

# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Porovnání ionizačních metod pro analýzu peptidu apidaecinu ve spojení s hmotnostně spektrometrickými metodami ve tkáních včel

### BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	<b>Jakub Savara</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. René Lenobel, Ph.D.</b>
Rok:	2015

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval 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 jsem seznámen 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 bakaláře*

Rád bych poděkoval svému vedoucímu práce Mgr. Renému Lenobelovi, Ph.D. za věnovaný čas, trpělivost a cenné připomínky při psaní této bakalářské práce.

Poděkování patří také Mgr. Jiřímu Danihlíkovi za všestrannou pomoc a věnovaný čas.

V neposlední řadě bych rád poděkoval Katedře biochemie za vstřícný přístup během mého studia.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jakub Savara
Název práce	Porovnání ionizačních metod pro analýzu peptidu apidaecinu ve spojení s hmotnostně spektrometrickými metodami ve tkáních včel.
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. René Lenobel, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015

### Abstrakt

Antimikrobiální peptidy jsou velmi důležitou součástí humorální imunity živočichů včetně hmyzu. Jedním z významných antimikrobiálních peptidů včel (*Apis mellifera*) je peptid apidaecin, který se vyskytuje v jejich hemolymfě a tkáních. Apidaeciny jsou lineární peptidy bohaté na prolin vykazující aktivitu vůči Gram-negativním bakteriím. Cílem práce bylo ověřit možnost kvantifikace apidaecinu 1 ve spojení s MALDI ionizací a analyzátořem doby letu (TOF), což by umožnilo výrazně rychlejší a levnější hmotnostně-spektrometrickou analýzu velkého množství vzorků včel. Praktická část práce byla zaměřena na purifikaci a kvantifikaci apidaecinu 1 pomocí extrakce na pevné fázi se sorbentem WCX Oasis<sup>TM</sup>, následované odsolením na C<sub>8</sub> reverzní fázi a kvantifikací pomocí MALDI-TOF. Naměřená data ukázala, že lze dosáhnout lineární kalibrační závislosti poměru signálů apidaecinu 1 versus vhodný isotopově značený interní standard [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>] apidaecin 1 a to v rozsahu 0,1 – 2,5 pmol apidaecinu 1 v různých biologických matricích (hemolymfa včel, homogenáty hrudníků). Dále byla pozorována výborná reprodukovatelnost stanovení poměru signálů při MALDI ionizaci vzorků analyzovaných z jednoho spotu i z různých spotů na MALDI desce. První kvantitativní data získaná analýzou reálných vzorků s přidávkou standardu apidaecinu 1 ukázala dobrou návratnost stanovení peptidu v rozsahu 80-100 % s výbornou správností pohybující se v rozsahu 6-15 % v závislosti na množství přidaného apidaecinu 1. Srovnávací analýza kvantifikace apidaecinu 1 ve vzorcích pomocí MALDI-TOF a LC-ESI-MS analýzy ukázala srovnatelnou schopnost správného stanovení studovaného peptidu v reálném vzorku, nicméně pro potvrzení této možnosti je třeba provést analýzu většího počtu vzorků.

Klíčová slova apidaecin, antimikrobiální peptidy, včela medonosná,

humorální imunita, MALDI-TOF

Počet stran

46

Počet příloh

0

Jazyk

Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and Jakub Savara

Suriname

Title Comparison of ionization methods for analysis of apidaecin peptide with mass spectrometric techniques in bee tissues

Type of thesis Bachelor

Department Department of biochemistry

Supervisor Mgr. René Lenobel, Ph.D.

The year of presentation 2015

Abstract

Antimicrobial peptides are an important part of humoral immunity of the animals, including insects. Apidaecin is one of the significant antimicrobial peptides, which occurs in the hemolymph and tissues of the honey bee (*Apis mellifera*). Apidaecins are linear proline-rich peptides with activity against Gram-negative bacteria. The main aim of this thesis was to verify the possibility of quantifying of apidaecins in conjunction with MALDI ionization and time of flight (TOF) analyzer, which would allow significantly faster and cheaper mass spectrometry analysis of many bee samples. The practical part was focused on the purification and quantification of apidaecins 1 using solid phase extraction with the WCX Oasis<sup>TM</sup> sorbent, followed by desalting on C8 reverse phase and quantification by MALDI-TOF. The measured data showed that it is possible to achieve a linear calibration curve ratio of signals of apidaecin 1 versus an appropriate isotopically labeled internal standard [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>] apidaecin 1 in the range of 0.1 to 2.5 pmol of apidaecin 1 in different biological matrices (bee hemolymph, homogenates of thoraxes). It was also observed excellent reproducibility determining the ratio of signals during MALDI ionization of samples analyzed on one spot and between different spots on a MALDI plate. First quantitative data obtained from the analysis of real samples spiked with apidaecin 1 standard showed a good recovery of the peptide in the range 80-100% with an excellent accuracy ranging from 6 to 15% depending on the amount of added apidaecin 1. Comparative analysis of quantification apidaecin 1 in samples by MALDI-TOF and LC-ESI-MS analysis showed the ability to correct estimation of the studied peptide in a real sample, however, to confirm this possibility is necessary to analyze a larger

number of samples.

Keywords	apidaecin, antimicrobial peptides, honey bee, humoral immunity, MALDI-TOF
Number of pages	46
Number of appendices	0
Language	Czech

## Obsah

Cíle práce .....	10
1 Úvod.....	11
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	12
2.1 Antimikrobiální peptidy .....	12
2.1.1 Mechanismus působení kationických AMP.....	15
2.1.2 Mechanismus působení apidaecinu.....	15
2.2 Imunita včel.....	17
2.2.1 Signální dráhy imunitní reakce .....	18
2.3 Metody izolace a purifikace peptidů a proteinů .....	19
2.3.1 Příprava a stabilita vzorku.....	19
2.3.2 Srážení proteinů (PP) .....	19
2.3.3 Extrakce na pevné fázi (SPE).....	19
2.4 Metody identifikace a kvantifikace peptidů a proteinů se zaměřením na hmotnostní spektrometrii .....	23
2.4.1 Princip a instrumentace MS .....	23
2.4.2 Způsoby ionizace .....	23
2.4.3 Kvantitativní hmotnostní spektrometrie.....	24
2.5 Metody a způsoby stanovení apidaecinu ve včelách.....	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	27
3.1 Materiál .....	27
3.1.1 Chemikálie .....	27
3.1.2 Biologický materiál.....	27
3.1.3 Přístroje .....	27
3.2 Metody.....	28
3.2.1 Izolace peptidů s použitím WCX SPE mikrokolonek.....	28
3.2.2 Odsolení peptidů pomocí C8 disků metodou StageTip .....	28
3.2.3 Příprava roztoků standardu .....	29



3.2.4	Příprava vzorků z hrudníku včel .....	29
3.2.5	Příprava vzorků hemolymfy z mladých a dospělých včel .....	29
3.2.6	Příprava hovězího sérového albuminu (BSA).....	30
3.3	MALDI-TOF MS analýza .....	31
4	Výsledky a diskuze .....	33
4.1	Rozdíly ionizace MALDI vs ESI pro apidaeciny 1 .....	33
4.2	Opakovatelnost odezvy signálů peptidů při MALDI ionizaci.....	34
4.2.1	Spektra z jednoho spotu .....	34
4.2.2	Spektra z různých spotů .....	34
4.3	Kalibrační závislost apidaecinu (vlastnosti, reprodukovatelnost).....	36
4.4	Kvantitativní analýza apidaecin 1 peptidů ve vzorcích pomocí MALDI-TOF 39	
5	Závěr .....	42
6	Literatura .....	43

## **Cíle práce**

- Vypracování literární rešerše zaměřené na fyziologický význam peptidu apidaecinu a dalších antimikrobiálních peptidů včel, dále na metody purifikace proteinů a peptidů pomocí extrakčních technik založených na SPE nosičích a kvantifikaci vyizolovaných peptidů pomocí hmotnostní spektrometrie ve spojení s různými typy ionizace.
- Praktická část bude věnována základním biochemickým metodám (extrakce proteinů a peptidů, kvantifikace proteinů), následované metodami izolace peptidů pomocí SPE technik se zaměřením na iontoměničovou a reverzní chromatografii. Vyizolované peptidy budou analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie s různými technikami ionizace, přičemž student bude seznámen a provede analýzu peptidů pomocí MALDI ionizace ve spojení s TOF-MS přístrojem.
- Cílem bakalářské práce je ověření možnosti aplikace MALDI-TOF spektrometrie při semikvantitativním hodnocení hladin apidaecinu v tkáních včel. Součástí bakalářské práce je také zvládnutí purifikačního postupu založeném na iontoměničové chromatografii následované odsolením vzorku na reverzní fázi.

## 1 Úvod

Antimikrobiální peptidy patří mezi velmi důležitou součást humorální imunity živočichů, protože dokážou inhibovat růst patogenních mikroorganismů v těle hostitele. Mnoho mikroorganismů si vyvinulo rezistenci vůči běžně používaným antibiotikům, a tak je velmi důležité další studium těchto peptidů.

Včelstva jsou ohrožována různými chorobami a na mnoho z nich dosud nebyla nalezena účinná léčba (např. mor včelího plodu). V mnoha případech se nesmí využívat antibiotik (fumagilin, tetracyklin) nebo jiných syntetických látek (amitraz, kumafos), které by potenciálně mohly ohrozit kvalitu včelích produktů. Využití antimikrobiálních peptidů, které jsou nedílnou součástí imunitního systému hmyzu, by mohlo být pro tyto účely mnohem více žádoucí.

V posledních letech početnost včelstev celosvětově klesá, což způsobuje škody nejen včelařům, ale i zemědělcům, protože včely jsou přirozenými opylovači většiny hospodářsky důležitých plodin.

Vývoj moderních laboratorních technik by mohl pomoci lépe porozumět fungování imunity včel a přinést nové poznatky, které by se daly následně použít ve vývoji např. nových léčiv na bázi antimikrobiálních peptidů.

Tato bakalářská práce pojednává o možnosti využití MALDI hmotnostní spektrometrie pro kvantifikaci antimikrobiálního peptidu apidaecinu, který se přirozeně vyskytuje ve tkáních včel.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Antimikrobiální peptidy

Dosud bylo izolováno a popsáno přes 1500 antimikrobiálních peptidů, z toho přes 200 u hmyzu (Guaní-Guerra *et al.*, 2009). Existuje několik skupin antimikrobiálních peptidů (AMP) – kationické, anionické, aromatické dipeptidy a deriváty proteinů vázící kyslík. Nejpočetnější skupinou jsou kationické peptidy, které se dále dělí: lineární peptidy tvořící  $\alpha$ -helix, peptidy s otevřenými konci bohaté na cystein obsahující disulfidové můstky a peptidy bohaté na specifickou aminokyselinu – prolin, glycin nebo histidin (Vizioli *et al.*, 2002). Kationické AMP jsou většinou definovány jako peptidy mající méně než 50 aminokyselin (AMK) s celkovým pozitivním nábojem (+2 až +9), způsobeným přítomností lysinu a argininu a značným (více než 50%) obsahem hydrofobních AMK (Powers a Hancock, 2003). Tyto peptidy vykazují aktivitu vůči Gram-pozitivním (G+) a Gram-negativním (G-) bakteriím, virům i houbám (Cooper, 2006). U včel byly popsány tyto antimikrobiální peptidy: defensin-1 a defensin-2 (Klaudiny *et al.*, 2005), abaecin, apidaeciny, hymenoptaecin (Casteels *et al.*, 1989, 1990, 1993), jelleiny (Fontana *et al.*, 2004), melittin (Fennell *et al.*, 1968) a apamin (Vincent *et al.*, 1975), viz. tab. 2.

