přirozeným, dlouho pozorovaným parazitem včely medonosné, zatímco *N. ceranae* je původním parazitem včely východní (*Apis cerana*), ovšem vzhledem k zavlečení včely medonosné do oblastí s přirozeným výskytem *N. ceranae* pravděpodobně došlo k jejímu přizpůsobení se včele medonosné (Klee et al., 2007).

Tyto organismy způsobují onemocnění zvané nosematóza a její průběh je u obou druhů *Nosema* velmi podobný. Jedná se v obou případech o intracelulárního parazita napadajícího trávicí soustavu včely. Infekce houbou rodu *Nosema* probíhá orálně. Spory pronikají do žaludku včely, kde napadají epiteliální buňky pomocí speciální organely zvané pólové vlákno. Pomocí něj dojde k vpravení sporoplastu do hostitelské buňky, kde dochází k jeho přeměně a množení. Nakonec dochází ke smrti napadené buňky a uvolnění dalších spor do dutiny žaludku. Onemocnění se u včel projevuje průjmovitou stolicí obsahujícími spory *Nosemy*, které dále zvyšují riziko infekce zdravých jedinců (Fries et al., 1992).

Ascospaera apis způsobuje onemocnění zvané vápenatění včelího plodu, anglicky chalkbrood. Již podle názvu je zřejmé, že se jedná o onemocnění postihující larvální stádium včely medonosné. Infekce probíhá orálně infikovanou potravou. Spory klíčí v trávicí soustavě larvy a vznikající mycelium penetruje peritroficičnou matrix a prorůstá celou larvou (Aronstein & Murray, 2010). Usmrcené larvy jsou ztvrdlé, odkud pramení pojmenování tohoto onemocnění.

2.5.4 Roztoči parazitující na včele medonosné

Nejprevalentnějším roztočem parazitujícím na včele medonosné je již zmíněný kleštík včelí (*V. destructor*). Jedná se původně o parazita včely východní, který se, podobně jako *N. ceranae*, přizpůsobil včele medonosné (Kurze et al., 2016). Ovšem zatímco včela východní je schopná jej tolerovat, u včely medonosné dochází v případě neléčené infestace *V. destructor* ke kolapsu celé kolonie (Rosenkranz et al., 2010).

V. destructor parazituje na včelích kuklách. Penetruje jejich kutikulu a živí se jejich hemolymfou a zároveň se v zavíčkované buňce také může nerušeně rozmnožovat. Kvůli krátkému reprodukčnímu cyklu a rychlému vývoji se počet roztočů v úlu velmi rychle zvyšuje. Po vylíhnutí včely roztoči vylézají z buňky a buď nachází další buňku s larvou, nebo přechází do tzv. foretické fáze, kdy se přichytávají mezi sternity a tergity včely a jsou schopni takto infikovat i jiná včelstva (Rosenkranz et al., 2010). Během této foretické fáze se *Varroa* živí tukovým tělesem včely (Ramsey et al., 2019).

V. destructor neusmrcuje včely přímo, ovšem vzhledem ke konzumaci hemolymfy kukly oslabuje a zároveň slouží jako vektor pro mnohé viry, převážně DWV (Chen & Siede, 2007).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie

3,3',5,5'-tetramethylbenzidin dihydrochlorid (TMB, Carl Roth, Německo)
Abaecin (Moravian Biotechnology, Česká republika)
Acetonitril (MERCK, Německo)
Apidaecin 1 (Moravian Biotechnology, Česká republika)
Apidaecin 1, [¹³C6¹⁵N4] izotopově značený (MERCK, Německo)
Coomassie Brilliant Blue G250 (MERCK, Německo)
Defensin 1 (Moravian Biotechnology, Česká republika)
Dihydrogenfosforečnan sodný, monohydrát (MERCK, Německo)
Dimethylsulfoxid (DMSO, MERCK, Německo)
Hovězí sérový albumin (BSA, MERCK, Německo)
Hymenoptaecin (Moravian Biotechnology, Česká republika)
Hydrogenfosforečnan sodný, dihydrát (MERCK, Německo)
Hydrogenfosforečnan sodný (MERCK, Německo)
Hydrogenuhlíčitan sodný (Lach-Ner, Česká republika)
Chlorid sodný (Penta Chemicals, Česká republika)
Kozí sekundární protilátka proti králičí protilátce značená křenovou peroxidasou (EC 1.11.1.7, Moravian Biotechnology, Česká republika)
Králičí primární protilátka proti abaecinu (Moravian Biotechnology, Česká republika)
Králičí primární protilátka proti defensinu (Moravian Biotechnology, Česká republika)
Králičí primární protilátka proti hymenoptaecinu (Moravian Biotechnology, Česká republika)
Kyselina citronová (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina mravenčí pro MS použití (FA, MERCK, Německo)
Kyselina sírová (Penta Chemicals, Česká republika)
Kyselina trifluoroctová (TFA, MERCK, Německo)
Peroxoboritan sodný, tetrahydrát (MERCK, Německo)
Sušené mléko, odtučněné (Carl Roth, Německo)
Tween 20 (Carl Roth, Německo)
Uhlíčitan sodný (Lach-Ner, Česká republika)
UHPLC voda (MERCK, Německo)

3.2 Biologický materiál

Veškerý biologický materiál v podobě včelího plodu v plástu byl dodán vedoucím práce.

3.3 Použité roztoky a pufrы

ELISA substrát – tetramethylbenzidin dichlorid, 0,00687 mol.l⁻¹, DMSO

Fosfo-citrátový s perborátem sodným – pH 4,6, hydrogenfosforečnan sodný, 0,104 mol.l⁻¹, kyselina citronová, 0,048 mol.l⁻¹, peroxoboritan sodný, 0,0026 mol.l⁻¹

Fyziologický roztok – chlorid sodný, 0,154 mol.l⁻¹

Kyselina mravenčí – 1,09 mol.l⁻¹

Kyselina sírová – 0,5 mol.l⁻¹

Kyselina trifluoroctová – 0,0088 mol.l⁻¹

Promývací pufr – pH 7,5, chlorid sodný, 1,5 mol.l⁻¹, dihydrogenfosforečnan sodný, 0,03 mol.l⁻¹, hydrogenfosforečnan sodný 0,01 mol.l⁻¹

Uhličitanový pufr (Coating buffer) – pH 9,6, uhličitan sodný, 0,04 mol.l⁻¹, hydrogenuhličitan sodný, 0,06 mol.l⁻¹

3.4 Přístroje

Analytické váhy Denver Summit (Denver instruments, USA)

Centrifuga 5425-R (Eppendorf, Německo)

Chromatograf Dionex UltiMate-3000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

Lyofilizátor Lyovac GT-2 (Leybold-Heraeus, Germany)

Magnetická míchačka (Biosan, Lotyšsko)

Oscilační mlýn MM 400 (Retsch, Německo)

Digitální pH metr pH 50+ DHS (Giorgio Bormac, Itálie)

Q-TOF hmotnostní spektrometr Bruker Compact (Bruker, Německo)

Rotační koncentrátor Eppendorf (Eppendorf, Německo)

Spektrofotometr Synergy H1 (BioTek, USA)

Termoblok CH-100 (Biosan, Lotyšsko)

Třepačka PST-100 HI (Biosan, Lotyšsko)

Ultrazvuková lázeň Elmasonic – 50R (Elma, Švýcarsko)

Vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)

3.5 Software

Vyhodnocení dat z hmotnostního spektrometru proběhlo v programu TASQ 2.2, chromatogramy byly vyhodnoceny v programu Bruker Compass Data Analysis. Měření na mikrodestičkovém readru proběhlo pomocí programu Gene 5. Veškeré zpracování dat a výsledků proběhlo v programu Microsoft Excel 365.

3.6 Metody

3.6.1 Příprava vzorku

Příprava vzorku byla provedena dle postupu Danihlíka et al. (2014) s úpravami pro homogenizaci tkání plodu. Plod byl vypreparován z plástu, opláchnut ve fyziologickém roztoku a vložen do předem zvážených plastových mikrozkušavek. V těchto mikrozkušavkách byly jednotlivé larvy a kukly zváženy. Vzorky byly následně zamrazeny, a to buď vhozením do tekutého dusíku, nebo vložением do mrazáku o teplotě $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 30 minut. Po zamražení byl plod homogenizován přidáním homogenizačních kuliček a vložением do kuličkového mlýnku, kde byl homogenizován 10 minut při frekvenci 30 kmitů za sekundu. Po dokončení homogenizace byl homogenizát rozpuštěn v 300 μl 0,1% kyseliny trifluoroctové (TFA) a řádně promíchán na vortexu.

Po promíchání byly vzorky centrifugovány po 10 minut při $16000 \times g$ v centrifuze vychlazené na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugaci byl přepipetován supernatant do nových mikrozkušavek. Supernatant byl následně zahřát na 10 minut na teplotu $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky byly znovu centrifugovány po 10 minut při $16000 \times g$ a opět byl odpipetován supernatant do nových mikrozkušavek. V případě, že byly vzorky určeny pro měření pomocí ELISA metody a LC-MS, byly rozděleny na dva alikvoty. Následně byly ponechány po 1 hodinu v mrazáku o teplotě $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky byly nakonec přes noc lyofilizovány.

3.6.2 Bradfordova metoda

Obsah proteinů ve vzorku byl změřen pomocí Bradfordovy metody (Bradford, 1976). Pro měření pomocí této metody bylo odebráno malé množství vzorku před zamražením a následnou lyofilizací. Nejprve byla připravena kalibrační řada za použití roztoků o různých koncentracích hovězího sérového albuminu (BSA). Roztok BSA byl připraven

v 0,1% roztoku TFA. Vzorky z larev o hmotnosti nad 75 mg byly desetkrát zředěny v 0,1% TFA. Pro odečtení signálu pozadí byl využit blank. Do jamek bylo v triplicátech napipetováno 5 μ l vzorku nebo standardu, 45 μ l 0,1% TFA a 200 μ l pracovního roztoku Bradfordova činidla. U blanku bylo místo vzorku napipetováno 5 μ l 0,1% TFA. Po dokončení pipetování byly vzorky 5 minut inkubovány a následně byla změřena jejich absorbance při 595 nm pomocí mikrodestičkového readru.

3.6.3 ELISA

Lyofilizát byl rozpuštěn v 650 μ l uhličitanového pufru. Následně bylo v duplikátu napipetováno do jamek mikrodestičky 100 μ l rozpuštěného lyofilizátu, uhličitanového pufru, nebo standardů AmP o koncentracích 10, 20 a 30 μ g.ml⁻¹. Uhličitanový pufr sloužil jako blank pro odečtení pozadí a zároveň jako negativní kontrola. Standardy získané zředěním zásobních roztoků abaecinu, hymenoptaecinu a defensinu o koncentraci 100 μ l.ml⁻¹ v uhličitanovém pufru. Mikrodestička byla uzavřena víkem, utěsněna parafilmem a přes noc ponechána pro inkubaci v lednici při 4 °C.

Po ukončení inkubace byl obsah jamek vyklepán a destička byla vysušena poklepáním o ubrousek a třikrát promyta napipetováním a propipetováním 200 μ l pracovního promývacího pufru připraveného desetinásobným zředěním promývacího pufru za přidání 500 μ l Tween 20. Do jamek bylo následně napipetováno 200 μ l 0,5% roztoku odtučněného mléka připraveného rozpuštěním 0,5 g sušeného mléka v 10 ml promývacího roztoku. Mikrodestička byla opět přiklopena víčkem, utěsněna parafilmem a inkubována po 2 hodiny při teplotě 37 °C. Po uběhnutí inkubační doby byla destička opět vysušena, třikrát promyta promývacím pufrem a do jamek bylo napipetováno 100 μ l roztoku primární protilátky proti danému peptidu. Roztoky primárních protilátek byly připraveny následovně: roztok protilátky proti abaecinu byl zředěn promývacím pufrem v poměru 1:250, zatímco roztoky protilátek proti hymenoptaecinu a defensinu byly připraveny zředěním zásobních roztoků v poměru 1:500. Mikrodestička byla ponechána pro inkubaci 1 hodinu při 37 °C. Po inkubaci byla mikrodestička vysušena, třikrát promyta promývacím pufrem a do jamek se vzorky bylo napipetováno 100 μ l roztoku sekundární protilátky značené křenovou peroxidasou. Tento roztok byl připraven zředěním zásobního roztoku protilátky promývacím pufrem v poměru 1:3000. Opět byla provedena hodinová inkubace při 37 °C.

Během inkubace byl připraven roztok chromogenního substrátu TMB rozpuštěním 4,8 mg ve 200 μl DMSO. 100 μl tohoto roztoku bylo následně doplněno do 5 ml fosfo-citrátovým pufrem. Po uběhnutí inkubační doby byla mikrodestička vysušena, promyta a do jamek bylo napipetováno 100 μl roztoku substrátu. Opět byla provedena hodinová inkubace při 37 °C. Po uplynutí času byla reakce zastavena napipetováním 50 μl kyseliny sírové o koncentraci 0,5 mol.l⁻¹ a byla změřena absorbance roztoků při vlnové délce 450 nm.

3.6.4 LC-MS

Lyofilizát byl rozpuštěn v 100 μl 5% kyseliny mravenčí. Mikrozkumavky byly vloženy do ultrazvukové lázně a deset minut sonikovány z důvodu lepšího rozpuštění lyofilizátu. Po ukončení rozpouštění byly vzorky centrifugovány po 10 minut při 16000 $\times g$. Následně byl odebrán supernatant a přenesen do nových zkumavek. Opět byla provedena centrifugace po jejímž ukončení bylo 30 μl vzorku přeneseno do skleněných vialek. Ke vzorku bylo přidáno 10 μl pracovního roztoku interního standardu značeného apidaecinu o koncentraci 0,416 $\mu\text{m.l}^{-1}$ a byla provedena separace pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie následované hmotnostní spektrometrií. UHPLC separace byla provedena dle metody uvedené v Dostálková et al., 2021 na koloně Kinetex 1,7 μm EVO C18 s předkolonou. Jako mobilní fáze sloužila 0,5% FA ve vodě a 0,5% FA v acetonitrilu.

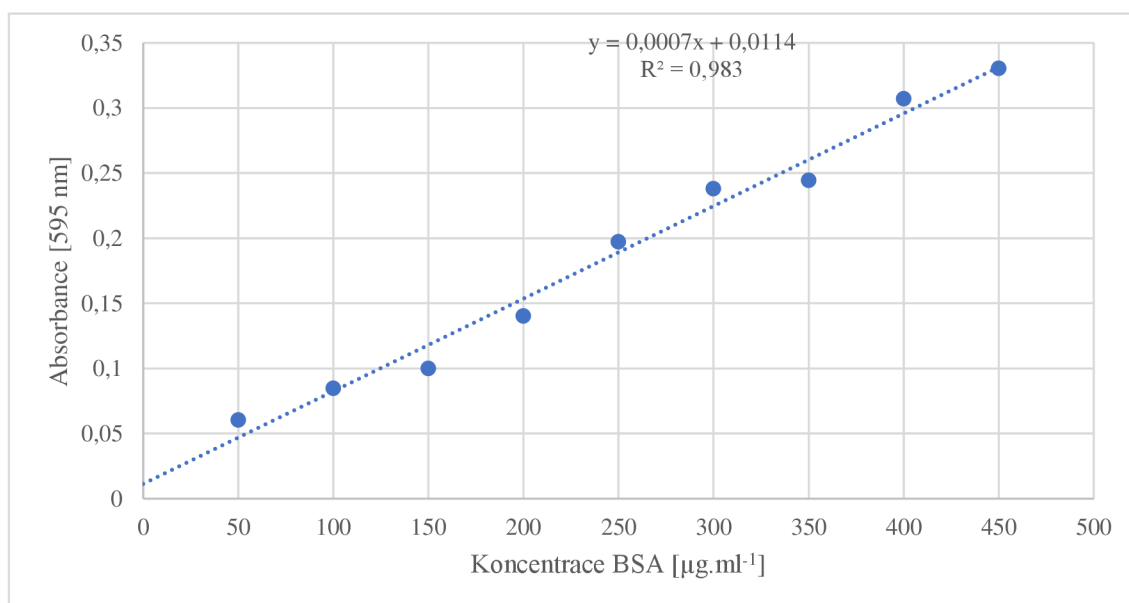
Pro stanovení koncentrací v pozitivních vzorcích byla sestavena kalibrační řada pomocí čistého roztoku apidaecinu 1 o koncentracích 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 2500 a 3000 nmol.l⁻¹. Do skleněných vialek byl napipetován roztok hemolymfy mladušky, vždy stejný objem pracovního roztoku izotopově značeného apidaecinu a rostoucí objemy pracovního roztoku apidaecinu. Vzorky v mikrozkumavkách byly následně odpařeny na rotační odparce a znovu rozpuštěny v 40 μl 5% FA. Tato kalibrační řada byla následně proměřena pomocí kapalinové chromatografie následované hmotnostní spektrometrií na přístroj Q-TOF Bruker Compact. Ionizace vzorku proběhla pomocí elektrosprejové ionizace (ESI).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

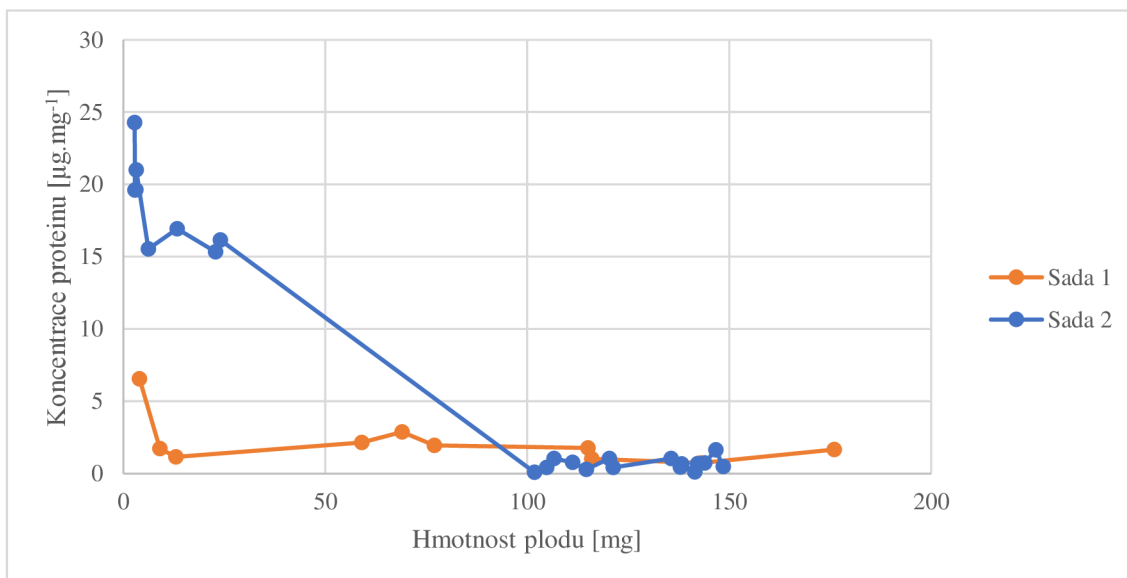
4.1 Stanovení koncentrace celkových proteinů v extraktu z plodu

Odebráním části vzorku před lyofilizací a jeho následnou analýzou pomocí Bradfordovy metody bylo zjištěno množství proteinu ve vzorcích po precipitaci větších proteinů za pomoci 0,1% TFA a zvýšené teploty. Byly změřeny absorbance vzorků, ze kterých byly vypočítány koncentrace proteinů v jednotlivých vzorcích a vztaženy na mg hmotnosti plodu. Byla provedena měření ve dvou sadách. Pro druhou sadu bylo do zpracování vzorku zařazeno omývání plodu od mateří kašičky. Pro kvantifikaci byla sestavena kalibrační řada a z rovnice grafu kalibrační funkce (Obr. 4) byly následně vypočítány koncentrace proteinu v jednotlivých vzorcích. Vypočítaná množství proteinu byla vztažena k hmotnosti jedince tak, aby bylo možné jednotlivá stádia porovnávat.

Z grafu závislosti koncentrace proteinu na hmotnosti plodu je patrné, že největší koncentrace proteinu je pozorovatelná u nejmladších larev, což potvrzuje i měření u druhé sady vzorků (Obr. 5). To by mohlo být vysvětlitelné rozdílnou stravou jedinců různého stáří. Nejmladší larvy dělnic jsou krmeny především mateří kašičkou bohatou na proteiny, zatímco v pozdějších fázích jsou krmeny směsí pylu a medu, což je potrava méně bohatá na proteiny a více na sacharidy a lipidy (Veselý, 2003). Ghosh et al. (2016) ve svém článku uvádí, že za pomoci Kjeldahlovy metody zjistily, že proteiny tvoří



Obr. 4: Kalibrační přímka pro stanovení koncentrace celkových proteinů v extraktech z plodu



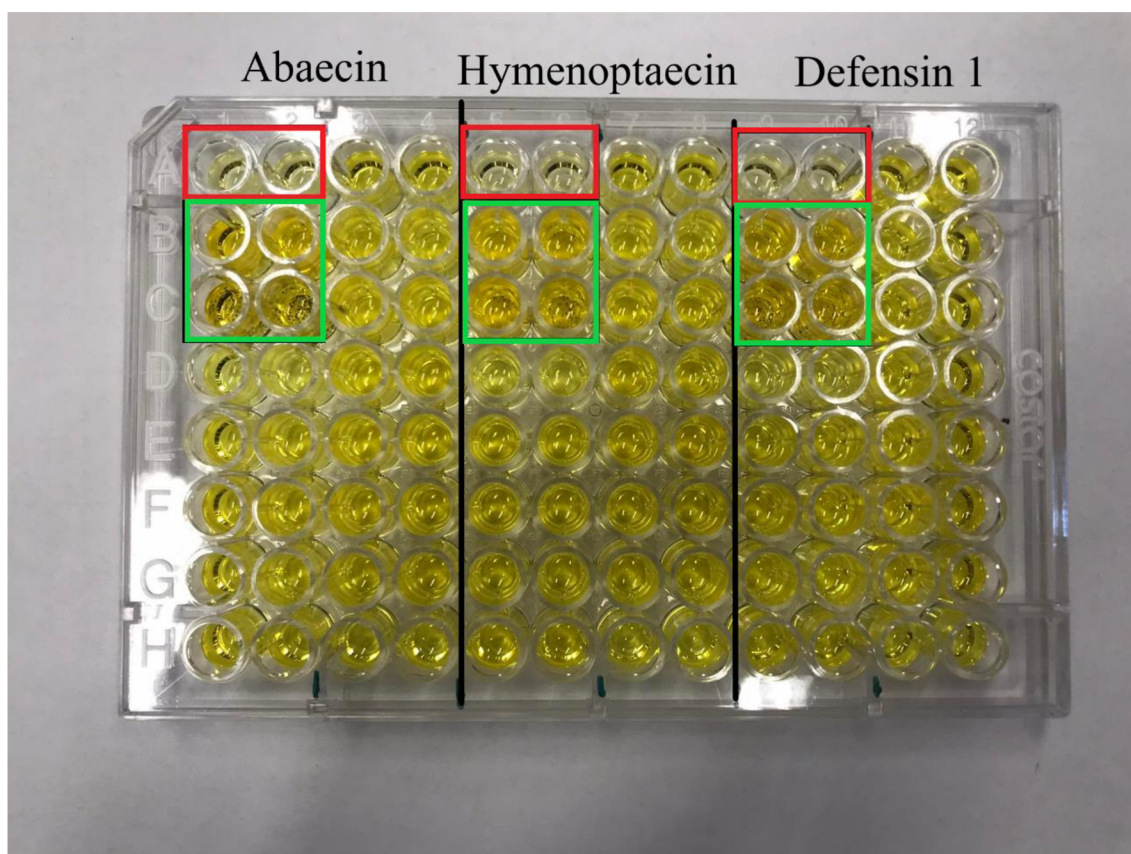
Obr. 5: Graf závislosti množství proteinu vztaženého na hmotnost plodu na hmotnosti plod

přibližně 35,3 % suché hmoty larev v pozdních fázích vývoje, přičemž suchá hmota činí 25,6 % hmotnosti larvy. Při přepočtu těchto hodnot na larvu o hmotnosti 130 mg, což přibližně odpovídá takto staré larvě, získáme hmotnost proteinů o hodnotě 11,75 mg. To je hodnota až o dva řády vyšší, než jaké byly pozorovatelné při tomto měření. Je nutno podotknout, že během zpracování vzorku došlo k odstranění velkého množství proteinu ve formě sraženiny, přičemž nejvíce jí bylo možno pozorovat právě u larev tohoto stáří. Na rozdíly v koncentracích u larev různého stáří tudíž mohla mít i různá kompozice proteinu v larvách různého stáří, přičemž u starších larev došlo k odstranění větší frakce proteinů než u mladých larev.