Apidaeciny představují rodinu na prolin bohatých AMP izolovaných z hemolymfy včely medonosné (*Apis mellifera*) v koncentraci okolo 100 ng/ $\mu$ l. Primární struktura je tvořena 18 AMK a jedná se o tepelně stabilní lineární peptidy (Casteels *et al.*, 1989). Ve včelí hemolymfě se vyskytují 3 isoformy apidaecinu v zastoupení: 1a (5%), 1b (80 – 90%) a 2 (5 – 15%). Poslední isoforma apidaecinu (Q06602, UniProt) je pouze predikovaným peptidem a ve tkáních včel nebyl detekován (Casteels *et al.*, 1993). Apidaecin 1 a 2 se liší v poloze 6 (Val/Ile) a analýzou peptidu apidaecinu 1 bylo zjištěno, že se vyskytují 2 isoformy 1a a 1b lišící se v poloze 18 (Ile/Leu) (Casteels *et al.*, 1989). Apidaeciny jsou převážně aktivní proti mnoha Gram-negativním bakteriím (Li *et al.*, 2006). Koncentrace 0,1  $\mu$ g/ml byla dostatečná k inhibici růstu širokého spektra lidských a zvířecích patogenů (rody *Salmonella* a *Shigella*), dále byly vysoce aktivní proti několika rostlinným bakteriím (druhy *Rhizobium* a *Agrobacterium*) a patogenním rostlinným bakteriím patřícím do rodů *Erwinia* a *Pseudomonas*, a to prostřednictvím bakteriostatického (nikoli lytického) účinku (Casteels *et al.*, 1989). Přidání 100  $\mu$ g syntetických apidaecinů k suspenzi 1 ml buněk *E. coli* mělo za následek 100% inhibici růstu *E. coli*. Vůči typickým

hmyzím patogenům (druhy *Bacillus thuringiensis*, *Serratia marcescens* a *Paenibacillus larvae*) byly apidaeciny neúčinné (Casteels *et al.*, 1989). Zatímco aktivní apidaeciny jsou zjistitelné pouze v hemolymfě u dospělých včel, larvy obsahují značné množství molekul prekurzorů, které nevykazují žádnou antimikrobiální aktivitu. Prekurzory apidaecinů obsahují navíc 8 AMK (EAKPEAKP-apidaecin I), které musí být odštěpeny pro aktivaci peptidu (Casteels *et al.*, 1989; Kreil *et al.*, 1980). Výsledky analýzy cDNA korespondují se zastoupením jednotlivých peptidů v hemolymfě včel (Casteels-Josson *et al.*, 1993).

Tab. 1 Přehled isoform apidaecinu a jejich AMK sekvence (Casteels *et al.*, 1989)

Isoformy apidaecinu	Aminokyselinová sekvence
Apidaecin 1a	GNNRPVYIPQPRPPHPRI
Apidaecin 1b	GNNRPVYIPQPRPPHPRL
Apidaecin 2	GNNRPIYIPQPRPPHPRL
Apidaecin (predikovaná forma)	GNNRPVYISQPRPPHPRL

Strukturně se apidaeciny skládají ze dvou částí - konzervativní (C-koncovou část) zodpovědnou za celkové antibakteriální schopnosti a variabilní (N-koncovou část) zodpovědnou za antibakteriální spektrum (Li *et al.*, 2006). Dutta *et al.* (2008) uvádí, že odstranění prvních tří AMK z N-konce peptidu nezpůsobilo významný pokles aktivity, zatímco odstranění leucinu z C-konce zapříčinilo pokles aktivity pod 50%, což znamená, že koncový leucin je velmi důležitý pro antibakteriální aktivitu peptidu.

Abaecin patří do rodiny AMP bohatých na prolin. Tento antimikrobiální peptid obsahuje téměř 30 % prolinu. Prekurzor abaecinu obsahuje 53 AMK a po aktivaci se 19 AMK dlouhý prekurzor z N-konce odštěpí (Casteels *et al.*, 1990; Casteels-Josson *et al.*, 1994).

Defensiny jsou rozsáhlá rodina AMP bohatých na cystein, které působí proti různým mikroorganismům a představují základní obranný systém mnoha organismů (Raj a Dentino, 2002). Jedná se o peptidy dlouhé 36-51 AMK, jejichž struktura je tvořena smyčkou z  $\alpha$ -helixu a dvěma antiparalelními  $\beta$ -skládanými listy stabilizovanými třemi disulfidovými můstky. Jsou aktivní hlavně proti širokému spektru grampozitivních bakterií, ačkoliv aktivita byla zaznamenána i u gramnegativních bakterií a hub. U včel byly popsány dva geny kódující defensiny – defensin1 a defensin2. Defensin1 se vyskytuje v hemolymfě bakteriálně napadených

včel (Klaudiny *et al.*, 2005) a také mateří kašičce, kde se označuje jako royalisin (Fujiwara *et al.*, 1990).

Primární struktura defensin1 obsahuje 51 AMK se třemi intramolekulárními disulfidovými můstky, mající molekulovou hmotnost 5523 Da (Fujiwara *et al.*, 1990). Defensin2 dosud nebyl detekován na úrovni peptidu, jedná se pouze o predikovanou sekvenci druhé isoformy antimikrobiálního peptidu (Klaudiny *et al.*, 2005).

Hymenoptaecin je dalším z AMP včel skládající se z 93 AMK a detailní analýza odhalila, že jeho N-konec obsahuje 2-pyrrolidon-5-karboxylovou kyselinu a také indikovala velké rozdíly oproti všem známým antimikrobiálním peptidům. Zatímco apidaeciny jsou aktivní pouze proti G- bakteriím, hymenoptaecin inhibuje růst jak u G-, tak u G+ bakterií (Casteels *et al.*, 1993).

Tab. 2 Přehled dalších AMP včel a jejich vlastností (Casteels *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1993; Casteels-Josson *et al.*, 1994; Klaudiny *et al.*, 2005; Fontana *et al.*, 2004; Fennell *et al.*, 1968; Vincent *et al.*, 1975)

Název AMP	Počet AMK	Sekvence AMK	Účinnost na skupiny bakterií	Číslo v databázi UniProt
Abaecin	34	YVPLPNVPQGRPFPTFP GQGPFNPKIKWPQGY	G+	P15450
Defensin1	51	VTCDLLSFKGQVNSACA ANCLSLGKAGGHCEKVGC ICRKTSFKDLWDKRF	Především G+	P17722
Hymenoptaecin	93	EERGSIVIQGTKEGKSRPSL DIDYKQRVYDKNGMTGD AYGGLNIRPGQPSRQHAGF EFGKEYKNGFIKGQSEVQR GPGGRLSPYFGINGGFRF	G+ i G-	Q10416
Jelleiny	8-9	PFKISIH; TPFKISIH; EPKISIH; TPFKISIH	G+ i G-	O18330

Tab. 2 Přehled dalších AMP včel a jejich vlastností (Casteels *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1993; Casteels-Josson *et al.*, 1994; Klaudiny *et al.*, 2005; Fontana *et al.*, 2004; Fennell *et al.*, 1968; Vincent *et al.*, 1975) (pokračování)

Název AMP	Počet AMK	Sekvence AMK	Účinnost na skupiny bakterií	Číslo v databázi UniProt
Apamin	46	MISMLRCIYLFLSVILITSY FVTPVMPNCNKAPETALC ARRCQQHG	G+ i G-	P01500
Melittin	70	MKFLVNVALVFMVYISY IYAAPEPEPEPEAEADA EADPEAGIGAVLKVLTGL PALISWIKRKRQQG	G+ i G-	P01501

### 2.1.1 Mechanismus působení kationických AMP

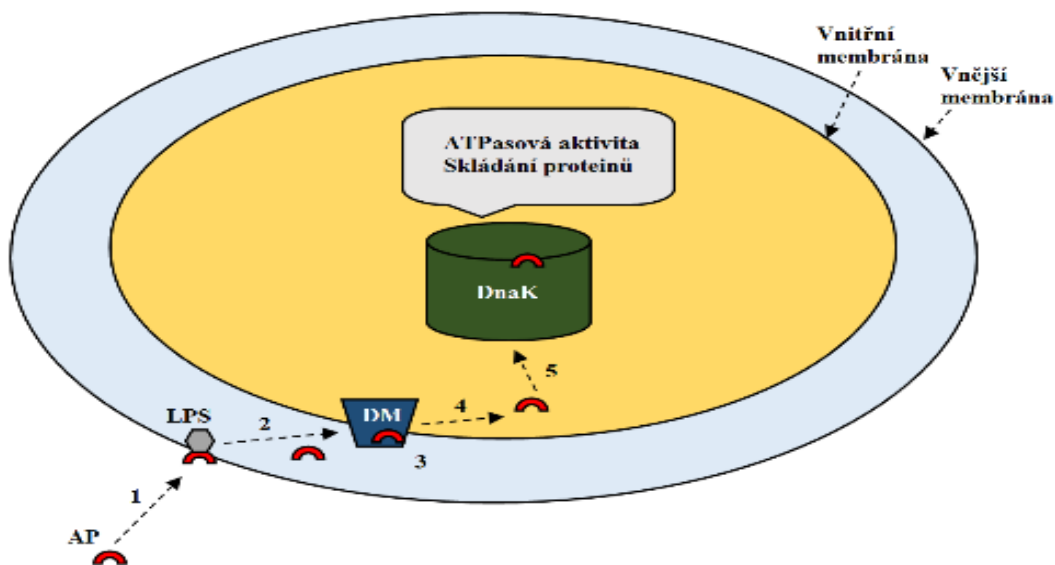
Prvním krokem v mechanismu působení AMP je elektrostatická interakce mezi kladně nabitým peptidem a záporně nabitými složkami membrány patogenu (Matsuzaki *et al.*, 1997). Bakteriální membrána může být narušena několika způsoby – fatální depolarizací membrány, vytvořením selektivních kanálů a ztráty buněčného obsahu, aktivací hydrolas buněčné stěny mající za následek destrukci buňky nebo průnikem některých peptidů až k vnitrobuněčnému cíli (Zaslhoff, 2002).

Ztráta membránového potenciálu zapříčiněna tvorbou selektivních kanálů vede ke ztrátě energetické funkce membrány. Tvorba těchto kanálů může vést ke ztrátě životně důležitých látek a buněčné smrti (Yeaman a Yount, 2003). Některé peptidy (např. apidaecin) jsou schopné přesunu přes membránu bez jejího narušení (Otvos *et al.*, 2002).

### 2.1.2 Mechanismus působení apidaecinu

Obal Gram-negativních bakterií se skládá z vnitřní cytoplazmatické membrány a vnější membrány, které jsou odděleny periplazmatickým prostorem. Zatímco vnitřní membránu představuje obvykle fosfolipidová dvojvrstva, vnější membrána má póry a obsahuje lipopolysacharidy, díky nimž je povrch bakterie vysoce hydrofilní a záporně nabitý (Lugtenberg a Alphen, 1983). Mechanismus účinku, kterým apidaeciny zabíjí bakterie, zahrnuje prvotní nespecifickou vazbu peptidu na vnější

membránu bakterie a následné proniknutí apidaecinu do periplazmatického prostoru bez současného lytického procesu. Po proniknutí peptidu do periplasmy následuje nevratná vazba na dokovací molekuly, které jsou součástí transportéru permeasového typu na vnitřní membráně (Castle *et al.*, 1999, Piantavigna *et al.*, 2009). V posledním kroku je peptid translokován do vnitřního prostoru buňky, kde se naváže na DnaK, což má za následek inhibici skládání proteinů a ATPasové aktivity (Otvos *et al.*, 2000; Castle *et al.*, 1999).



Obr. 1 Mechanismus působení apidaecinu. AP, apidaecin; LPS, lipopolysacharid; DM, dokovací molekula nebo receptor. Pětikrokový mechanismus, kterým apidaecin uplatňuje svou antimikrobiální aktivitu proti *E. coli* a jiným Gramnegativním bakteriím: (1) nespecifická vazba na vnější membránu (většinou LPS); (2) proniknutí apidaecinu do periplazmatického prostoru; (3) specifická a nevratná vazba s dokovací molekulou na vnitřní membráně; (4) přesun dovnitř buňky; (5) vazba na konečný cíl (DnaK protein), což vede k inhibici ATPasové aktivity a inhibici schopnosti překlada proteinů DnaK (upraveno dle Li *et al.*, 2006).



## 2.2 Imunita včel

Hmyzí imunitní systém lze rozdělit na tři základní části, kterými jsou vnější a vnitřní fyzikální bariéry, buněčná a humorální imunita (Turner, 1994).

Mezi fyzikální bariéry mohou patřit např. kutikula nebo stěna střeva. Tyto bariéry tvoří první stupeň ochrany, bránící vstupu různých patogenů do těla živočicha (Turner, 1994).