Během optimalizace bylo do procesu homogenizace zařazeno omývání larev ve fyziologickém roztoku před vážením za účelem snížení množství mateří kašičky, která je bohatá na proteiny a mohla by tak zkreslovat měření. Při porovnání grafů lze pozorovat opačný jev, a to vyšší koncentraci proteinů u nejmladších larev omytých od mateří kašičky. Naopak u omytých těžších larev lze pozorovat snížení koncentrací. Tento jev byl pravděpodobně způsoben rozdílnou účinností extrakce proteinů z tkání při homogenizaci a následné úpravě vzorku.

4.2 Detekce AmP pomocí metody ELISA

Pomocí metody ELISA byly provedeny pokusy o detekci abaecinu, hymenoptaecinu a defensinu 1. Byla provedena tři pilotní měření. U prvních dvou měření nebylo možno měřit signál u pozitivních kontrol, tj. standardů čistých AmP, pravděpodobně tedy došlo v postupu k chybě, která znehodnotila celé měření. U třetího měření bylo možné pozorovat velmi nízký signál u negativní kontroly a velmi vysoký signál u dvou pozitivních kontrol (Obr. 6). Jako pozitivní kontroly při třetím měření sloužily AmP pouze o koncentracích 10 a 20 nmol.ml⁻¹. Vzhledem k tomu, že u metody ELISA není kvantifikace umožněna z důvodu variability signálu u různých měření, byly porovnány pouze relativní intenzity signálu mezi jednotlivými vzorky.



Obr. 6: Mikrodestička po pozastavení reakce pomocí 0,5M kyseliny sírové. Červeně vyznačeny negativní kontroly, zeleně vyznačeny pozitivní kontroly



Obr. 7: Graf zobrazující závislost absorbance na hmotnosti plodu

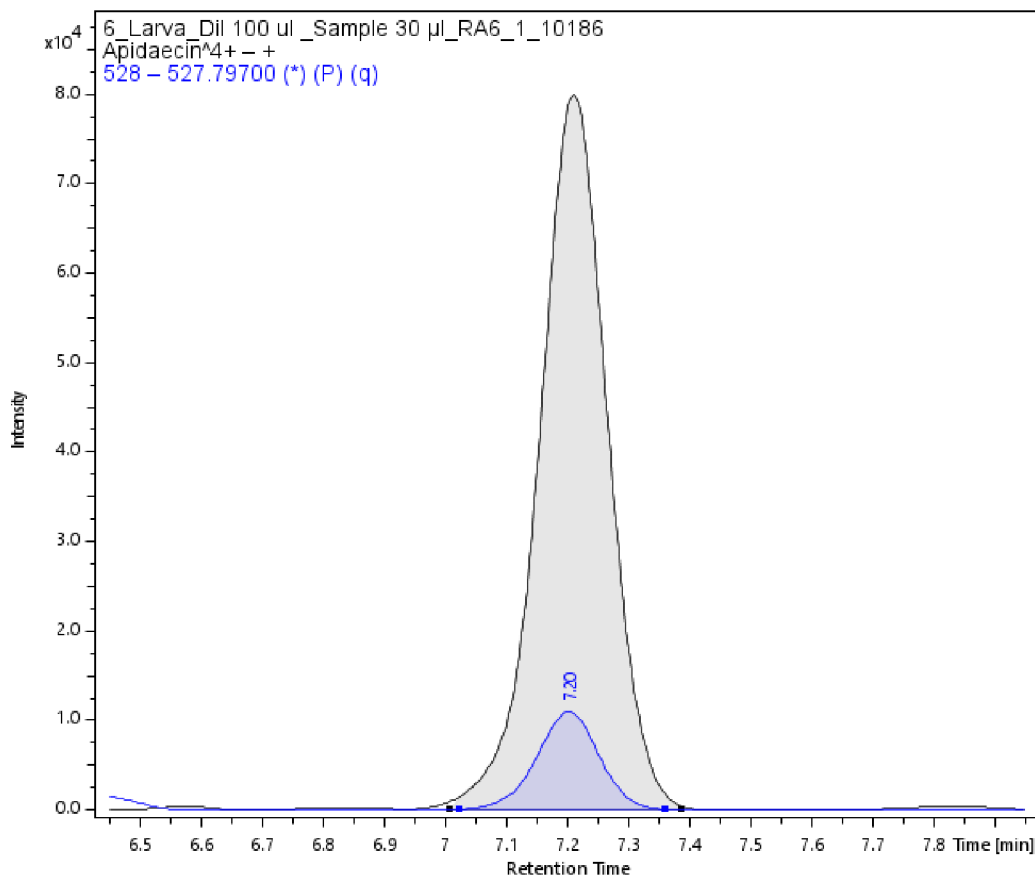
Při porovnání intenzity signálů na grafu (Obr. 7) můžeme u všech tří AmP pozorovat podobné trendy, což poukazuje na fakt, že se pravděpodobně nejedná o produkci AmP vyvolanou specifickou imunitní reakcí, ale spíše o produkci konstantní. U abaecinu lze sledovat prvotní nárůst signálu a jeho následné vyrovnění, které je narušeno pouze poklesem signálu u jedince o hmotnosti 155,8 mg. Signál hymenoptaecinu vypovídá stejný trend, pouze můžeme pozorovat vyšší počáteční nárůst signálu a vyšší signál u jedince s nejvyšší hmotností. Signál defensinu 1 nevykazoval žádné výrazné odchylky od zbylých dvou AmP. Nižší signál u jedince o hmotnosti 155,8 mg může způsobovat fakt, že se jedná o plod ve stádiu kukly. V tomto měření šlo o jediného jedince v tomto stádiu.

Detekce antimikrobiálních peptidů v larválním stádiu souhlasí s poznatky Randolt et al. (2008), kdy se podařilo v larvální hemolymfě detekovat abaecin, defensin 1 i hymenoptaecin pomocí elektroforézy. Tyto AmP ovšem byly detekovány až po umělé infekci larev bakteriemi. Infekce larev v tomto pokusu sice není vyloučena, není ale předpokládána. Gätschenberger et al. (2013) ve své práci poukazovali na fakt, že larvy jsou schopny produkovat látky antimikrobiální povahy, zatímco kukly tuto schopnost poměrně rychle ztrácí. Toto zjištění může vysvětlovat nižší signál všech antimikrobiálních peptidů u vzorku z larvy, ovšem je potřeba více dat pro potvrzení tohoto fenoménu.

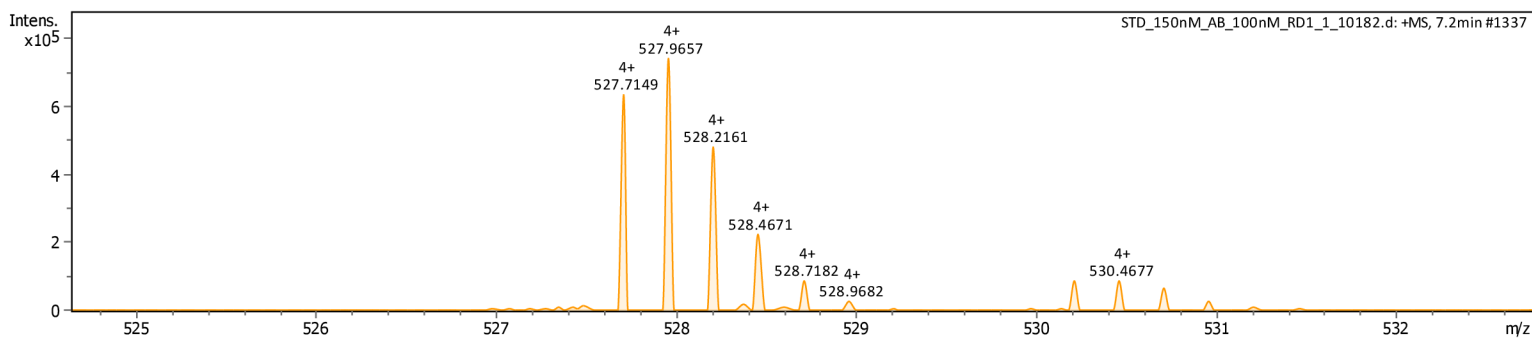
4.3 Detekce a kvantifikace apidaecinu 1 ve včelím plodu pomocí metody LC-MS

Před kvantifikací apidaecinu 1 bylo nejprve nutné potvrdit jeho přítomnost ve tkáni včelího plodu. Apidaecin 1 byl detekován v několika larvách jako molekula s retenčním časem 7,20 minuty (Obr. 8) s extrahováním peaku o m/z 527,8, která odpovídá čtyřnásobně nabitému iontu peptidu apidaecinu 1 (Obr. 9). Retenční čas a m/z byla ověřena měřením syntetického standardu apidaecinu 1 a izotopově [$^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$] značeného apidaecinu 1.

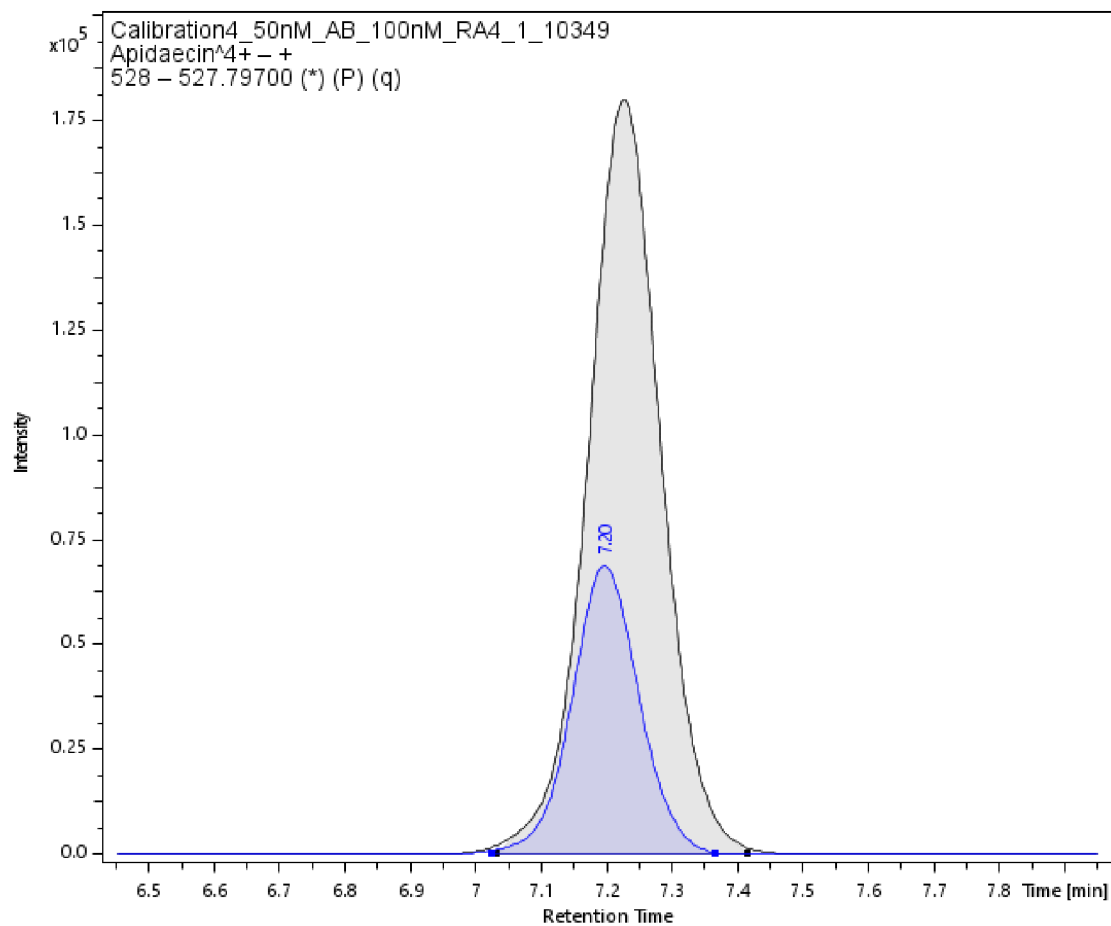
Po úspěšné detekci byla sestavena kalibrační řada, pomocí které bylo následně možné kvantifikovat množství apidaecinu v jednotlivých vzorcích (Obr. 10, 11). Pro kvantifikaci apidaecinu 1 proběhly dvě sady měření. V první sadě bylo 42 jedinců vybraných tak, aby přibližně pokrývali celou délku vývoje plodu včely medonosné. Druhá sada obsahovala 24 jedinců, kteří byli rozděleni do skupin po čtyřech dle stádia vývoje, ve kterém se právě nacházeli. U první sady byl interní standard ve formě izotopově značeného apidaecinu přidán těsně před samotným měřením, zatímco u druhé sady došlo k přidání interního standardu ihned po homogenizaci.



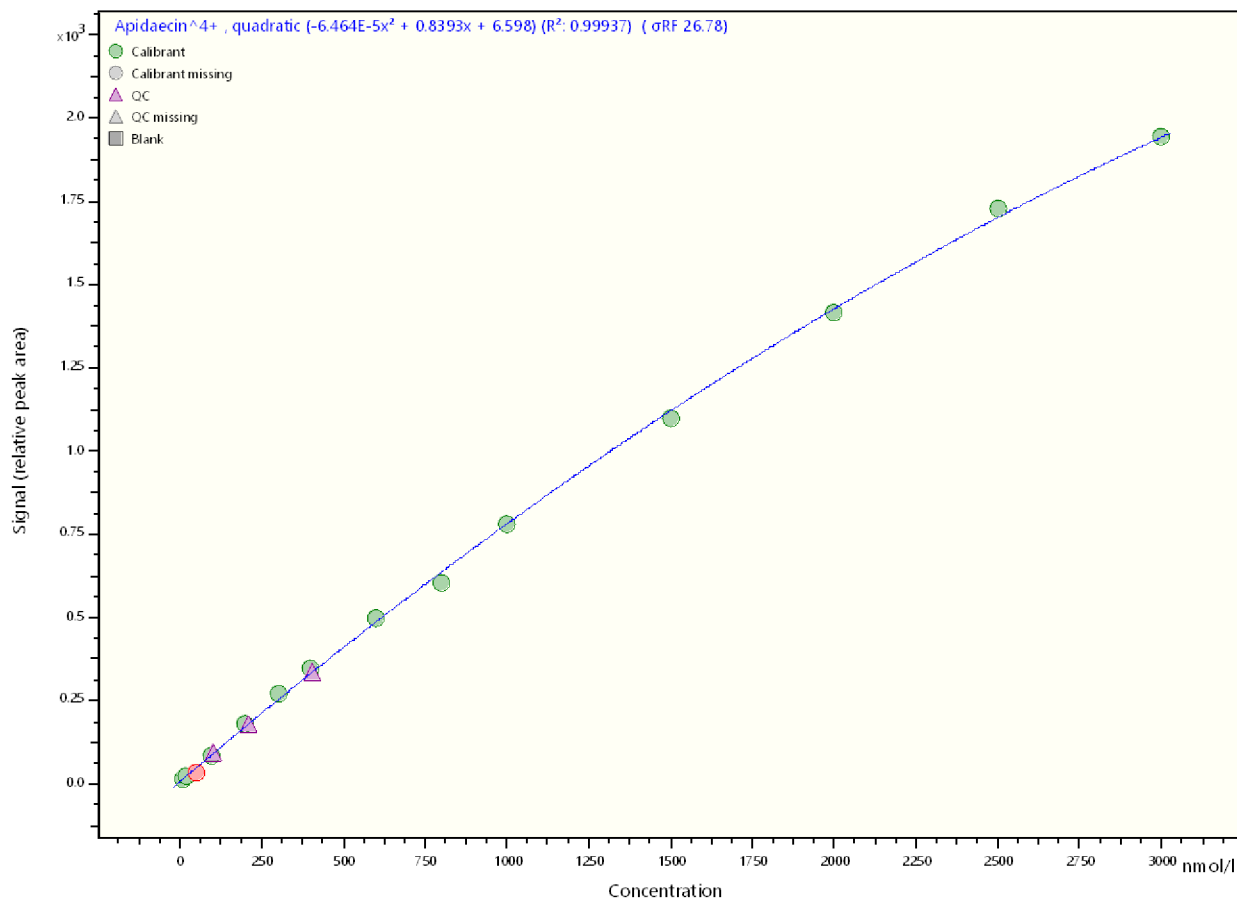
Obr. 8: Chromatogram apidaecinu 1 v larvě č. 6 z pilotního měření. Modře zvýrazněný peak $[M+4H]^{4+}$ iontu apidaecinu 1, šedě vyznačený peak $[M+4H]^{4+}$ iontu $[^{13}C6^{15}N4]$ izotopově značeného apidaecinu 1.



Obr. 9: Ukázka hmotnostního spektra standardu apidaecinu 1 obohaceného $[^{13}C6^{15}N4]$ izotopově značeným interním standardem apidaecinu 1.

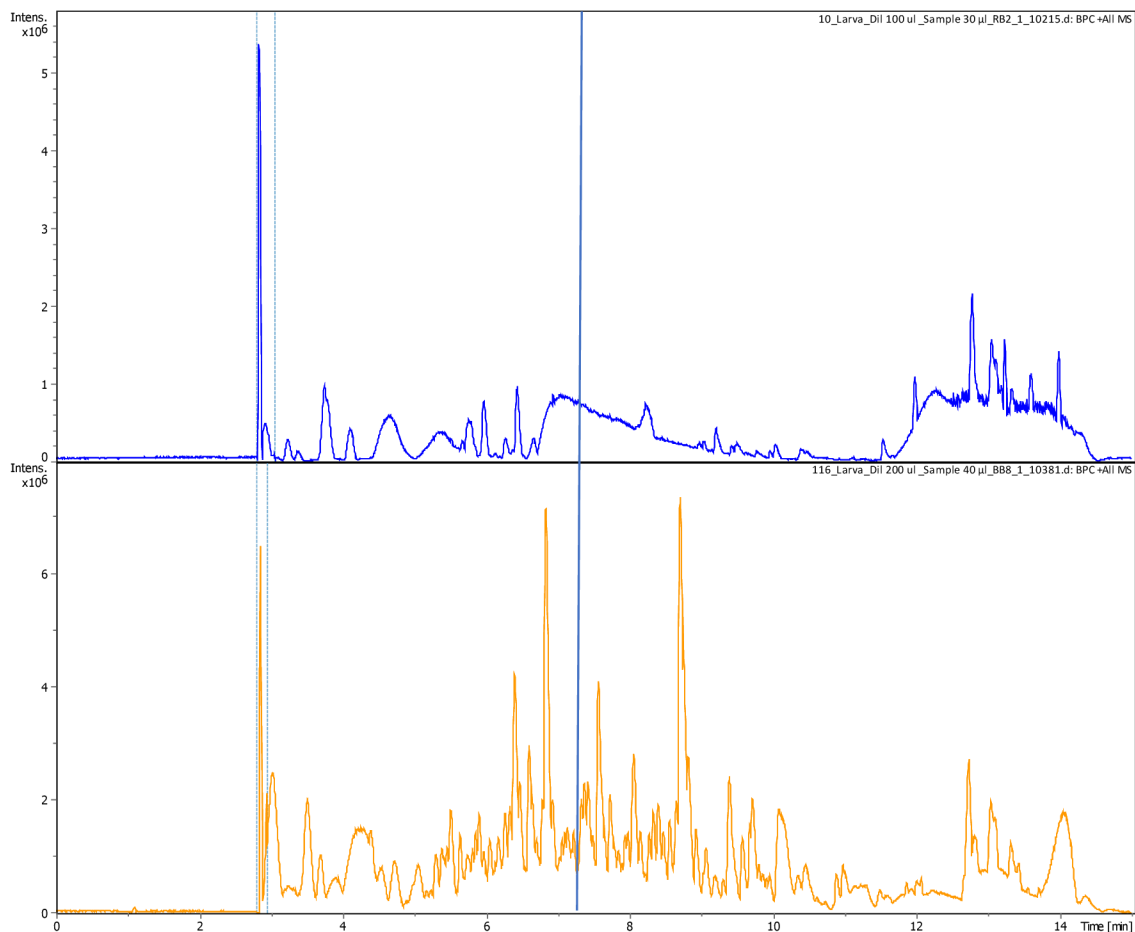


Obr. 10: Chromatogram standardu o koncentraci 50 nmol.l^{-1} . Modře zvýrazněn $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ ion apidaecinu 1, šedě vyznačen $[\text{M}+4\text{H}]^{4+}$ ion izotopově značeného apidaecinu 1



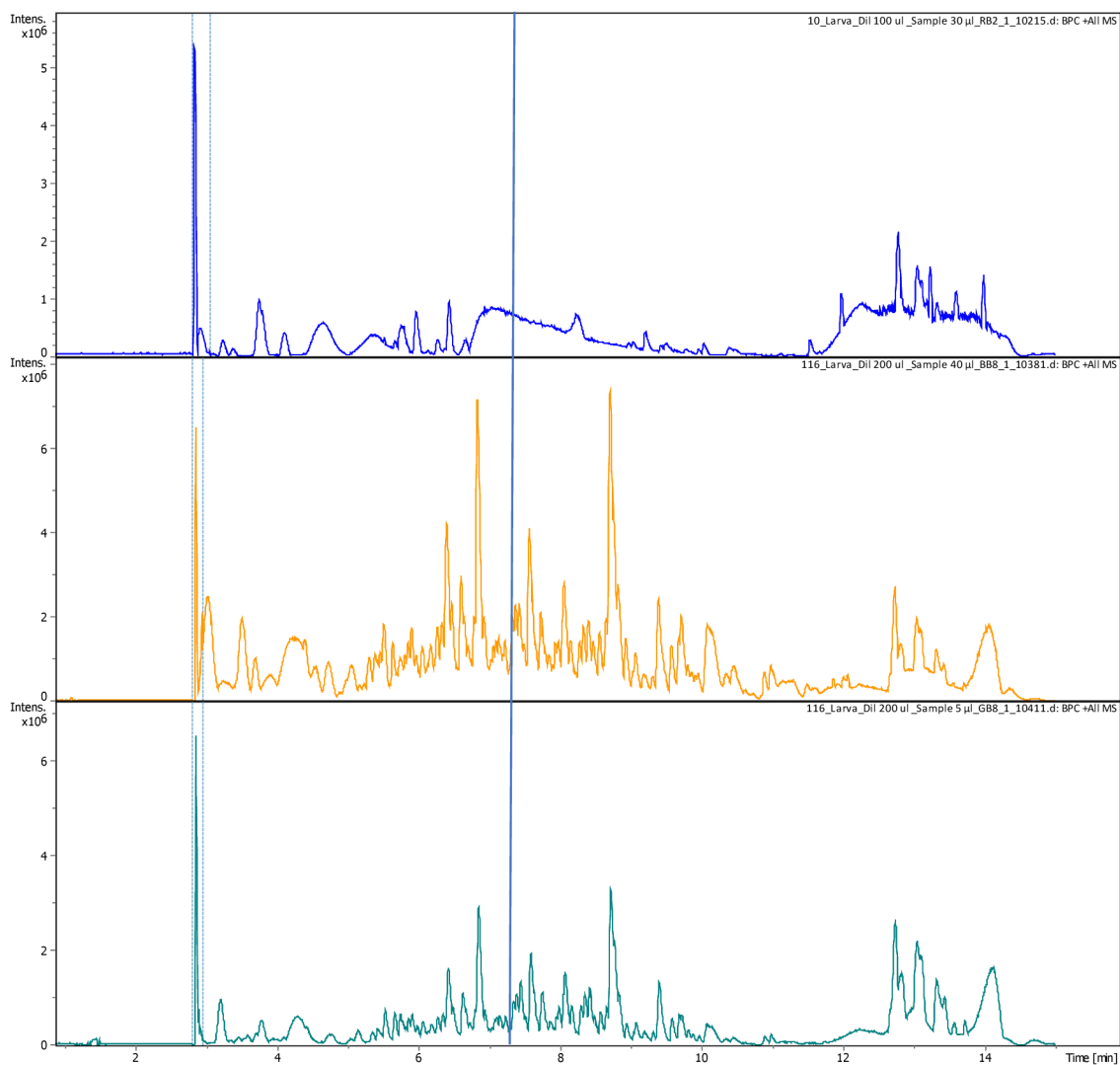
Obr. 11: Kalibrační křivka sestavená z rostoucích koncentrací apidaecinu 1

K úspěšné detekci apidaecinu 1 ovšem došlo pouze v první sadě měření, jelikož vzorky druhé sady byly příliš bohaté na ostatní molekuly, které interferovaly s měřením apidaecinu 1. Pro optimalizaci měření byly vzorky z druhé sady osmkrát zředěny a opět proměřeny pomocí LC-MS. Ovšem ani po zředění nedošlo k odstranění výrazných matricových efektů a apidaecin 1 nebyl ve směsi detekován.