AMP jsou součástí humorální imunity, na které se vedle těchto peptidů podílí také enzym fenoloxidas, proteiny lektiny a lysozym (Turner, 1994).

Fenoloxidas (zkratka PO, EC 1.14.18.1) je enzym podílející se na tvorbě melaninu, který obklopí patogen a tím zabrání jeho růstu. Tento enzym katalyzuje oxidaci fenolů na o-chinony, které se poté neenzymaticky polymerizují na melanin. Meziproducty i melanin samotný je toxický pro mikroorganismy (Kanost *et al.*, 2008). Důležitá je regulace celého fenoloxidasového systému, protože produkty PO mohou být toxické i pro samotný organismus, který je produkuje (Cerenius *et al.*, 1998; Cerenius *et al.*, 2004).

Lektiny (též aglutininy) představují proteiny nebo glykoproteiny, které ke své činnosti vyžadují dvojmocné kationty (zejména  $\text{Ca}^{2+}$ ) a mají alespoň dvě vazebná místa pro specifické molekuly sacharidů. Molekuly aglutininů se většinou skládají z více podjednotek vzájemně spojených vodíkovými vazbami nebo disulfidickými můstky. Jejich název je odvozen od schopnosti shlukovat (aglutinovat) cizí buňky jako erythrocyty obratlovců, bakterie, prvoky a houby. Podstatou této reakce je navázání aglutininů na určité sacharidové zbytky glykoproteinů vyskytujících se na povrchu těchto buněk (Turner, 1994).

Lysozym (EC 3.2.1.17) hydrolyzuje  $\beta$ -(1,4)-glykosidické vazby v peptidoglykanu buněčné stěny bakterie. Hmyzí lysozymy jsou proteiny (14 kDa) se sekvencí podobnou lysozymům obratlovců (Vilmos a Kurucz, 1998). V genomu včely medonosné jsou kódovány 3 lysozomy (GB10231, GB15106, GB19988) - c-kuřecího typu lektin 5 (NP\_001229926) a predikovaný lektin v endoplazmatickém retikulu (XP\_394479) (Evans *et al.*, 2006).

Kromě humorální aktivity se na imunitní odpovědi podílí i imunita buněčná, která je zprostředkována hemocyty cirkulujícími v hemolymfě (Salt, 1970). Nejběžnější typy hemocytů u hmyzu jsou prohemocyty, granulocyty, plasmocyty, sferulocyty a oenocyty (Lavine a Strand, 2002). Buněčná imunitní odpověď je úzce spjata

s humorálním typem imunity, protože oba typy těchto imunit jsou na sobě funkčně závislé a je mezi nimi úzká spolupráce (Turner, 1994)

### **2.2.1 Signální dráhy imunitní reakce**

U včel se potvrdily následující dráhy: Toll dráha, Imd dráha, JAK/STAT dráha a JNK dráha (Boutros *et al.*, 2002). Toll signální dráha spouští expresi genů pro antimikrobiální peptidy, enzym fenoloxidasu a lysozomy (Evans *et al.*, 2006). Na řízení exprese antimikrobiálních peptidů se také podílí Imd dráha (Lourenco *et al.*, 2013; Erler *et al.*, 2011; Hultmark, 2003). Imd signální dráha také aktivuje součásti JNK signální dráhy (Boutros *et al.*, 2002), které mohou výrazně ovlivňovat expresi antimikrobiálních peptidů (Wojda *et al.*, 2004).

## **2.3 Metody izolace a purifikace peptidů a proteinů**

### **2.3.1 Příprava a stabilita vzorku**

Příprava vzorku zahrnuje jak izolaci, tak zakoncentrování analytu z různých druhů matric a zabere většinou okolo 80 % času analýzy. Pro analýzu organických molekul jsou preferovány chromatografické metody. Izolace některých analytů vyžaduje použití extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) nebo extrakci na pevné fázi (SPE) (Nováková a Vlčková, 2009).

Kromě světově rozšířených technik, mezi něž patří SPE, LLE a PP (srážení proteinů), byly vyvinuty nové techniky přípravy vzorku jako mikroextrakce na pevné fázi (SPME), mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (LLME), tlaková kapalinová extrakce (PLE), extrakce využívající materiály s omezeným přístupem (RAM), mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (MEPS), molekulárně vtištěné polymery (MIP), chromatografie s turbulentním průtokem (TFC), sorpční extrakce míchadlem (SBSE) a další. Hlavním cílem je vyvinout nové metody zaměřující se především na snížení potřebného objemu vzorku, času analýzy, spotřeby rozpouštědla a ceny (Nováková a Vlčková, 2009).

Degradace mohou způsobit nesprávné určení koncentrace analytu. Obecně se degradace objevují přirozeně (Musson *et al.*, 1998), mohou být způsobeny světlem (Xu *et al.*, 2005), reakcí s biologickou látkou (Du *et al.*, 2003) nebo absorpcí na povrch polymerů nebo separačních gelů (Du *et al.*, 2005).

### **2.3.2 Srážení proteinů (PP)**

Srážení proteinů je běžná technika přípravy vzorku při práci s plazmou. Většinou jsou pro tyto účely používána mísitelná organická rozpouštědla jako acetonitril nebo methanol. Srážení je považováno za nejrychlejší a nejjednodušší postup pro analýzu proteinů, ačkoliv extrakt (supernatant) může stále obsahovat značné množství nevysrážených komponent. Tato technika má velmi nízkou selektivitu a může vyvolat opakované srážení analytu nebo potlačení signálu pro hmotnostní spektrometrii. Centrifugace pro separaci výsledného vysráženého proteinu z analytu je dostatečná pro většinu HPLC-MS analýz (Ji *et al.*, 2008).

### **2.3.3 Extrakce na pevné fázi (SPE)**

SPE je v dnešní době nejpopulárnější metodou přípravy vzorku, a to pro své mnohé výhody: vysoká návratnost, efektivní zakoncentrování vzorku, nižší spotřeba

organického rozpouštědla (ve srovnání s LLE), žádné pění při vytváření emulzí, jednoduchá manipulace a velké možnosti automatizace (Kataoka, 2003).

Při SPE jsou analyty rozdělovány mezi pevnou fází a kapalnou fází. Tyto analyty musí mít větší afinitu pro pevnou fází než pro vlastní matici. Retenci mohou ovlivňovat nepolární, polární nebo iontové interakce. V dnešní době je dostupné velké množství SPE sorbentů, které zajišťují vysokou selektivitu a mohou mít různé formy jako náplně kolon, disky, mikrotitrační destičky (Kataoka, 2003), případně špičky pipet (mikroextrakce pomocí plněných špiček pipet - DPX) (Lambert, 2009).

Volba sorbentu je klíčovým faktorem pro SPE, jelikož ovlivňuje mnoho parametrů, jako jsou selektivita, afinita a kapacita. Tento výběr záleží na fyzikálně-chemických vlastnostech analytu, které ovlivňují interakce se zvoleným sorbentem. Jako SPE sorbent mohou sloužit různé materiály od chemicky navázaných C8 a C18 skupin na povrch oxidu křemičitého, dále grafit či iontoměničové materiály až po polymerní materiály (PS-DVB, zesítený styren-divinylbenzen, PMA - parametoxamfetamin, zesítený methakrylát, MA-DVB a mnoho dalších), smíšené sorbenty (obsahující nepolární část i kation nebo anion), imunosorbenty, molekulárně vtištěné polymery, materiály s omezeným přístupem a také nedávno vyvíjené monolitické sorbenty (Saunders *et al.*, 2009). Sorbenty založené na oxidu křemičitém mají několik nevýhod ve srovnání s polymerními sorbenty. Jsou nestabilní v širším rozmezí pH a obsahují silanolové skupiny, které mohou způsobit nevratné vazby některých skupin (např. tetracyklinů) (Fontanals *et al.*, 2005).

Vývoj SPE metod má mnoho společného s HPLC (SPE může být prováděno také on-line nebo off-line). Jelikož není snadné kontrolovat rychlost toku, tak je nutné dbát na to, aby kolona nevyschla. Tento fakt je stále velkou nevýhodou běžných náplní SPE kolon kromě např. *Oasis* (Waters) nebo *Absolut* (Varian), využívajících polymerních sorbentů (PS-DVB, pórovitý grafit - PGC), které poskytují lepší smáčivost a návratnost při extrakci polárních analytů (Kataoka, 2003; Hennion, 1999).

### **2.3.3.1 SPE na reverzní fází**

Separace na reverzní fází zahrnují polární (většinou kapalnou) mobilní fází a nepolární stacionární fází. Analyt, který nás zajímá, je obvykle středně polární až nepolární. Pro tyto účely jsou využívány SPE sorbenty s navázanou alkyl nebo aryl skupinou na nosiči z oxidu křemičitého (např. C18, C8, CH, PH, CN). Organické

analyty rozpuštěné v polárním rozpouštědle (např. voda) jsou udržovány na těchto SPE materiálech hlavně pomocí disperzních a van der Waalsových sil a k následné eluci se využívá nepolárních rozpouštědel (Supelco Bulletin, 1998).

### **2.3.3.2 SPE na normální fázi**

SPE na normální fázi zahrnuje polární analyt, rozpuštěn ve středně polárním až nepolárním rozpouštědle (např. aceton nebo hexan) a polární stacionární fázi. Analyt je vázán hlavně kvůli interakcím mezi polárními funkčními skupinami analytu a povrchu sorbentu. Tyto interakce zahrnují např. vodíkové vazby, interakce pí-pí orbitalů a interakce dipól-dipól. K eluci se využívá obvykle rozpouštědla, které je více polární než to, ve kterém byl vzorek rozpuštěn (Supelco Bulletin, 1998).

### **2.3.3.3 Ionexová SPE**

Iontoměničová SPE je využívána pro látky, které jsou v rozpouštědle nabitě. Kationické (kladně nabitě) a anionické (záporně nabitě) látky se izolují použitím nosičů z oxidu křemičitého s navázanými nabitými funkčními skupinami, na kterých je nabitá látka udržována pomocí elektrostatických sil. K udržení analytu na nosiči musí být pH vzorku takové, aby byl vzorek i funkční skupina na nosiči nabitá. K eluci analytu je využíváno rozpouštědla o takovém pH, aby neutralizovalo funkční skupinu látky ve vzorku nebo na povrchu sorbentu (Supelco Bulletin, 1998).

### **2.3.3.4 Aniontová SPE**

SAX SPE (silný anex) materiály jsou tvořeny alifatickými kvartérními aminy navázanými na povrchu nosiče z oxidu křemičitého. Kvartérní amin je silná báze a funguje jako kladně nabitý kation, který váže aniontové skupiny z rozpouštědla. Disociační konstanta (pKa) kvartérního aminu je vysoká (větší než 14), což má za následek, že je tato funkční skupina na křemenném nosiči nabitá za jakéhokoliv pH. Kvůli velmi silné vazbě silně kyselých látek na sorbent je využíváno SAX pouze k extrakci velmi kyselých látek, pokud jejich návratnost či eluce není vyžadována. Slabé aniony mohou být izolovány pomocí SAX, protože mohou být snadno nahrazeny jinými anionty nebo eluovány pomocí kyselého roztoku o pH, které neutralizuje slabý anion.

Pokud potřebujeme získat silně kyselé analyty, využijeme WAX materiálů (slabý anex), využívaných pro separace na normální fázi. WAX SPE materiál obsahuje alifatickou aminopropyl skupinu navázanou na křemenný povrch s pKa okolo 9,8, a proto musí být vzorek aplikován při pH v rozmezí 2-9,8 (Supelco Bulletin, 1998).

### **2.3.3.5 Kationtová SPE**

SCX (silný katex) SPE materiály obsahují sulfátové skupiny navázané na povrchu z oxidu křemičitého. Sulfátová skupina je silně kyselá ( $pK_a < 1$ ), váže nebo vyměňuje kationty z roztoku a je nabitá při jakémkoliv pH. Kvůli velmi silné vazbě silně bazických látek na sorbent je využíváno SCX pouze k extrakci velmi bazických látek, pokud jejich návratnost či eluce není vyžadována. Slabé kationy mohou být izolovány pomocí SCX rozpouštědla o pH vyšším o 2 jednotky než je  $pK_a$  kationu nebo přidáním jiného kationu, který nahradí analyt.