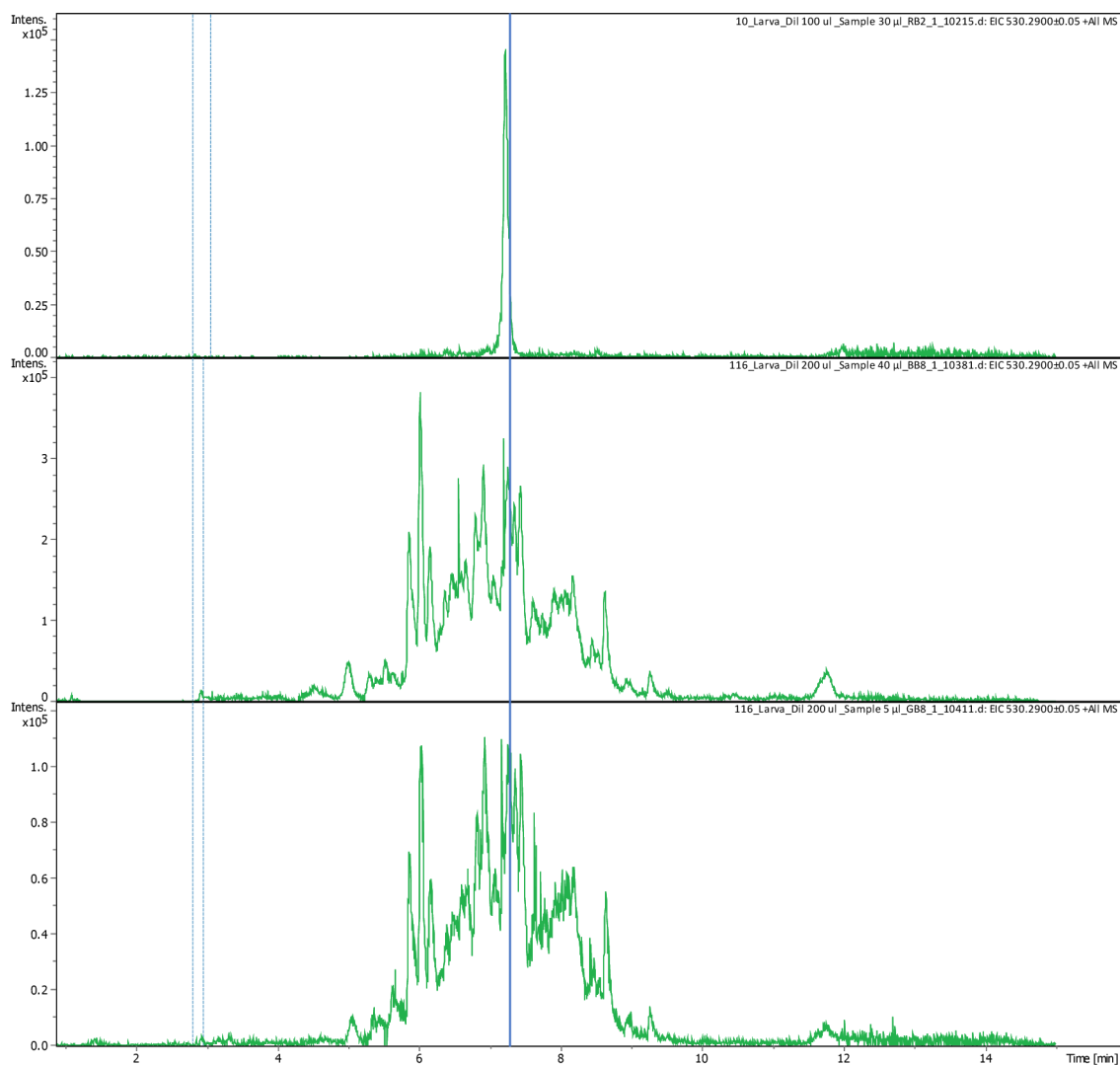
Obr. 12: Porovnání chromatogramů vzorků z larvy č. 10 (první sada) a z larvy č. 116 (druhá sada). Zeleně vyznačena kalibrační oblast, modře vyznačen retenční čas 7,20 minuty.

Při porovnání chromatogramů larev podobné hmotnosti z první a druhé sady měření (Obr. 12) lze pozorovat naprosto odlišné profily signálu. Zatímco u vzorku z první sady pozorujeme maximum signálu o intenzitě $1 \cdot 10^6$ v oblasti zájmu, u vzorku z druhé sady měření jsou signály místy až sedmkrát silnější. Tento úkaz poukazuje na fakt, že vzorek z druhé sady měření byl mnohem bohatší na matricové efekty, které potlačily ionizaci analytu a produkovaly signál v elučním čase apidaecinu 1.



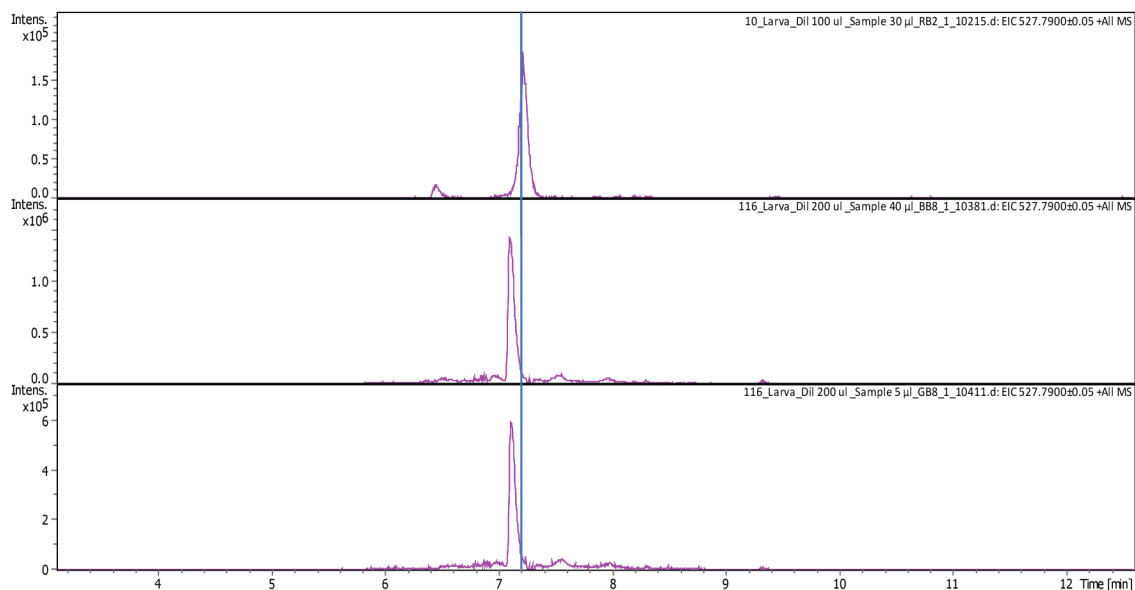
Obr. 13: Porovnání chromatogramů vzorku z larvy č. 10 (první sada), vzorku z larvy č. 116 (druhá sada) a osmkrát zředěného vzorku z larvy č. 116. Zeleným šrafováním je vyznačena kalibrační oblast, modře vyznačen retenční čas 7,20 minuty.

Ani při zředění (Obr. 13) nedošlo k detekci apidaecinu 1. Lze sice pozorovat snížení signálu, ale toto snížení ani zdaleka neodpovídá faktoru ředění, který je oproti snížení signálu přibližně čtyřnásobný. To poukazuje na fakt, že vzorky jsou natolik bohaté, že detektor přístroje může být přesycen.



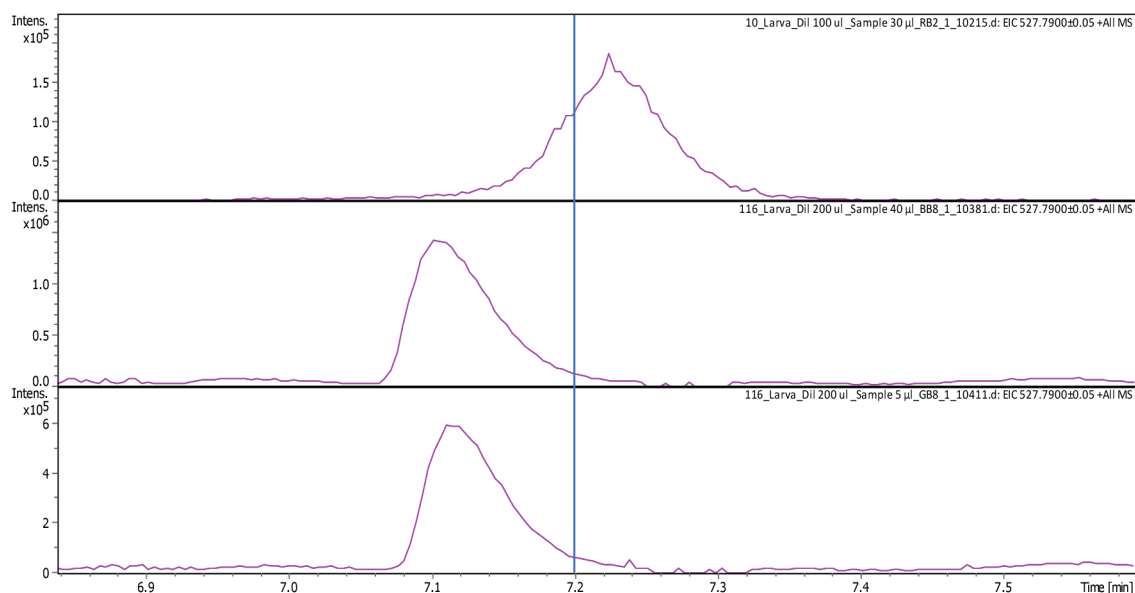
Obr. 14: Chromatogram iontu s hodnotou m/z odpovídající $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]$ izotopově značenému apidaecinu ve vzorcích z larvy č.10, larvy č. 116 a zředěném vzorku larvy č. 116. Modrou plnou čarou zvýrazněný retenční čas 7,20 minuty.

Pokud sledujeme eluci $[M+4H]^{4+}$ iontu s hodnotou m/z , která odpovídá $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]$ izotopově značenému apidaecinu 1, opět můžeme pozorovat velké rozdíly mezi oběma vzorky (Obr. 14). V první sadě můžeme pozorovat jeden ostrý peak v elučním čase okolo 7,20 minuty, což opět odpovídá elučnímu času apidaecinu 1. Naopak u druhé sady pozorujeme velké množství šumu bez jakéhokoliv ostrého peaku, což poukazuje na nepřesné měření.

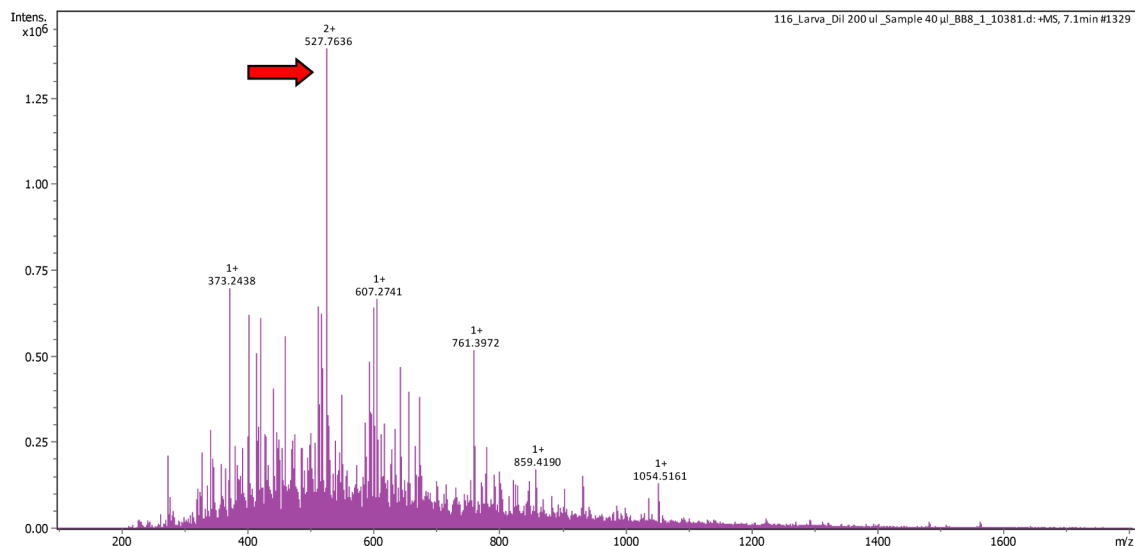


Obr. 15: Chromatogram molekuly s hodnotou m/z odpovídající apidaecinu 1 ve vzorcích z larvy č. 10, larvy č. 116 a osmkrát zředěném vzorku z larvy č. 116. Modře vyznačen retenční čas 7,20 minuty.

Při selekci signálu iontů s hodnotou m/z odpovídající apidaecinu 1 pozorujeme ostré peaky u obou vzorků, ovšem je viditelný posun retenčního času k nižší hodnotě u vzorku z larvy č. 116 (Obr. 15). V detailu je vidět, že peak eluce iontu je v čase odpovídající přibližně 7,10 minuty, což je již poměrně výrazná odchylka, která poukazuje na to, že se jedná o ion neodpovídající apidaecinu 1 (Obr. 16).



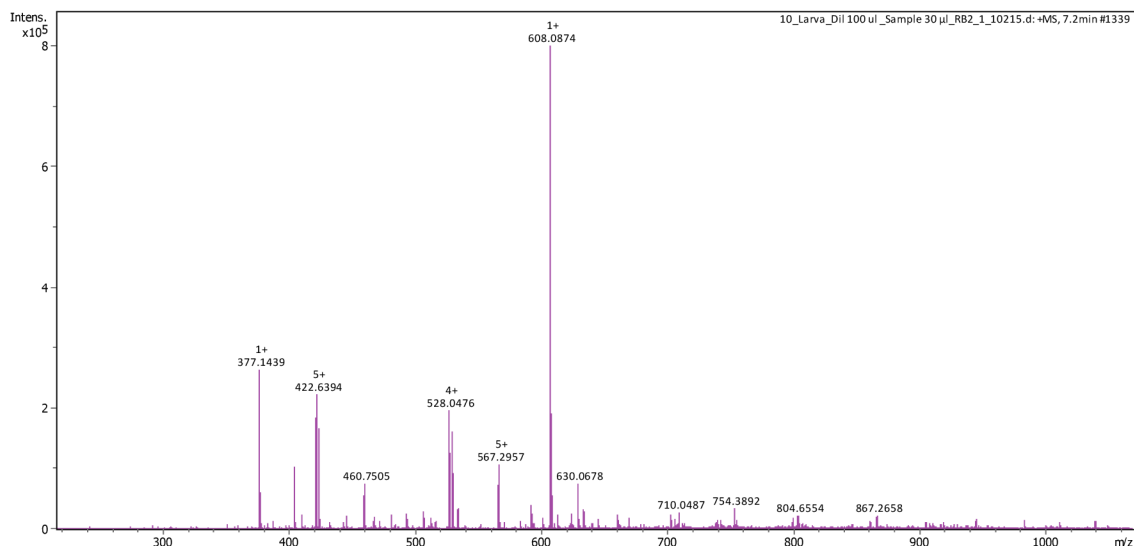
Obr. 16: Přibližný pohled na chromatogram molekuly s hodnotou m/z odpovídající apidaecinu 1 ve vzorcích z larvy č. 10, larvy č. 116 a osmkrát zředěném vzorku z larvy č. 116. Modře vyznačen retenční čas 7,20 minuty.



Obr. 17: Hmotnostní spektrum vzorku z larvy č. 116 v elučním čase 7,1 minuty. Šipkou vyznačen peak zaměnitelný za apidaecin 1.

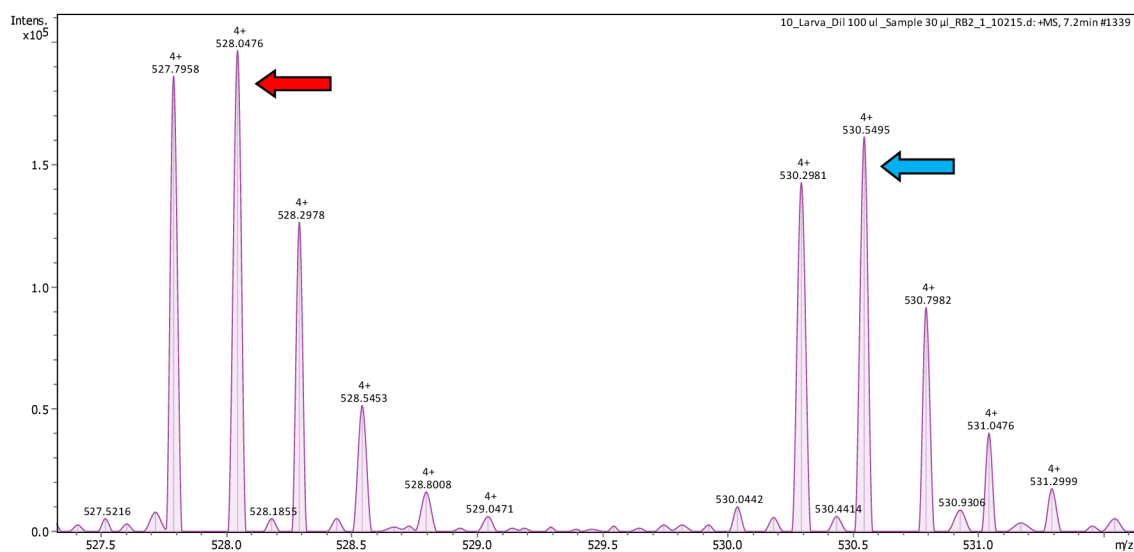
Toto tvrzení podporuje také hmotnostní spektrum změřené v peaku eluce měřeného iontu, tedy v elučním čase 7,10 minuty (Obr. 17). Můžeme sice pozorovat iont, který má přibližně m/z odpovídající apidaecinu 1, ovšem jedná se o ion s pouze dvojnásobným nábojem, což apidaecinu 1 neodpovídá, jedná se tedy pravděpodobně o molekulu s poloviční molekulovou hmotností. Zároveň pozorujeme nepřeborné množství jiných peaků, které mohou interferovat při měření a ovlivňovat signál analytu.

Naopak u vzorku z larvy č. 10 lze pozorovat na hmotnostním spektru v retenčním čase 7,20 minuty ionty o hodnotách m/z 528,046 o čtyřnásobném náboji, což odpovídá apidaecinu 1 (Obr. 18).



Obr. 18: Hmotnostní spektrum vzorku z larvy č. 10 v elučním čase 7,20 minuty. Šipkou vyznačen peak odpovídající $[M+4H]^{4+}$ iontu apidaecinu 1.

V detailu je možno pozorovat nejen $[M+4H]^{4+}$ ion o hodnotě m/z 527,8 odpovídající apidaecinu 1, ale také $[M+4H]^{4+}$ ion o m/z 530,3 což odpovídá $[^{13}C6^{15}N4]$ izotopově značenému apidaecinu (Obr. 19). U obou iontů lze pozorovat izotopovou obálku, což je signál více iontů stejné látky obsahujících různé množství těžších izotopů uhlíku.



Obr. 19: Detail hmotnostního spektra vzorku z larvy č. 10 v elučním čase 7,20 minuty. Jsou pozorovatelné jak peaky $[M+4H]^{4+}$ iontu apidaecinu 1, tak peaky $[M+4H]^{4+}$ iontu $[^{13}C6^{15}N4]$ izotopově značeného apidaecinu 1. Červenou šipkou vyznačen hlavní peak $[M+4H]^{4+}$ iontu apidaecinu 1, modrou šipkou vyznačen peak $[M+4H]^{4+}$ iontu $[^{13}C6^{15}N4]$ izotopově značeného apidaecinu 1.

Z porovnání chromatogramů a hmotnostních spekter z obou měření lze vyvodit, že pro spolehlivá měření je potřeba upravit postup přípravy vzorku tak, aby došlo k ochuzení směsi o interferující látky. Těmi mohou být molekuly sacharidů, lipidů, či dalších proteinů. Toho lze docílit mnoha způsoby. Jednou z možností je použití postupu dle Danihlíka et al. (2014), kdy je vzorek po lyofilizaci přečištěn pomocí iontoměničové chromatografie. Při té dochází k odstranění kyselých a neutrálních molekul, přičemž jsou jako poslední eluovány zásadité molekuly, mezi které AmP patří. Pro odstranění větších proteinů je možné využít precipitace pomocí 85% vychlazeného methanolu (Alam et al., 2000), nebo pomocí filtrů, či molekulových sít. Případného odstranění lipidů ze směsi lze docílit jejich extrakcí pomocí hexanu (Basha & Young, 1996).

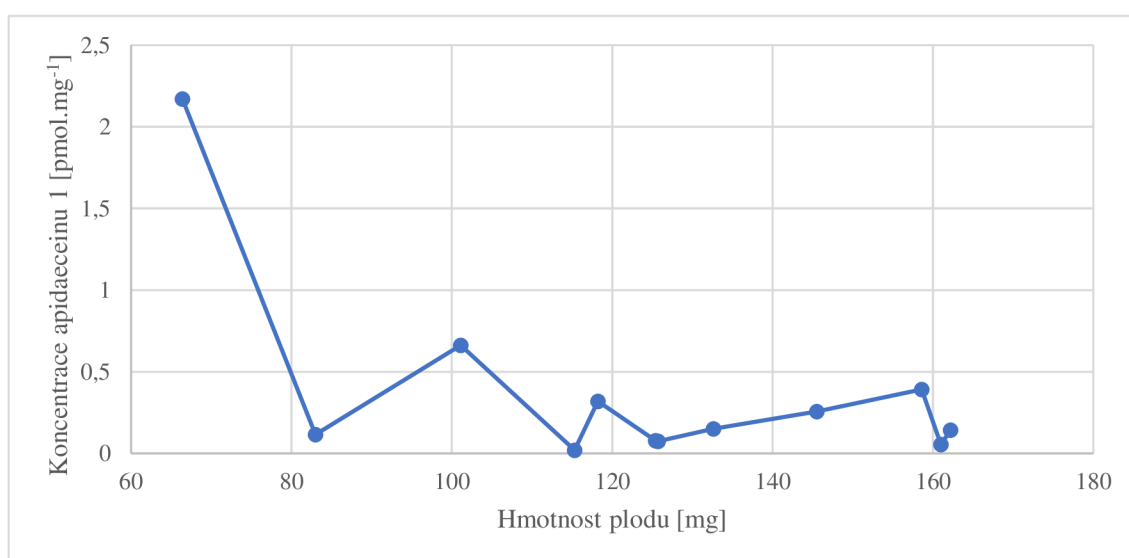
Pro kvantifikaci apidaecinu 1 byla po analýze dat vybrána pouze první sada měření. U této sady vzorků byly vyhodnoceny koncentrace apidaecinu 1 a jejich následné vztahy na hmotnost larvy. Z celé sady byla měřitelná koncentrace u 12 vzorků (Tab. 1).

Největší koncentrace apidaecinu 1 byla naměřena u larvy o hmotnosti 66,4 mg, která odpovídá stáří přibližně dvou dní od vylíhnutí. U zbytku larev již nepozorujeme taký výrazný rozdíl, dochází k oscilaci hodnot a není pozorovatelný žádný trend (Obr. 20). Nelze tedy pozorovat trend v koncentracích apidaecinu 1, ovšem je možné pozorovat určitý trend v detekci. Lze pozorovat více pozitivních měření u vzorků z larev, které jsou v posledních larválních stádiích, případně ve stádiu předkukly. To může souviset s metamorfózou, kterou včela jako hmyz s přeměnou dokonalou prochází. Dochází k přestavbě celého organismu a s ním i trávicí soustavy, jejíž mikrobiom může pro larvu představovat hrozbu (Johnston et al., 2019).