Pokud je zisk silně bazických látek vyžadován, lze použít WCX (slabý katex). WCX SPE materiály obsahují alifatické karboxylové skupiny navázané na povrch z oxidu křemičitého. Karboxylová funkční skupina je slabý anion s  $pK_a$  okolo 4,8 a je negativně nabitá v rozpouštědlech o pH alespoň dvě jednotky nad touto hodnotou. WCX může být využito k izolaci slabých i silných kationů (Supelco Bulletin, 1998).

## **2.4 Metody identifikace a kvantifikace peptidů a proteinů se zaměřením na hmotnostní spektrometrii**

Proteiny jsou produkty genové exprese, důležité pro většinu biologických procesů. Proteomický výzkum se zabývá proteiny a peptidy v buňkách, tkáních a tekutinách (Fournier *et al.*, 2007). Tradiční metody sekvencování proteinů a peptidů zahrnují postupnou chemickou degradaci AMK od N-konce k C-konci (Edmanova degradace) (Edman, 1950). Ačkoliv je tato metoda vysoce spolehlivá, tak je časově náročná a nemůže být využita pro proteiny nebo peptidy s modifikacemi na N-konci, což je jedním z důvodů proč byla Edmanova degradace nahrazena hmotnostní spektrometrií (MS) (Fournier *et al.*, 2007).

### **2.4.1 Princip a instrumentace MS**

Měření pomocí hmotnostní spektrometrie využívají ionizovaných analytů v plynné fázi. Hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, který dělí ionizované analyty na základě poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) a detektoru, který zaznamenává počet iontů o jednotlivých  $m/z$  hodnotách (Aebersold a Mann, 2003).

Hmotnostní analyzátor ovlivňuje citlivost, rozlišení a přenos určení molekulové hmotnosti analytu. V proteomickém výzkumu se převážně využívá čtyř základních typů hmotnostních analyzátorů – iontová past (IT), analyzátor doby letu (TOF), kvadrupólový analyzátor a iontová cyklotronová rezonance (Aebersold a Mann, 2003).

### **2.4.2 Způsoby ionizace**

Během 20. století bylo vyvinuto několik metod ionizace molekul pro MS analýzu, zahrnující elektronovou, chemickou, fotonovou a Phenningovu ionizaci. Všechny tyto metody byly schopné přeměnit molekuly na plynné ionty, ale pokud byly aplikovány pro biologické molekuly, jako jsou proteiny a peptidy, vedlo to často k rozkladu vzorku (Dole *et al.*, 1968). Během posledních dvou desetiletí se začaly využívat pro analýzu biomolekul „jemné“ ionizační metody – MALDI (Karas a Hillenkamp, 1988) a ionizace elektrosprejem (ESI) (Fenn *et al.*, 1989).

#### **2.4.2.1 MALDI**

Tato metoda byla představena během 80. let jako jedna ze dvou „jemných“ ionizačních metod určených pro ionizaci a hmotnostně-spektrometickou analýzu biologických molekul (Karas a Hillenkamp, 1988; Kicman *et al.*, 2007). Princip

MALDI je založen na smísení netěkavého analytu s malou organickou molekulou obsahující aromatické jádro a karboxylovou funkční skupinu schopnou uvolnit proton. Matrice je zároveň donorem či akceptorem protonu, podle módu ionizace (Chait *et al.*, 1992; Vorm *et al.*, 1994). Tato směs je nanosenena v mikrolitrových objemech na nerezovou destičku a vysušena, čímž dojde ke kokrytalizaci směsi matrice/analyt. Práce s biomolekulami využívá jako matrici např. kyselinu  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyiskořicovou (CHCA) nebo 2,5-dihydroxybenzoovou kyselinu (DHB). Destička je umístěna ve vakuu a následně ozářena pulzním laserovým paprskem o vhodné vlnové délce, při které absorbuje matrice (obvykle 337 nm). Dodáním energie dojde k odpaření matrice, která je v nadbytku a zároveň je nepřímo převeden analyt do plynné fáze (Vorm *et al.*, 1994).

#### **2.4.2.2 Ionizace elektrosprejem**

ESI využívá elektrické energie k převodu molekul analytu z rozpouštědla na plynné ionty před MS analýzou. Během ESI je vzorek, který je rozpuštěn v tekavém rozpouštědle zaváděn do iontového zdroje, kde je vlivem vysokého napětí rozprašován za vzniku aerosolu drobných nabitých kapiček, které jsou vysoušeny proudem suchého dusíku. S postupným zmenšováním velikosti kapiček vypařováním rozpouštědla roste hustota náboje a dochází ke kulombické explozi, při které jsou uvolněny ionty, které jsou vtahovány do hmotnostního spektrometru (Bruins, 1998; Fenn *et al.*, 1989).

#### **2.4.3 Kvantitativní hmotnostní spektrometrie**

V počátcích byla MALDI-TOF MS využívána výhradně pro kvalitativní analýzu, protože s její pomocí můžeme získat informace ohledně molekulové hmotnosti analytu rychle a přesně. Pro analýzu nízkomolekulárních analytů a možnosti kvantifikace se zdála MALDI-TOF MS zpočátku nepoužitelná (Duncan *et al.*, 2008). Její použití pro účely kvantifikace jsou komplikovány tím, že z důvodu nehomogenní krystalizace analytu s matricí v různých místech naměříme rozdílné signály (Önnerfjord *et al.*, 1999). Kvantitativní analýza nízkomolekulárních látek je obtížná, protože při  $m/z < 500$  signál analytu interferuje se signály organické matrice (Krutchinsky *et al.*, 2002). MALDI má i několik nevýhod: komplexní biologické vzorky mohou obsahovat tisíce signálů, které se navzájem mohou potlačovat a překrývat, výšky píků pro ekvimolární analyty se mohou podstatně lišit a intenzita laseru ovlivňuje intenzitu signálu jednotlivých analytů (Szájli *et al.*, 2008).



V kontrastu s ESI poskytuje MALDI možnost vidět pouze jednonásobně nabité ionty, což poskytuje výhodu pro kvantifikaci směsí (Duncan *et al.*, 2008). Variabilitu signálu mohou ovlivňovat i různé faktory jako hydrofobicita a bazicita peptidů. Hydrofóbnější a bazičtější peptidy (s vyšším obsahem argininu a lysinu) poskytují intenzivnější signály během analýzy (Szájli *et al.*, 2008; Krause *et al.*, 1999). Hlavními výhodami MALDI techniky jsou: propustnost metody, přesnost, citlivost, selektivita a cena (Duncan *et al.*, 2008). Při sběru spekter ze stejného vzorku dochází k variabilitě v úrovni šumu a intenzitě píků, proto je vhodné kumulovat vícenásobná spektra z různých lokací na spotu, abychom získali reprezentativní spektrum (Duncan *et al.*, 2008).

Pro kvantifikaci se nejčastěji využívá interních standardů, které by měly mít chemické a fyzikální vlastnosti podobné analytu během všech fází analytického procesu. Pro kvantifikaci nízkomolekulárních analytů je vhodné použít formu analytu značenou stabilními izotopy prvků jako interní standard, protože garantuje identické chování během extrakce a krystalizace (Sleno *et al.*, 2004).

Pro stanovení relativní kvantifikace je přidáno přesně definované množství interního standardu ke všem vzorkům a výšky píků jednotlivých analytů jsou porovnávány vůči internímu standardu. Signály (hodnoty  $m/z$ ) jednotlivých analytů, které se mění vzhledem k signálu interního standardu, odráží zvýšení nebo snížení koncentrace analytu. Nemusíme znát absolutní množství interního standardu, ale musí zůstat konstantní (Duncan *et al.*, 2008).

Absolutní kvantifikaci je možno stanovit pomocí fixního množství interního standardu, pomocí něhož je možné vytvořit kalibrační křivku, která obsahuje přesně stanovené množství interního standardu a různé množství specifického analytu. Tímto způsobem získáme konstantní úměru pro jeden analyt a z poměrů intenzit je možné sestavit kalibrační křivku a určit absolutní množství analytu (Duncan *et al.*, 2008).

## 2.5 Metody a způsoby stanovení apidaecinu ve včelách

Doposud bylo vyvinuto několik metod pro detekci včelích AMP, které byly založeny na polyakrylamidové gelové elektroforéze (Bíliková *et al.*, 2001; Bíliková *et al.*, 2002), RP-HPLC (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1993) a MALDI-TOF MS (Baracchi *et al.*, 2010; Baracchi *et al.*, 2011). Apidaeciny byly izolovány za velmi silně denaturačních a kyselých podmínek ze vzorků hymolymfy včel a pro kvantifikaci exprese genů apidaecinů ve tkáních (Jefferson *et al.*, 2013) a celých tělech včel (Chaimanee *et al.*, 2012; Siede *et al.*, 2012) byla využita metoda kvantitativní polymerázové reakce (qPCR). Casteels *et al.* (1989) vydali první publikaci poskytující nám pohled na množství apidaecinů ve tkáních. Jejich metoda je založena na kapalinové chromatografii na reverzní fázi s UV-VIS detekcí. Kvůli velmi nízké citlivosti této metody bylo nezbytné zpracovat stovky vzorků včel, aby bylo možné detekovat nízké abundance apidaecinů ve včelí hemolymfě, kde byla koncentrace apidaecinů stanovena jako 100 ng/μl (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1993).

Ačkoliv zde bylo několik metod zabývajících se expresí apidaecinů nebo jiných včelích AMP, spolehlivá metoda pomocí které by bylo možné spolehlivě stanovit množství apidaecinů v celých včelách nebo jejich tkáních, dlouho chyběla (Daníhlík *et al.*, 2014). Daníhlík *et al.* (2014) přišli s novým analytickým postupem pro izolaci a kvantifikaci isoformu apidaecinu 1 v hemolymfě nebo jednotlivých částech těla včel. Tento analytický postup je založen na kombinaci kationtoměničové extrakce na pevné fázi s nanokapilární kapalinovou chromatografií (nLC) ve spojení s UHR-MS (Daníhlík *et al.*, 2014).

## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Materiál**

#### **3.1.1 Chemikálie**

- Voda, acetonitril (AcN), methanol (MeOH), kyselina mravenčí (FA) a trifluoroctová (TFA) kyselina v MS kvalitě od firmy Sigma-Aldrich (Steinheim, Německo)
- $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (pH 9)
- Isopropanol of firmy Merck (Darmstadt, Německo)
- $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina (CHCA) od Bruker-Daltonics (Bremen, Německo)
- Standardy apidaecinu (Clonestar, Brno, CR)
- Oasis® WCX sorbent od firmy Waters (Milford, MA, USA)
- C8 disky pro extrakci na reverzní fázi od firmy 3M (St. Paul, MN, USA)

#### **3.1.2 Biologický materiál**

- vzorky včel - zdravé včely, nevykazovaly klinické projevy viróz, bakterióz ani kleštíkovitosti, odebrané ze včelstev ve Valašském Meziříčí, *Apis mellifera carnica*, odběr červenec 2014.

#### **3.1.3 Přístroje**

- Analytické váhy (Sartorius, Německo)
- Fastprep120 homogenizer (MP Biomedicals, Illkirch, France)
- Lyofilizátor Lyovac GT-2 (Leybold-Heraeus, Německo)
- Ultrazvuková lázeň (Kraintek, ČR)
- Vortex (Stuart, UK)
- Minicentrifuga (VWR, Radnor, PA, USA)
- Microflex MALDI-TOF LRF20 (Bruker Daltonics, Německo)
- Stolní centrifuga (Eppendorf, Německo)
- Gelloader špičky o objemu 20  $\mu\text{l}$  (Eppendorf, Německo)

Dále byly použity automatické pipety o objemech 2,5, 10, 20, 200 a 1000  $\mu\text{l}$  (Eppendorf, Německo), plastové mikrozkuhavky o objemech 500  $\mu\text{l}$ , 1,5 ml a 2 ml, lžička, špachtle, běžné laboratorní sklo a parafilm.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Izolace peptidů s použitím WCX SPE mikrokolonek

Silně bazické peptidy z hemolymfy a homogenizovaných hrudníků včel byly izolovány pomocí slabé kationtoměničové extrakce na pevné fázi použitím komerčního sorbentu Oasis® WCX 30 µm (Waters, USA), umístěném v laboratorně upravených mikrokolonkách připravených ze špiček. Tyto mikrokolonky byly připraveny použitím 20 µl Gelloader špiček, které byly ve zúžené části částečně ztlacheny pomocí kovové pinzety a konec zkrácen nůžkami. K 5 mg naváženého Oasis® WCX sorbentu v 0,5-ml mikrozkuvkách (Eppendorf) bylo přidáno 50 µl methanolu, promícháno pomocí automatické pipety a přeneseno na takto upravenou Gelloader špičku. 0,5-ml mikrozkuvka byly opláchnuty dalšími 50 µl methanolu a tento objem byl opět přenesen na Gelloader špičku. Takto připravené špičky byly vloženy do víček 2-ml mikrozkuvek (Eppendorf), do kterých byl udělán otvor pomocí nůžek (upraveno dle Danihlík *et al.*, 2014).

Pro prostoupení kapalin skrze Oasis® WCX sorbent byly mikrokolonky po každém nanesení kapaliny centrifugovány při 800 RCF po dobu 2 minut. Před nanesením vzorku byly mikrokolonky ekvilibrovány čtyřikrát použitím 50 µl methanolu a třikrát 50 µl vody. Po ekvilibraci roztok na dně mikrozkuvky pomocí odsávacího zařízení, aby nedošlo ke kontaktu se špičkou a poté byl nanesen vzorek, který byl následně centrifugován. Nežádoucí navázané složky byly odstraněny postupně, a to nejdříve dvakrát použitím 50 µl 30 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (pH 9, upraveno pomocí NH<sub>4</sub>OH), abychom se zbavili kyselých složek a poté dvakrát 50 µl methanolu k eluci neutrálních látek a molekul navázaných na reverzní fázi. Po eluci žádaných peptidů byla Gelloader špička přenesena do čisté 2-ml mikrozkuvky (Eppendorf) s vytvořeným otvorem víčku. Zachycené silně bazické peptidy byly eluovány naše požadované peptidy dvakrát 50 µl 50% MeOH s 5% FA a třikrát 50% AcN s 5% FA. Eluované frakce byly odpařeny použitím SpeedVac vakuového koncentrátoru při 45°C (Eppendorf) (upraveno dle Danihlík *et al.*, 2014).

### 3.2.2 Odsolení peptidů pomocí C8 disků metodou StageTip

Vzorky byly odsoleny použitím StageTip metody (Rappsilber *et al.*, 2007). Dva malé C8 extrakční disky (3M) byly získány pomocí nerezové jehly s tupým koncem a vloženy do 200-µl žlutých špiček, které byly poté umístěny do otvoru ve víčku 1,5-ml mikrozkuvek. Pro prostoupení kapalin skrze C8 disky byly špičky po každém

nanesení kapaliny centrifugovány při 800 RCF po dobu 2 minut. Nejdříve byly disky aktivovány 50  $\mu$ l isopropanolu a ekvilibrovány dvakrát 50  $\mu$ l 5% FA. Odpařené vzorky po WCX byly rozpuštěny v 50  $\mu$ l 5% FA a naneseny na takto připravenou C8 kolonku. Navázané peptidy byly promyty dvakrát 50  $\mu$ l 5% FA a poté byla celá špička přenesena do čisté 2-ml mikrozkušavky s otvorem ve víčku. Peptidy byly eluovány třikrát použitím 50  $\mu$ l 50% AcN s 5% FA. Eluáty byly odpařeny stejným způsobem jako při WCX (upraveno dle Danihlík *et al.*, 2014).

### 3.2.3 Příprava roztoků standardu

Byly použity standardy apidaecinu 1 (čistota >99%) a isotopově značeného apidaecinu 1 (obsahující modifikovaný arginin obsahující isotopově značené atomy uhlíku a dusíku ve struktuře –  $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ; čistota >98%) syntetizované firmou Clonostar (Brno, ČR). Zásobní roztoky standardů apidaecinů byly naředěny tak, aby koncentrace apidaecinu 1 (API1) odpovídala 1 pmol/ $\mu$ l a isotopově značeného apidaecinu 1 ( $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{API1}$ ) 0,42 pmol/ $\mu$ l. Roztoky byly připraveny v 0,1% roztoku TFA.

### 3.2.4 Příprava vzorků z hrudníku včel

Dospělé včely byly zbaveny hlav, zadečků a ostatních částí a hrudníky byly vloženy do mikrozkušavek o objemu 2 ml. Vzorek hrudníku byl homogenizován pomocí keramických kuliček v přítomnosti 200  $\mu$ l 0,1% TFA v homogenizátoru Fastprep120 homogenizer (MP Biomedicals, Illkirch, France). Po prvotním rozdrčení vzorku bylo přidáno dalších 400  $\mu$ l 0,1% TFA a bylo pokračováno v homogenizaci. Po homogenizaci byl homogenát centrifugován při 16,900 RCF po dobu 10 minut a supernatant přepipetován do čisté 2-ml mikrozkušavky, ve které byl následně zahříván při 100°C po dobu 10 minut v termostatu. Ochlazené mikrozkušavky byly centrifugovány (16,900 RCF, 10 minut) a supernatant byl přepipetován do čistých 2-ml mikrozkušavek. Vzorky byly zmrazeny při -80 °C po dobu 25 minut a poté lyofilizovány přes noc a uchovány při -80 °C před dalším použitím.

### 3.2.5 Příprava vzorků hemolymfy z mladých a dospělých včel

Přibližně 2,5  $\mu$ l hemolymfy bylo odebráno ze včel pomocí pipety, naředěno ve 100  $\mu$ l 0,1% TFA a zahříváno po dobu 10 minut při 100°C v termostatu. Následně byly vzorky zmrazeny při -80 °C, lyofilizovány a uchovány při -80 °C před dalším použitím.

#### Varianta 1: Příprava vzorků pro kalibrační křivky

Lyofilizovaná hemolymfa byla rozpuštěna v 100 µl 5% FA a po 30 µl nanesena na WCX mikrokolonky. Po provedení izolace peptidů dle protokolu (viz. kapitola 3.2.1) byly vzorky rozpuštěny ve 150 µl 5% FA a rozděleny po 50 µl na C8 kolonky pro odsolení. Po odsolení byly tři mikrozkuřavky ze stejného vzorku spojeny a odpařeny a následně použity pro MALDI analýzu.

#### Varianta 2: Příprava vzorků na srovnávací analýzu mezi MALDI a ESI

Pro srovnávací analýzu mezi MALDI a ESI byly vzorky rozpuštěny ve 100 µl 5% FA a rozděleny po 20 µl do čtyř 0,5-ml mikrozkuřavek. Ke dvěma vzorkům bylo přidáno 5 pmol APII a ke dvěma 5 pmol APII a 5 pmol isotopově značeného [ $^{13}\text{C}_6$  $^{15}\text{N}_4$ ]APII. Byla provedena izolace a odsolení peptidů dle protokolu (viz. kapitola 3.2.1) a po odsolení bylo použito 50 µl pro ESI a 100 µl pro MALDI analýzu.

### **3.2.6 Příprava hovězího sérového albuminu (BSA)**

Pro kalibrační křivku se standardy apidaecinu bylo vyzkoušeno použití BSA jako pozadí pro MALDI měření. Zásobní roztok BSA obsahoval 100 µg BSA ve 100 µl roztoku. Bylo provedeno odsolení na C8 dle protokolu (na kolonku bylo nanášeno 9,9 µl zásobního roztoku) a po odpaření bylo přidáno do tří mikrozkuřavek po 150 µl 0,1% TFA, čímž bylo docíleno toho, že roztok obsahoval BSA v koncentraci 1 pmol/1 µl. Roztoky byly spojeny do jedné mikrozkuřavky pomocí automatické pipety a takto připravený roztok byl použit jako standard pro MALDI analýzu.

### 3.3 MALDI-TOF MS analýza

Pro MALDI-TOF analýzu byl použit přístroj Microflex LRF20 MALDI-TOF obsahující iontový zdroj microScout s dusíkovým laserem 337 nm. Měření bylo prováděno v reflektorovém módu. Jako matrice byla použita CHCA rozpuštěná v 60% AcN v 0,1% TFA (5 mg CHCA/1 ml) a naměřená spektra byla vyhodnocena programem mmass (Martin Strohm, Německo, <http://www.mmass.org>).

#### Varianta 1: MALDI-TOF MS měření pro kalibrační křivku s použitím přečištěné hemolymfy jako pozadí

Vzorek po C8 odsolení byl rozpuštěn ve 100  $\mu$ l 0,1% TFA a rozdělen do deseti 0,5-ml mikrozkušavek po 10  $\mu$ l. Do mikrozkušavek byly přidány standardy apidaecinu dle tabulky 3. Vzorky byly odpařeny použitím SpeedVac vakuového koncentrátoru a poté rozpuštěny v 5  $\mu$ l 0,1% TFA. Takto připravené vzorky byly nanášeny po 0,6  $\mu$ l s 0,6  $\mu$ l matrice na MSP Anchor Chip 600/96 MALDI destičku, ponechány krystalovat a změřeny na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru. Hmotnostní spektra byla kumulována ve dvou provedeních – při 400 střelách a do intenzity 10 000 isotopově neznačeného apidaecinu.

Tab. 3 Množství standardů apidaecinu na 1 spotu

Vzorek	Koncentrace APIIA na spotu / v roztoku (pmol)	Koncentrace značeného apidaecinu [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII na spotu / v roztoku (pmol)
1	0 / 0	1 / 8,33
2	0,1 / 0,83	1 / 8,33
3	0,25 / 2,08	1 / 8,33
4	0,5 / 4,16	1 / 8,33
5	0,75 / 6,25	1 / 8,33
6	1 / 8,33	1 / 8,33
7	2,5 / 20,8	1 / 8,33
8	5 / 41,6	1 / 8,33
9	7,5 / 62,6	1 / 8,33
10	10 / 83,4	1 / 8,33

### Varianta 2: MALDI-TOF MS měření pro kalibrační křivku s použitím BSA jako pozadí

Do deseti 0,5-ml mikrozkuvek byly přidány standardy apidaecinu dle tabulky 3 a navíc bylo přidáno 41,6 pmol BSA, což odpovídá 5 pmol BSA na spot. Vzorky byly odpařeny použitím SpeedVac vakuového koncentrátoru a poté rozpuštěny v 5  $\mu$ l 0,1% TFA. Takto připravené vzorky byly nanášeny po 0,6  $\mu$ l s 0,6  $\mu$ l matrice na MSP Anchor Chip 600/96 MALDI destičku, ponechány krystalovat a změřeny na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru. Hmotnostní spektra byla kumulována ve dvou provedeních – při 400 střelách a do intenzity 10 000 isotopově neznačeného apidaecinu.

### Varianta 3: MALDI-TOF MS měření na srovnávací analýzu mezi MALDI a ESI

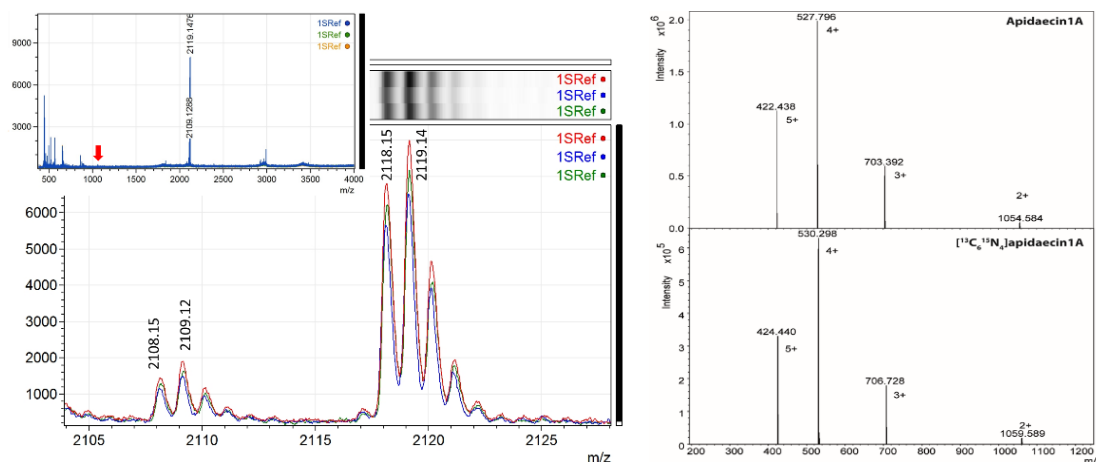
Pro srovnávací analýzu bylo použito lyofilizovaných vzorků hemolymfy mladých a dospělých včel a vzorku z lyofilizovaného hrudníku. Vzorky po C8 odsolení byly rozpuštěny v 10  $\mu$ l matrice a nanášeny po 1  $\mu$ l na MSP Anchor Chip 600/96 MALDI destičku a ponechány krystalovat (každý vzorek byl nanášen 5x) a následně změřeny na MALDI-TOF hmotnostním spektrometru. Hmotnostní spektra byla kumulována při 800 střelách.