Detekce apidaecinu 1 v plodu včely medonosné pomocí hmotnostní spektrometrie zatím nebyla zveřejněna, ovšem jeho přítomnost v tkáních bylo možno předpokládat za skutečnosti, že u larev byla dokázána produkce zbylých tří AmP abaecinu, hymenoptaecinu a defensinu 1 (Randolt et al., 2008). Každý AmP sice zastává svou úlohu v boji proti infekci, velmi často jsou však produkovány pospolu a působí synergisticky proti patogenu.

Tabulka 1: Hmotnosti larev a naměřené koncentrace apidaecinu 1

Hmotnost larvy [mg]	Koncentrace apidaecinu 1 ve vzorku [nmol.l ⁻¹]	Hmotnost larvy [mg]	Koncentrace apidaecinu 1 ve vzorku [nmol.l ⁻¹]	Hmotnost larvy [mg]	Koncentrace apidaecinu 1 ve vzorku [nmol.l ⁻¹]
4,0	0	77,0	0	124,1	0
6,0	0	78,0	0	125,4	9,76
6,3	0	83,0	9,6	125,7	9,23
6,4	0	98,8	0	132,6	20,03
6,5	0	99,6	0	143,0	0
7,9	0	101,1	66,88	145,5	37,44
8,0	0	113,0	0	155,8	0
9,2	0	114,1	0	157,1	0
10,2	0	115,0	0	158,6	62,16
11,5	0	115,3	2,35	161,0	8,7
11,7	0	116,0	0	162,2	23,07
57,0	0	118,2	37,63	163,8	0
66,4	540,60	122,0	0	171,9	0
69,0	0	123,5	0	176,0	0



Obr. 20: Graf závislosti koncentrace apidaecinu 1 vztáženého na hmotnost larvy na hmotnosti larvy

5 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývá imunitou, antimikrobiálními peptidy a rozdíly v imunitních reakcích různých kast a vývojových stádií včely medonosné. Experimentální část se zabývá detekcí a kvantifikací antimikrobiálních peptidů produkovaných plodem včely medonosné. Bylo dosaženo těchto závěrů:

1. Byla vypracována literární rešerše na téma imunity hmyzu se zaměřením na včelu medonosnou, antimikrobiálních peptidy a rozdíly v imunitních reakcích mezi kastami a vývojovými stádii včely medonosné.
2. V experimentální části bakalářské práce bylo změřeno množství proteinu v extraktech z plodu včely medonosné. Největší koncentrace proteinů byla detekována u nejmladších larev.
3. Ve včelím plodu byly pomocí metody ELISA detekovány AmP abaecin, hymenoptaecin a defensin 1. Produkce těchto AmP byla zvýšena u starších larev, zatímco u stádia kukly byla snížena.
4. Ve včelím plodu byl detekován apidaecin 1 pomocí metody LC-MS. Metodika purifikace a kvantifikace apidaecinu 1 vyžaduje další optimalizaci, jelikož se v některých případech nepodařilo apidaecin 1 detekovat. To bylo způsobeno příliš komplexní směsí, která byla získána přípravou vzorku.
5. Pilotní výsledky kvantifikace apidaecinu 1 poukazují na jeho výskyt v tělech starších larev. Výsledky však musí být ověřeny optimalizovanou metodikou.
6. Byl proveden pokus o optimalizaci měření na LC-MS osminásobným zředěním příliš bohatých vzorků. Ani to však neumožnilo detekci apidaecinu 1.

Pro další výzkum tohoto tématu je třeba zaměřit se na optimalizaci přípravy vzorku za účelem ochuzení směsi o látky mimo zájem měření. Je potřeba zařadit do procesu purifikace metody, jako je iontoměničová chromatografie (Daníhlík et al., 2014), precipitace proteinů vychlazeným methanolem (Alam et al., 2000), nebo extrakce lipidů hexanem (Basha & Young, 1996). Dále je třeba provést více měření, která mohou poukázat na trendy, které může projevovat produkce AmP v plodu včely medonosné s větším zaměřením na stádium kukly.

6 LITERATURA

- Alam, M., Basha, S., & Boyd, L. (2000). Characterization of Methanol-Soluble and Methanol-Insoluble Proteins from Developing Peanut Seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5517-5521. <https://doi.org/10.1021/jf991337r>
- Albert, Š., Gätschenberger, H., Azzami, K., Gimple, O., Grimmer, G., Sumner, S., Fujiyuki, T., Tautz, J., & Mueller, M. (2011). Evidence of a novel immune responsive protein in the Hymenoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(12), 968-981. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.09.006>
- Aronstein, K., & Murray, K. (2010). Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S20-S29. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.018>
- Basha, S., & Young, C. (1996). Protein Fraction Producing Off-Flavor Headspace Volatiles in Peanut Seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(10), 3070-3074. <https://doi.org/10.1021/jf960033r>
- Belvin, M., & Anderson, K. (1996). A CONSERVED SIGNALING PATHWAY: The Drosophila Toll-Dorsal Pathway. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12(1), 393-416. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.12.1.393>
- Bíliková, K., & Šimúth, J. (2010). New Criterion for Evaluation of Honey: Quantification of Royal Jelly Protein Apalbumin 1 in Honey by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8776-8781. <https://doi.org/10.1021/jf101583s>
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Bull, J., Ryabov, E., Prince, G., Mead, A., Zhang, C., Baxter, L., Pell, J., Osborne, J., Chandler, D., & Schneider, D. (2012). A Strong Immune Response in Young Adult Honeybees Masks Their Increased Susceptibility to Infection Compared to Older Bees. *PLoS Pathogens*, 8(12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003083>
- Burciaga, R., Ruiz-Guzmán, G., Lanz-Mendoza, H., Krams, I., & Contreras-Garduño, J. (2023). The honey bees immune memory, 138. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2022.104528>
- Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., & Tempst, P. (1994). Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28569-28575. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)61943-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)61943-5)
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., & Tempst, P. (1993). Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7044-7054. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)53143-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)53143-4)
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., & Tempst, P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal*, 8(8), 2387-2391. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08368.x>
- Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., Damme, 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(2), 381-386. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15315.x>
- Danihlik, J., Aronstein, K., & Petřivalský, M. (2016). Antimicrobial peptides: a key component of honey bee innate immunity. *Journal of Apicultural Research*, 54(2), 123-136. <https://doi.org/10.1080/00218839.2015.1109919>

- Danihlík, J., Šebela, M., Petřivalský, M., & Lenobel, R. (2014). A sensitive quantification of the peptide apidaecin 1 isoforms in single bee tissues using a weak cation exchange pre-separation and nanocapillary liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1374*, 134-144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.041>
- Dostálková, S., Dobeš, P., Kunc, M., Hurychová, J., Škrabišová, M., Petřivalský, M., Titěra, D., Havlík, J., Hyršl, P., & Danihlík, J. (2020). Winter honeybee (*Apis mellifera*) populations show greater potential to induce immune response than summer ones after immune stimuli. *Journal of Experimental Biology*, *224*(3). <https://doi.org/10.1242/jeb.232595>
- Dziarski, R. (2004). Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Molecular Immunology*, *40*(12), 877-886. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.011>
- Evans, J., Aronstein, K., Chen, Y., Hetru, C., Imler, J., Jiang, H., Kanost, M., Thompson, G., Zou, Z., & Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, *15*(5), 645-656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>
- Evans, J. (2004). Transcriptional immune responses by honey bee larvae during invasion by the bacterial pathogen, *Paenibacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, *85*(2), 105-111. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.02.004>
- Fontana, R., Mendes, M., Souza, B., Konno, K., César, L., Malaspina, O., & Palma, M. (2004). Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*, *25*(6), 919-928. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.03.016>
- Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*, S5-S9. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.016>
- Fries, I., Granados, R., & Morse, R. (1992). Intracellular germination of spores of *Nosema apis*. *Z. Apidologie*, *23*(1), 61-70. <https://doi.org/10.1051/apido:19920107>
- Fries, I., Martín, R., Meana, A., García-Palencia, P., & Higes, M. (2015). Natural infections of *Nosema ceranae* in European honey bees. *Journal of Apicultural Research*, *45*(4), 230-233. <https://doi.org/10.1080/00218839.2006.11101355>
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., & Kobayashi, K. (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(19), 11333-11337. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)38596-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)38596-5)
- Fukuda, H., & Sekiguchi, K. (1966). Seasonal change of the honeybeeworker longevity in Sapporo, North Japan, with notes on some factors affecting the life-span. *Japanese Journal of Ecology*, *16*(5), 206-212. https://doi.org/10.18960/seitai.16.5_206
- Gábor, E., Cinege, G., Csordás, G., Török, T., Folkl-Medzihradzsky, K., Darula, Z., Andó, I., & Kurucz, É. (2017). Hemolymph expression reveals functional heterogeneity in honey bee (*Apis mellifera*) hemocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, *76*(41), 403-411. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.07.013>
- Gao, B., & Zhu, S. (2010). Characterization of a hymenoptaecin-like antimicrobial peptide in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Process Biochemistry*, *45*(2), 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.08.017>
- Gätschenberger, H., Azzami, K., Tautz, J., Beier, H., & Moser, M. (2013). Antibacterial Immune Competence of Honey Bees (*Apis mellifera*) Is Adapted to Different Life Stages and Environmental Risks. *PLoS ONE*, *8*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066415>
- Gätschenberger, H., Gimple, O., Tautz, J., & Beier, H. (2012). Honey bee drones maintain humoral immune competence throughout all life stages in the absence of vitellogenin production. *Journal of Experimental Biology*, *215*(8), 1313-1322. <https://doi.org/10.1242/jeb.065276>
- Genersch, E. (2010). American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*, S10-S19. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.06.015>

- Ghosh, S., Jung, C., & Meyer-Rochow, V. (2016). Nutritional value and chemical composition of larvae, pupae, and adults of worker honey bee, *Apis mellifera ligustica* as a sustainable food source. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 19(2), 487-495. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2016.03.008>
- Gillespie and, J., Kanost, M., & Trenczek, T. (1997). BIOLOGICAL MEDIATORS OF INSECT IMMUNITY. *Annual Review of Entomology*, 42(1), 611-643. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.611>
- Heinrich, B., & Esch, H. (1994). Thermoregulation in Bees. *American Scientist*, 82(2), 164-170. <http://www.jstor.org/stable/29775151>
- Heinrikson, R., & Meredith, S. (1984). Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, 136(1), 65-74. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90307-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90307-5)
- Higes, M., Martín-Hernández, R., Garrido-Bailón, E., González-Porto, A., García-Palencia, P., Meana, A., del Nozal, M., Mayo, R., & Bernal, J. (2009). Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *Environmental Microbiology Reports*, 1(2), 110-113. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00014.x>
- Highfield, A., El Nagar, A., Mackinder, L., Noël, L., Hall, M., Martin, S., & Schroeder, D. (2009). Deformed Wing Virus Implicated in Overwintering Honeybee Colony Losses. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(22), 7212-7220. <https://doi.org/10.1128/AEM.02227-09>
- Huang, H., Du, J., Li, S., & Gong, T. (2021). Identification and Functional Analysis of a Lysozyme Gene from *Coridius chinensis* (Hemiptera: Dinidoridae). *Biology*, 10(4), 330. <https://doi.org/10.3390/biology10040330>
- Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J., Forsgren, E., Fries, I., Hatjina, F., Hu, F., Jaffé, R., Jensen, A., Köhler, A., Magyar, J., Özkýrým, A., Pirk, C., Rose, R., Strauss, U., Tanner, G., Tarpay, D. et al. (2015). Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 52(4), 1-53. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.10>
- Hystad, E., Salmela, H., Amdam, G., Münch, D., & Lee, B. (2017). Hemocyte-mediated phagocytosis differs between honey bee (*Apis mellifera*) worker castes. *PLOS ONE*, 12(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184108>
- Chen, Y., Evans, J., & Feldlaufer, M. (2006). Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 92(3), 152-159. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.03.010>
- Chen, Y., & Siede, R. (2007). Honey Bee Viruses. *Advances in Virus Research Volume 70*, 33-80. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(07\)70002-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(07)70002-7)
- Ilyasov, R., Gaifullina, L., Saltykova, E., Poskryakov, A., & Nikolaenko, A. (2013). Defensins in the honeybee antiinfectious protection. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 49(1), 1-9. <https://doi.org/10.1134/S0022093013010015>
- Jin, F., Sun, Q., Xu, X., Li, L., Gao, G., Xu, Y., Yu, X., & Ren, S. (2012). cDNA cloning and characterization of the antibacterial peptide cecropin 1 from the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. *Protein Expression and Purification*, 85(2), 230-238. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.08.006>
- Johnston, P., Paris, V., & Rolff, J. (2019). Immune gene regulation in the gut during metamorphosis in a holo- versus a hemimetabolous insect. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1783). <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0073>
- Kaneko, T., Goldman, W., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S., Harley, W., Fox, A., Golenbock, D., & Silverman, N. (2004). Monomeric and Polymeric Gram-Negative Peptidoglycan but Not Purified LPS Stimulate the *Drosophila* IMD Pathway. *Immunity*, 20(5), 637-649. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00104-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00104-9)