## 4 Výsledky a diskuze

### 4.1 Rozdíly ionizace MALDI vs ESI pro apidaeciny 1

Apidaeciny 1 (API1) jsou vysoce bazické peptidy obsahující ve své struktuře třikrát arginin a jedenkrát histidin, přičemž každá tato bazická aminokyselina může vázat proton včetně N-koncové aminokyseliny (Aebersold a Mann, 2003). V důsledku těchto vlastností hmotnostní spektrum při ESI ionizaci obsahuje ionty v několika nábojových stavech v rozsahu od 2+ do 5+ (viz. obr. 2 vpravo, Danihlík *et al.*, 2014). MALDI ionizace je obecně metodou, která poskytuje převážně jednonásobně nabitě ionty peptidů (Karas a Hillenkamp, 1988). Jak je vidět na obr. 2 vlevo, tak i přes vysoký počet bazických aminokyselin ve struktuře peptidu apidaecinu při tomto typu ionizace vznikají také téměř výhradně jednonásobně nabitě peptidy API1 ( $m/z$  2108.15, 2109.12) a isotopově značeného [ $^{13}\text{C}_6$  $^{15}\text{N}_4$ ]API1 ( $m/z$  2118.15, 2119.12). Červená šipka ve vloženém spektru (obr. 2, levý horní roh) ukazuje minoritní odezvu dvojnásobně nabitě iontu [ $^{13}\text{C}_6$  $^{15}\text{N}_4$ ]API1 ( $m/z$  1059.58). Tato preferenční tvorba jednonásobně nabitých iontů je velmi vhodná ke kvantifikaci peptidů. Také vzhledem k tomu, že nedochází ke štěpení peptidového signálu do několika nábojových stavů, tak MALDI ionizace vykazuje vysokou citlivost detekce peptidů.



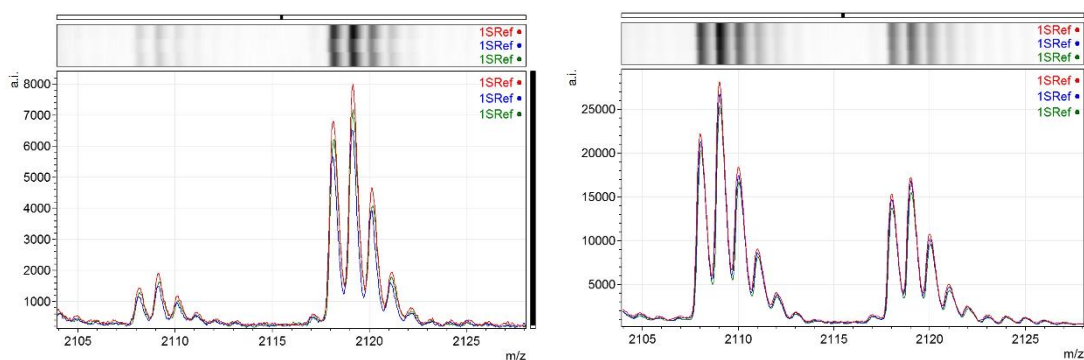
Obr. 2 Porovnání ionizace standardů API1 ( $m/z$  2108.15, 2109.12) a isotopově značeného [ $^{13}\text{C}_6$  $^{15}\text{N}_4$ ]API1 ( $m/z$  2118.15, 2119.12) mezi MALDI a ESI. MALDI ionizace apidaecinů (obrázek vlevo) poskytuje převážně jednonásobně nabitě ionty pro oba standardy, kdežto ESI ionizace (obrázek vpravo, převzato a upraveno z publikace Danihlík *et al.* 2014) poskytuje několik nábojových stavů odpovídající počtu bazických aminokyselin přítomných v molekule peptidu.

## 4.2 Opakovatelnost odezvy signálů peptidů při MALDI ionizaci

Jednou z nevýhod využití MALDI ionizace pro kvantifikaci je nerovnoměrná distribuce signálu (Duncan *et al.*, 2008). Pro potlačení této nevýhody je doporučeno provádět sběr většího počtu signálů získaných z různých částí vykrystalizované matrice na MALDI destičce. V rámci experimentu byly vyzkoušeny reprodukovatelnosti sběru signálu v rámci jednoho MALDI spotu a následně i mezi různými spoty.

### 4.2.1 Spektra z jednoho spotu

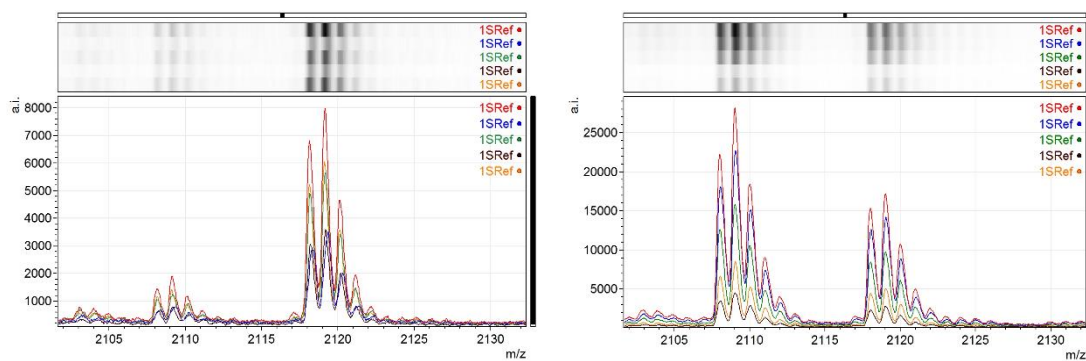
Z hmotnostních spekter zobrazených na obr. 3 je patrné, že při opakované kumulaci spekter z jednoho vzorku na jednom spotu (800 střel/vzorek) jsou získané intenzity signálů jak pro APII, tak pro interní standard [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII opakovatelně vysoce reprodukovatelné, což následně vede k vysoké opakovatelnosti stanovení poměrů. Ze spekter je také zřejmé, že tato reprodukovatelnost sběru signálů je nezávislá na celkovém množství analyzovaných standardů.



Obr. 3 Ukázka reprodukovatelnosti odezvy MALDI ionizace apidaecinů (APII, m/z 2108.15, 2109.12 a isotopově značeného [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII, m/z 2108.15, 2109.12) při opakovaném sběru dat stejného vzorku z jednoho spotu. Vlevo je zobrazen vzorek obsahující pouze přirozený obsah APII a 5 pmol isotopově značeného [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII přidávaných před purifikací. Vpravo je pak zobrazen stejný vzorek, který byl obohacen 5 pmol standardu APIIA a 5 pmol isotopově značeného [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII přidávaných před purifikací.

### 4.2.2 Spektra z různých spotů

Výrazně horší opakovatelnost signálu pro jednotlivé analyzované peptidy byla dosažena při sběru signálů mezi různými spoty. Jak je patrné ze spekter (obr. 4), odezvy peptidů na jednotlivých spotech mohou být velmi proměnné i při zachování sběru spekter při 800 střelách na jeden vzorek. Ale i přes tuto variabilitu odezvy na různých spotech, poměry intenzit APII a [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII jsou velmi podobné s minimální variabilitou menší než 5%, což je možné vidět v souhrnné tabulce 4.



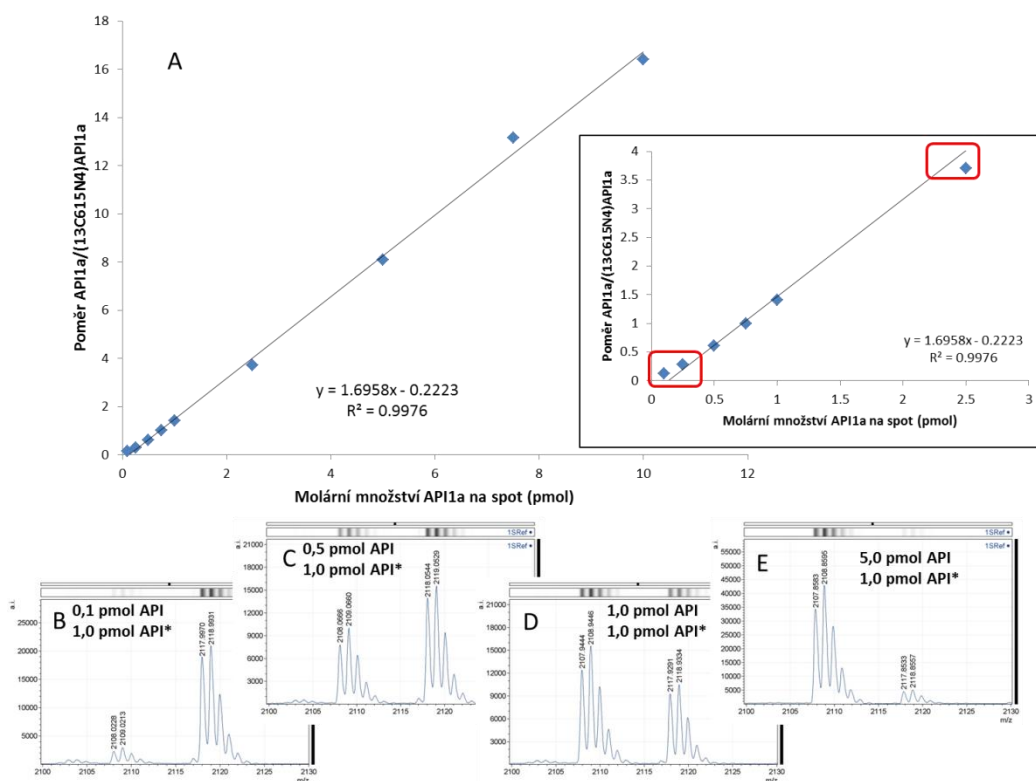
Obr. 4 Ukázka reprodukovatelnosti odezvy MALDI ionizace apidaecinů (APII, m/z 2108.15, 2109.12 a isotopově značeného  $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$ , m/z 2118.15, 2119.12) při opakovaném sběru dat stejného vzorku z pěti různých spotů. Vlevo je zobrazen vzorek obsahující pouze přirozený obsah APII a 5 pmol isotopově značeného  $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$  přidaných před purifikací. Vpravo je pak zobrazen stejný vzorek, který byl obohacen 5 pmol standardu APII a 5 pmol isotopově značeného  $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$  přidaných před purifikací.

Tab. 4 Souhrn výsledných intenzit a jejich poměrů z experimentu reprodukovatelnosti odezvy MALDI ionizace apidaecinů (APII, m/z 2108.15, 2109.12 a isotopově značený  $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$ , m/z 2118.15, 2119.12) při opakovaném sběru dat stejného vzorku z pěti různých spotů.

n (pmol)	APII (int 1+2)	$[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$ (int 1+2)	poměr APII/ $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$
<b>A (přirozený APII vs 5 pmol <math>[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}</math> / spot)</b>			
1	2976	14318	0.21
2	1095	5878	0.19
3	1941	10161	0.19
4	1179	6368	0.19
5	2228	10872	0.20
		průměr	0.20
		SD	0.010
		relSD	4.9%
<b>B (přirozený APII + 5 pmol APII vs 5 pmol <math>[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}</math> / spot)</b>			
1	49515	31743	1.56
2	40052	25992	1.54
3	27905	17701	1.58
4	7632	4838	1.58
5	14786	9066	1.63
		průměr	1.58
		SD	0.030
		relSD	1.9%

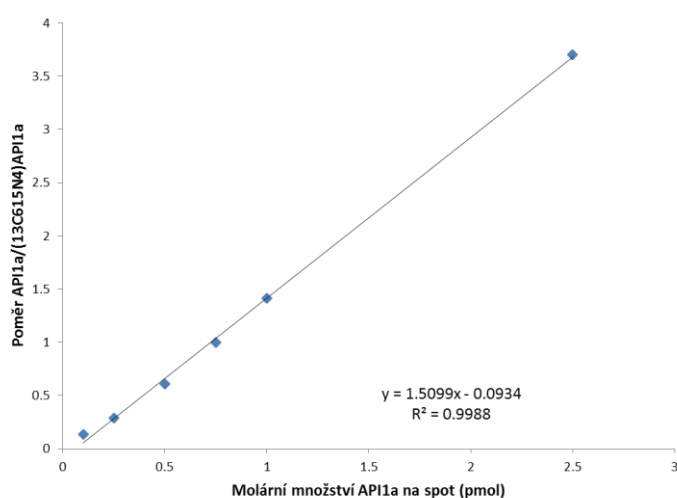
### 4.3 Kalibrační závislost apidaecinu (vlastnosti, reprodukovatelnost)

Ze získaných hmotnostních spekter vzorků obsahujících standardy apidaecinu (APII v rozsahu 0,1 – 10 pmol a 1 pmol isotopově značeného [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII) za použití různých biologických matric byly sestrojeny kalibrační přímky. Na obr. 5 jsou vyobrazena spektra při použití přečištěné hemolymfy mladé včely (mladušky) jako biologické matrice. Z obrázku je patrné, že s narůstajícím molárním množstvím standardu APII roste lineárně poměr signálů mezi APII a isotopově značeným standardem [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII, takže je možné sestavit kalibrační závislost. Při vysokých rozdílech v koncentracích APII a [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII byly zaznamenány vyšší odchylky v odezvách jednotlivých standardů, což může svědčit o nelineární odezvě MALDI ionizace v celém koncentračním rozsahu měření.



Obr. 5 Ukázka lineární kalibrační závislosti v rozsahu 0,1 – 10 pmol APII získané pomocí MALDI ionizace standardů apidaecinu (APII, m/z 2108.15, 2109.12 a isotopově značený [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII, m/z 2118.15, 2119.12) rozpuštěných a naředěných v přečištěné hemolymfě mladušky. Vsunutý graf včetně červených obdélníků zvýrazňuje odchylky v odezvách standardů daným nelineární odezvou MALDI ionizace v celém koncentračním rozsahu. Ve spodní části (B-D) jsou zobrazeny ukázky intenzit a odezev standardů při různých poměrech APII a isotopově značeného [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII. Molární množství jednotlivých standardů nanášených na spot jsou uvedeny v příslušném obrázku.

Tato variabilita odezvy signálů je pravděpodobně dána ovlivněním ionizace jednotlivých analytů při velkých koncentračních rozdílech, kdy jeden analyt z kalibračního páru má výrazně vyšší koncentraci než druhý (Szájli *et al.*, 2008). Stejný problém může nastat také při použití komplexního vzorku, který bude obsahovat velké množství ionizovatelných peptidů. Proto se při využití kvantifikace pomocí MALDI ionizace doporučuje použití komplexní matrice se srovnatelným obsahem ionizovatelných analytů jako analyzovaný vzorek, případně použití kvantifikace metodou standartního přídávku přímo v analyzovaném vzorku (Duncan *et al.*, 2008, Szájli *et al.*, 2008).



Obr. 6 Ukázka přesnější lineární kalibrační závislosti v rozsahu 0,1 – 2,5 pmol API1 získané pomocí MALDI ionizace standardů apidaecinů (API1, m/z 2108.15, 2109.12 a isotopově značeného [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>]API1, m/z 2118.15, 2119.12) rozpuštěných a naředěných v přečištěné hemolymfě mladušky.

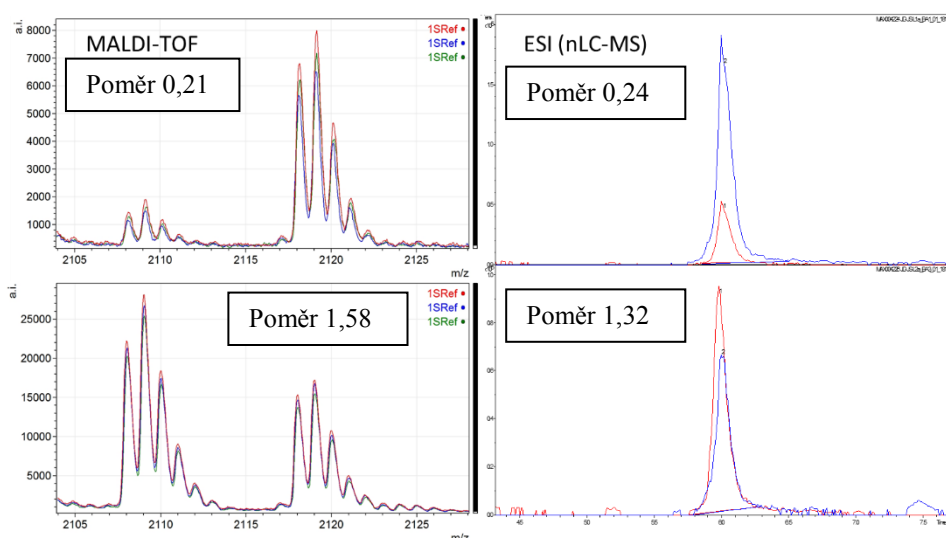
Při použití užšího koncentračního rozsahu (0,1 – 2,5 pmol standardu API1 a 1 pmol interního standardu [<sup>13</sup>C<sub>6</sub><sup>15</sup>N<sub>4</sub>]API1, obr. 6) byla zaznamenána přesnější lineární závislost poměru signálů mezi oběma standardy a výrazně nižší úsek na ose y(3-5x), který se blíží nule a zároveň klesla jeho variabilita. Přehled kalibračních závislostí naměřených při použití jiných biologických matric (BSA, přečištěný lyzát z hrudníku dospělé včely) je shrnut v tabulce 5. Z Tabulky 5 jsou také patrné výraznější rozdíly ve směrnících kalibračních závislostí naměřených pro rozsah 0,1 – 10 pmol API1 ve srovnání s rozsahem 0,1 – 2,5 pmol API1 v závislosti na použité matrici. V jednoduchých matricích jako je BSA má kalibrační závislost výrazně vyšší směrnici než při použití přečištěného extraktu z hrudníku včely, který obsahuje větší množství bazických peptidů ovlivňujících MALDI ionizaci peptidů.

Tab. 5 Tabulka porovnání opakovatelnosti kalibračních závislostí s využitím různých biologických matric, které mohou ovlivnit MALDI ionizaci standardů apidaecinů. Směrnice vyjadřuje sklon kalibrační přímky, úsek definuje výsek na ose y a R2 definuje koeficient spolehlivosti lineární závislosti. SD a relSD definují standartní odchylku a relativní standartní odchylku průměru.

	porovnání kalibrací 0,1-10 pmol			porovnání kalibrací 0,1-2,5 pmol		
	směrnice (ax)	úsek (b)	R2	směrnice (ax)	úsek (b)	R2
Kalibrace1_Hrudnik	1.7885	-0.3442	0.9892	1.4177	-0.0733	0.9993
	1.7849	-0.4182	0.9921	1.362	-0.0442	0.9987
	1.7315	-0.3187	0.9992	1.5464	-0.1539	0.9972
Kalibrace2_Hemolymfa_mladuska	1.4603	-0.1751	0.9913	1.3996	-0.0131	0.9992
	1.6958	-0.2223	0.9976	1.5099	-0.0934	0.9988
	1.8954	-0.5288	0.9922	1.4256	-0.0685	0.9986
Kalibrace3_BSA5pmol	2.0868	-0.4954	0.9976	1.6492	-0.1399	0.9982
	2.0846	-0.5007	0.9979	1.5833	-0.1162	0.9984
	2.0729	-0.5534	0.996	1.6932	-0.1528	0.9986
Kalibrace4_Hrudnik	1.5357	-0.1949	0.9988	1.432	-0.1291	0.9982
	1.6464	-0.3133	0.9982	1.5193	-0.1777	0.9962
	1.4351	-0.1192	0.9997	1.4671	-0.1396	0.9969
průměr	1.7682	-0.3487		1.5004	-0.1085	
SD	0.2222	0.1439		0.0984	0.0479	
relSD	12.6%			6.6%		

#### 4.4 Kvantitativní analýza apidaecin 1 peptidů ve vzorcích pomocí MALDI-TOF

Z dat získaných v předešlých experimentech bylo zjištěno, že poměr signálů APII vs interní standard  $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$  má lineární závislost a tudíž se zde nabízí možnost využití MALDI ionizace ve spojení s tímto interním standardem  $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$  pro kvantifikaci APII ve včelích extraktech. Samozřejmě, MALDI ionizace je použitelná pouze pro kvantifikaci sumy obou forem APII, tj. APIIa a APIIb na rozdíl od kvantifikace ve spojení s dělením pomocí kapalinové chromatografie na moderních vysoceúčinných kolonách (Daníhlík *et al.*, 2014). Na obrázku 7 lze vidět, že naměřené poměry mezi APII a  $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$  pomocí MALDI a ESI ionizace jsou velmi podobné.



Obr. 7 Ukázka srovnání odezvy naměřené pomocí MALDI ionizace (vlevo) a ESI ionizace (vpravo) pro vzorek z hemolymfy dospělé včely. Horní vzorky představují odezvu vzorku obsahující přirozené množství APII a přidavek interního standardu 5 pmol isotopově značeného  $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$  před purifikací. Spodní vzorky jsou shodné jako horní s tím rozdílem, že vzorek byl navíc obohacen o 5 pmol APII. Zobrazený poměr byl pro MALDI měření apidaecinů (APII, m/z 2108.15, 2109.12 a  $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$ , m/z 2118.15, 2119.12) vypočten jako poměr  $\text{APII} / [^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII} = \Sigma \text{intenzit}(\text{m/z } 2108.15, 2109.12) / \Sigma \text{intenzit}(\text{m/z } 2118.15, 2119.12)$ . Zobrazený poměr byl pro ESI (nLC-MS) měření apidaecinů (APII, m/z 527.80, 528.05 a  $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$ , m/z 530.30, 530.55) vypočten jako poměr  $\text{APII} / [^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII} = \Sigma \text{ploch}(\text{m/z } 527.80, 528.05) / \Sigma \text{ploch}(\text{m/z } 530.30, 530.55)$ .

Následné experimenty byly zaměřeny na určení návratnosti a správnosti stanovení APII během procesu purifikace s následnou kvantifikací pomocí interního standardu  $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$ , MALDI ionizace a detekce na hmotnostním analyzátoru doby letu (TOF). Z tabulky 6 je patrné, že návratnost APII po přepočtení na množství interního standardu  $[^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4]\text{APII}$  v rámci celého procesu včetně stanovení MALDI-TOF

analýzou se pohybuje v rozsahu od 80 do 100%, což je výborný výsledek. Dále je z tabulky 6 vidět, že návratnost se mírně liší v závislosti na použitém množství jak interního standardu [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII, tak na množství přidávaného standardu APII, tj. při 5 pmol obou standardů je ve většině případů návratnost přes 92% vyjma vzorku hrudnik1, kdežto při 1 pmol obou standardů je návratnost mírně nižší a to v rozsahu 80-90%.

Tab. 6 Ukázka návratnosti standardu APII z lyzátů odvozených z různých částí včel. Poměr intenzit signálů je definován jako poměr standardů apidaecinů APII / [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII =  $\Sigma\text{intenzit}(m/z\ 2108.15, 2109.12)/\Sigma\text{intenzit}(m/z\ 2118.15, 2119.12)$ . (APII, m/z 2108.15, 2109.12 a [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII, m/z 2118.15, 2119.12) vypočten jako poměr. Množství je vypočítáno z kalibrační závislosti  $y=1,4336x-0,1295$  naměřené pro molární množství interního standardu [ $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ ]APII 1 pmol. Rozdíl je definován jako molární množství APII přídatku, který je rozdílem mezi vzorkem obsahující jen přírodní APII a stejným vzorkem obohaceným o externí přídavek APII standardu. Množství APII, které bylo do vzorků přidáno je zaznamenáno v sloupci přídavek APII. Stanovená návratnost pro jednotlivé vzorky je vypočtena jako procentuální výsledek stanoveného rozdílu vůči množství, které bylo dodáno.