- Klee, J., Besana, A., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D., Chinh, T., Puerta, F., Ruz, J., Kryger, P., Message, D., Hatjina, F., Korpela, S., Fries, I., & Paxton, R. (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *96*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2007.02.014>
- Kragol, G., Lovas, S., Varadi, G., Condie, B., Hoffmann, R., & Otvos, L. (2001). The Antibacterial Peptide Pyrrhocoricin Inhibits the ATPase Actions of DnaK and Prevents Chaperone-Assisted Protein Folding. *Biochemistry*, *40*(10), 3016-3026. <https://doi.org/10.1021/bi002656a>
- Kunc, M., Dobeš, P., Hurychová, J., Vojtek, L., Poiani, S., Danihlík, J., Havlík, J., Titěra, D., & Hyršl, P. (2019). The Year of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) with Respect to Its Physiology and Immunity: A Search for Biochemical Markers of Longevity. *Insects*, *10*(8). <https://doi.org/10.3390/insects10080244>
- Kurze, C., Routtu, J., & Moritz, R. (2016). Parasite resistance and tolerance in honeybees at the individual and social level. *Zoology*, *119*(4), 290-297. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2016.03.007>
- Laughton, A., Boots, M., & Siva-Jothy, M. (2011). The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology*, *57*(7), 1023-1032. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.04.020>
- Lehane, M. (1997). PERITROPHIC MATRIX STRUCTURE AND FUNCTION. *Annual Review of Entomology*, *42*(1), 525-550. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.525>
- Lemaitre, B., & Hoffmann, J. (2007). The Host Defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual Review of Immunology*, *25*(1), 697-743. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141615>
- Levin, D., Breuer, L., Zhuang, S., Anderson, S., Nardi, J., & Kanost, M. (2005). A hemocyte-specific integrin required for hemocytic encapsulation in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *35*(5), 369-380. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.003>
- Lima, P., & Brochetto-Braga, M. (2003). Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, *9*(2). <https://doi.org/10.1590/S1678-91992003000200002>
- Lindström, A., Korpela, S., & Fries, I. (2008). The distribution of *Paenibacillus* larvae spores in adult bees and honey and larval mortality, following the addition of American foulbrood diseased brood or spore-contaminated honey in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Journal of Invertebrate Pathology*, *99*(1), 82-86. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.06.010>
- Li, W., Ma, G., & Zhou, X. (2006). Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure–function relationships and mode of action. *Peptides*, *27*(9), 2350-2359. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.03.016>
- Marringa, W., Krueger, M., Burritt, N., Burritt, J., & Amdam, G. (2014). Honey Bee Hemocyte Profiling by Flow Cytometry. *PLoS ONE*, *9*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108486>
- Mattila, H., Harris, J., & Otis, G. (2001). Timing of production of winter bees in honey bee (*Apis mellifera*) colonies. *Insectes Sociaux*, *48*(2), 88-93. <https://doi.org/10.1007/PL00001764>
- Memariani, H., Memariani, M., Shahidi-Dadras, M., Nasiri, S., Akhavan, M., & Moravvej, H. (2019). Melittin: from honeybees to superbugs. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *103*(8), 3265-3276. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09698-y>
- Nakhleh, J., El Moussawi, L., & Osta, M. (2017). The Melanization Response in Insect Immunity. *Insect Immunity*, 83-109. <https://doi.org/10.1016/bs.aiip.2016.11.002>

- Nappi, A., & Christensen, B. (2005). Melanogenesis and associated cytotoxic reactions: Applications to insect innate immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(5), 443-459. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.01.014>
- Nappi, A., & Vass, E. (1993). Melanogenesis and the Generation of Cytotoxic Molecules During Insect Cellular Immune Reactions. *Pigment Cell Research*, 6(3), 117-126. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.1993.tb00590.x>
- Nardi, J., Pilas, B., Bee, C., Zhuang, S., Garsha, K., & Kanost, M. (2006). Neuroglial-positive plasmatocytes of *Manduca sexta* and the initiation of hemocyte attachment to foreign surfaces, 30(5), 447-462. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2005.06.026>
- Negri, P., Maggi, M., Szawarski, N., Lamattina, L., & Eguaras, M. (2015). *Apis mellifera* haemocytes in-vitro , What type of cells are they? Functional analysis before and after pupal metamorphosis. *Journal of Apicultural Research*, 53(5), 576-589. <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.53.5.11>
- Otvos, L. (2000). Antibacterial Peptides Isolated from Insects. *Journal of Peptide Science*, 6(10), 497-511. [https://doi.org/10.1002/1099-1387\(200010\)6:10<497:AID-PSC277>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/1099-1387(200010)6:10<497:AID-PSC277>3.0.CO;2-W)
- Pan, X., Zhou, G., Wu, J., Bian, G., Lu, P., Raikhel, A., & Xi, Z. (2012). Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1). <https://doi.org/10.1073/pnas.1116932108>
- Picoli, T., Peter, C., Zani, J., Waller, S., Lopes, M., Boesche, K., Vargas, G., Hübner, S., & Fischer, G. (2017). Melittin and its potential in the destruction and inhibition of the biofilm formation by *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from bovine milk. *Microbial Pathogenesis*, 112, 57-62. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.09.046>
- Pusceddu, M., Annoscia, D., Floris, I., Frizzera, D., Zanni, V., Angioni, A., Satta, A., & Nazzi, F. (2021). Honeybees use propolis as a natural pesticide against their major ectoparasite. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 288(1965). <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.2101>
- Rahnamaeian, M., Cytryńska, M., Zdybicka-Barabas, A., & Vilcinskas, A. (2016). The functional interaction between abaecin and pore-forming peptides indicates a general mechanism of antibacterial potentiation. *Peptides*, 78, 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2016.01.016>
- Ramsey, S., Ochoa, R., Bauchan, G., Gulbranson, C., Mowery, J., Cohen, A., Lim, D., Joklik, J., Cicero, J., Ellis, J., Hawthorne, D., & vanEngelsdorp, D. (2019). *Varroa destructor* feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(5), 1792-1801. <https://doi.org/10.1073/pnas.1818371116>
- Randolt, K., Gimple, O., Geissendörfer, J., Reinders, J., Prusko, C., Mueller, M., Albert, S., Tautz, J., & Beier, H. (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(4), 155-167. <https://doi.org/10.1002/arch.20269>
- Richardson, R., Ballinger, M., Qian, F., Christman, J., & Johnson, R. (2018). Morphological and functional characterization of honey bee, *Apis mellifera*, hemocyte cell communities. *Apidologie*, 49(3), 397-410. <https://doi.org/10.1007/s13592-018-0566-2>
- Romanelli, A., Moggio, L., Montella, R., Campiglia, P., Iannaccone, M., Capuano, F., Pedone, C., & Capparelli, R. (2011). Peptides from Royal Jelly: studies on the antimicrobial activity of jelleins, jelleins analogs and synergy with temporins. *Journal of Peptide Science*, 17(5), 348-352. <https://doi.org/10.1002/psc.1316>
- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, S96-S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>

- Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *103*, S96-S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>
- Seeley, T., & Morse, R. (1976). The nest of the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Insectes Sociaux*, *23*(4), 495-512. <https://doi.org/10.1007/BF02223477>
- Shrestha, S., & Kim, Y. (2008). Eicosanoids mediate prophenoloxidase release from oenocytoids in the beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, *38*(1), 99-112. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2007.09.013>
- Schlüns, H., & Crozier, R. (2007). Relish regulates expression of antimicrobial peptide genes in the honeybee, *Apis mellifera*, shown by RNA interference. *Insect Molecular Biology*, *16*(6), 753-759. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00768.x>
- Schmid, M., Brockmann, A., Pirk, C., Stanley, D., & Tautz, J. (2008). Adult honeybees (*Apis mellifera* L.) abandon hemocytic, but not phenoloxidase-based immunity. *Journal of Insect Physiology*, *54*(2), 439-444. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2007.11.002>
- Simone-Finstrom, M., Borba, R., Wilson, M., & Spivak, M. (2017). Propolis Counteracts Some Threats to Honey Bee Health. *Insects*, *8*(2). <https://doi.org/10.3390/insects8020046>
- Stanley, D., Miller, J., & Tunaz, H. (2009). Eicosanoid Actions in Insect Immunity. *Journal of Innate Immunity*, *1*(4), 282-290. <https://doi.org/10.1159/000210371>
- Starks, P., Blackie, C., & Seeley, T. (2000). Fever in honeybee colonies. *Naturwissenschaften*, *87*(5), 229-231. <https://doi.org/10.1007/s001140050709>
- Strand, M. (2008). The insect cellular immune response. *Insect Science*, *15*(1), 1-14. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2008.00183.x>
- The Honey Bee Genome Sequencing Consortium. (2006). Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, *443*(7114), 931-949. <https://doi.org/10.1038/nature05260>
- Tokura, A., Fu, G., Sakamoto, M., Endo, H., Tanaka, S., Kikuta, S., Tabunoki, H., & Sato, R. (2014). Factors functioning in nodule melanization of insects and their mechanisms of accumulation in nodules. *Journal of Insect Physiology*, *60*, 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2013.11.003>
- Vandame, R., Morand, S., Colin, M., & Belzunces, L. (2002). Parasitism in the social bee *Apis mellifera*: quantifying costs and benefits of behavioral resistance to *Varroa destructor* mites. *Apidologie*, *33*(5), 433-445. <https://doi.org/10.1051/apido:2002025>
- Veselý, V. (2003). *Včelařství* (2.). Brázda.
- Vincent, J., & Wegst, U. (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle, *33*(3), 187-199. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2004.05.006>
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., & Hultmark, D. (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(25), 13772-13777. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.25.13772>
- Wilson-Rich, N., Dres, S., & Starks, P. (2008). The ontogeny of immunity: Development of innate immune strength in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Insect Physiology*, *54*(10-11), 1392-1399. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.07.016>
- Wilson, W. (1971). Resistance to American foulbrood in honey bees. XI. *Journal of Invertebrate Pathology*, *17*(2), 247-255. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(71\)90099-1](https://doi.org/10.1016/0022-2011(71)90099-1)
- Wimley, W., & Hristova, K. (2011). Antimicrobial Peptides: Successes, Challenges and Unanswered Questions. *The Journal of Membrane Biology*, *239*(1-2), 27-34. <https://doi.org/10.1007/s00232-011-9343-0>
- Zhou, X., Li, W., & Pan, Y. (2008). Functional and structural characterization of apidaecin and its N-terminal and C-terminal fragments. *Journal of Peptide Science*, *14*(6), 697-707. <https://doi.org/10.1002/psc.976>

7 SEZNAM ZKRATEK

ABPV	virus akutní paralýzy včel
AmP	antimikrobiální peptid
BQCV	virus černání matečníků
DD	death domain
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DWV	virus deformovaných křídel
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ESI	elektrosprejová ionizace
FA	kyselina mravenčí
GNBP	protein vážící se na Gram-negativní bakterie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC-MS	hmotnostní spektrometrie navazující na kapalinovou chromatografii
MCD	degranulující žírné buňky
mRNA	messengerová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
PCR	polymerasová řetězová reakce
PO	fenoloxidasa
PG	peptidoglykan
PGRP	proteiny rozpoznávající peptidoglykany
PGRP-L	dlouhé proteiny rozpoznávající peptidoglykany
PGRP-S	krátké proteiny rozpoznávající peptidoglykany
proPO	profenoloxidasa
PRPs	peptidy bohaté na prolin
ROS	reaktivní formy kyslíku
SBV	virus pytlíčkovitého plodu
TFA	trifluoroctová kyselina
TMB	3,3',5,5'-tetramethylbenzidin dichlorid