ID vzorků	poměr intenzit	množství (pmol)	rozdíl (pmol)	Přídavek APII (pmol)	IS ( $^{13}\text{C}_6^{15}\text{N}_4$ )APII (pmol)	Návratnost %
hrudnik1_0-5	0.14	0.94		0	5	
hrudnik1_5-5	1.32	5.06	4.12	5	5	82.3
hrudnik2_0-5	1.68	6.31		0	5	
hrudnik2_5-5	3.11	11.30	4.99	5	5	99.7
Vcela_hemoAVG1_0-5	0.20	1.15		0	5	
Vcela_hemoAVG1_5-5	1.58	5.96	4.81	5	5	96.3
Vcela_hemoAVG2_0-5	0.22	1.23		0	5	
Vcela_hemoAVG2_5-5	1.55	5.85	4.62	5	5	92.3
MLAD_hemo1_5-5	1.20	4.65	4.65	5	5	93.0
MLAD_hemo2_5-5	1.28	4.91	4.91	5	5	98.2
Vcela1a_0-1	0.27	0.28		0	1	
Vcela1a_1-1	1.44	1.09	0.82	1	1	81.6
Vcela1b_0-1	0.29	0.29		0	1	
Vcela1b_1-1	1.49	1.13	0.84	1	1	83.7
Vcela2a_0-1	0.23	0.25		0	1	
Vcela2a_1-1	1.43	1.09	0.83	1	1	83.3
Vcela2b_0-1	0.29	0.29		0	1	
Vcela2b_1-1	1.44	1.10	0.80	1	1	80.4
Mlad1a_0-1	0.03	0.11		0	1	
Mlad1a_1-1	1.32	1.01	0.90	1	1	90.0
Mlad1b_0-1	0.04	0.12		0	1	
Mlad1b_1-1	1.35	1.03	0.92	1	1	91.8
Mlad2a_0-1	0.03	0.11		0	1	
Mlad2a_1-1	1.26	0.97	0.86	1	1	85.8
Mlad2b_0-1	0.04	0.12		0	1	
Mlad2b_1-1	1.26	0.97	0.85	1	1	85.5



Správnost stanovení přidaného standardu API1 se pohybuje v rozsahu -6,3 % pro přídavek 5 pmol a -15 % pro přídavek 1 pmol API1 standardu. Tento rozdíl může být dán vyššími ztrátami těchto bazických peptidů během purifikace vznikající nejen při samotné izolaci, ale i při další manipulaci a pipetování vlivem extrémních vlastností analyzovaných peptidů.

Pro vzorek „Včela\_hemoAVG1“, jehož spektra z MALDI-TOF a nLC-ESI-MS analýz jsou zobrazena na obrázku č.7 byla vypočítána návratnost i pro nLC-ESI-MS měření. Stanovený rozdíl mezi vzorkem bez externího přídávku API1 a po přídávku 5 pmol API1 by 5,05 pmol, což odpovídá 101% návratnosti (k výpočtu byla využita kalibrace z publikace Danihlík et al. 2014). Tento vzorek při MALDI-TOF analýze vykázal výsledek rozdílu 4,81 pmol odpovídající 96,3% návratnosti (viz. Tab. 6). Prozatimní výsledky ukazují výbornou shodu výsledků stanovení mezi metodou nLC-MS s ESI ionizací a MALDI-TOF analýzou. Samozřejmě bude ještě nutné provést rozsáhlejšího porovnání většího množství vzorků pro ověření shody výsledků stanovení získaných při MALDI-TOF analýze a nLC-ESI-MS analýzy.

## 5 Závěr

Byla vypracována bakalářská práce na téma Porovnání ionizačních metod pro analýzu peptidu apidaecinu ve spojení s hmotnostně spektrometrickými metodami ve tkáních včel a bylo dosaženo následujících výsledků:

1) Byla zpracována literární rešerše o antimikrobiálních peptidech se zaměřením na peptid apidaecin a další peptidy včel, metody extrakce a purifikace pomocí extrakčních technik založených na SPE nosičích a kvantifikaci apidaecinu pomocí hmotnostní spektrometrie.

2) Pomocí standardů apidaecinu 1 a isotopově značeného apidaecinu 1 byly vytvořeny kalibrační závislosti s použitím různých biologických matric (hemolymfy včel, homogenizovaný hrudník a BSA), které vykazovaly vysokou lineární závislost.

3) Při 800 střelách na jednom spotu byla pozorována výborná opakovatelnost poměrů signálů. Mezi spoty byla opakovatelnost horší, protože odezvy na jednotlivých spotech jsou velmi proměnlivé, ale i tak poměry intenzit standardů apidaecinu 1 a isotopově značeného apidaecinu 1 jsou si velmi podobné s variabilitou menší než 5%.

4) Návratnost apidaecinu 1 během celého procesu izolace se pohybuje od 80 do 100% a správnost stanovení přidaného standardu apidaecinu 1 se pohybuje v rozsahu -6,3 % do -15 % (pro přidavek 5 pmol respektive 1 pmol apidaecinu 1). Návratnost a správnost stanovení se mírně liší dle dodaného množství standardu apidaecinu 1. Menší množství přidaného standardu znamenalo vyšší ztráty, které mohou být dané vlivem extrémních vlastností těchto bazických peptidů.

5) Poměr signálů apidaecinu 1 a isotopově značeného apidaecinu 1 má lineární závislost, což nabízí možnost využití pro semikvantitativní stanovení přirozeného apidaecinu 1 ve včelích extraktech. Naměřené poměry mezi standardy pomocí MALDI a ESI ionizace byly velmi podobné, ale je třeba provést rozsáhlejší analýzu většího počtu vzorků pomocí MALDI-TOF a nLC-MS-MS analýzy.

## 6 Literatura

- Aebersold R., Mann M. (2003): Mass spectrometry – based proteomics. *Nature* **422**, 198-207.
- Andreu D., Rivas L. (1998): Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers* **47**, 415-433.
- Baracchi D., Turillazzi S. (2010): Differences in venom and cuticular peptides in individuals of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) determined by MALDI-TOF MS. *Journal of Insect Physiology* **56**, 366-375.
- Baracchi D., Francese S., Turillazzi S. (2011): Beyond the antipredatory defence: Honey bee venom function as a component of social immunity. *Toxicon* **58**, 550-557.
- Bíliková K., Wu G., Šimůth J. (2001): Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifouling factor. *Apidologie* **32**, 275-283.
- Bíliková K., Hanes J., Nordhoff E., Saenger W., Klauđiny J., Šimůth J. (2002): Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *FEBS Letters* **528**, 125-129.
- Boutros, M., Agaisse, H., Perrimon, N. (2002): Sequential Activation of Signaling Pathways during Innate Immune Responses in *Drosophila*. *Developmental Cell* **3**, 711-722.
- Bruins A.P. (1998): Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of chromatography A* **794**, 345-357.
- Castle M, Nazarian A, Yi S.S., Tempst P. (1999): Lethal effects of apidaecin on *Escherichia coli* involve sequential molecular interactions with diverse targets. *J Biol Chem* **274**, 32555–64.
- Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. (1989): Apidaecins - Antibacterial Peptides from Honeybees. *Embo Journal* **8**, 2387-2391.
- Casteels P., Ampe C., Riviere L., Vandamme J., Elicone C., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. (1990): Isolation and Characterization of Abaecin, a Major Antibacterial Response Peptide in the Honeybee (*Apis-Mellifera*). *European Journal of Biochemistry* **187**, 381-386.
- Casteels P., Ampe 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**, 7044-7054.
- Casteels P., Tempst P. (1994): Apidaecin-Type Peptide Antibiotics Function through a Non-Poreforming Mechanism Involving Stereospecificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **199**, 339-345.
- Casteels-Josson K., Capaci T., Casteels P., Tempst P. (1993): Apidaecin multipeptide Precursor Structure - a Putative Mechanism for Amplification of the Insect Antibacterial Response. *Embo Journal* **12**, 1569-1578.
- Casteels-Josson K., Zhang W., Capaci T., Casteels P., Tempst P. (1994): Acute Transcriptional Response of the Honeybee Peptide-Antibiotics Gene Repertoire and Required Posttranslational Conversion of the Precursor Structures. *Journal of Biological Chemistry*, **269**, 28569-28575.
- Cerenius L., Soderhall K. (2004): The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* **198**, 116-126.
- Cerenius L., Soderhall K. (1998): Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr Opin Immunol* **10**, 23-28.
- Chaimanee V., Chantawannakul P., Chen Y., Evans J.D., Pettis J.S. (2012): Differential expression of immune genes of adult honey bee (*Apis mellifera*) after inoculated by *Nosema ceranae*. *Journal of Insect Physiology*, **58**, 1090-1095.
- Chait B.T., Kent S.B.H. (1992): Weighing naked proteins: practical, high-accuracy mass measurement of peptides and proteins. *Science* **257**, 1885-1894.
- Cooper E.L. (2006): Comparative immunology. *Integrative zoology* **1**, 32-43.

- 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.
- Dole M., Mach L.L., Hines R.L., Mobley R.C., Ferguson L.D., Alice M.B. (1968): Molecular beams of macroions. *J. Chem Phys.* **49**, 2240.
- Du L., Xu Y., Musson D.G. (2003): Simultaneous determination of clofibrate and its active metabolite clofibric acid in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B* **794**, 343-351.
- Du L., Xu Y., Musson D.G., Woolf J.E., Rose J.M. (2005): Concerns in the development of an assay for determination of a highly conjugated adsorption-prone compound in human urine. *Journal of Chromatography B* **818**, 241-248.
- Duncan M.W., Rader H., Hunsucker S.W. (2008): Quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Briefings in functional genomics and proteomics* **7**, 355-370.
- Dutta R.C., Nagpal S., Salunke D.M. (2008): Functional mapping of apidaecin through secondary structure correlation. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 1005-1015.
- Edman P. (1950): Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *ACTA CHEMICA SCANDINAVICA* **4**, 283-293.
- Erler S., Popp M., Lattorff H.M.G. (2011): Dynamics of Immune System Gene Expression upon Bacterial Challenge and Wounding in a Social Insect (*Bombus terrestris*). *PLoS ONE* **6**, 1-8.
- Evans J.D., Aronstein K., Chen Y.P., Hetru C., Imler J.L., Jiang H., Kanost M., Thompson G.J., Zou Z., Hultmark, D. (2006): Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **15**, 645-656.
- Fennel J.F., Shipman W.H., Cole L.J. (1968): Antibacterial action of melittin, a 17 polypeptide from bee venom. *Experimental Biology and Medicine* **127**, 707-710.
- Fontana R., Mendes M. A., de Souza B. M., Konno K., César L. M. M., Malaspina O., Palma M. S. (2004): Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* **25**, 919-928.
- Fontanals N., Marcé M.R., Borrull F. (2005): New hydrophilic materials for solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry* **24**, 394-406.
- Fournier M.L., Gilmore J.M., Martin-Brown S.A., Washburn M.P. (2007): Multidimensional separations-based shotgun proteomics. *Chem. Rev.* **107**, 3654-3686.
- 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**, 11333-11337.
- Guaní-Guerra E., Santos-Mendoza T., Lugo-Reyes S.O., Teran L.M. (2010): Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin immunol* **135**, 1-11.
- Hennion M. (1999): Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **856**, 3-54.
- Hultmark D. (2003): Drosophila immunity: paths and patterns. *Current Opinion in Immunology* **15**, 12-19.
- Jefferson J.M., Dolstad H.A., Sivalingam M.D., Snow J.W. (2013): Barrier immune effectors are maintained during transition from nurse to forager in the honey bee. *PloS one*, **8**, e54097.
- Ji M., Shi J., Le H., Cho R., Huang C., Miao S., Wong K.B. (2008): A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC-MS/MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B* **862**, 219-226.
- Kanost M.R., Gorman, M.J. (2008): Phenoloxidases in insect immunity. *Insect immunology*, 69-96.

- Karas M., Hillenkamp F. (1988): Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons. *Anal Chem* **60**, 2299-2301.
- Kataoka H. (2003): New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **22**, 232-244.
- Kicman A.T., Parkin M.C., Iles R.K. (2007): An introduction to mass spectrometry based proteomics – detection and characterization of gonadotropins and related molecules. *Molecular and cellular endocrinology* **260-262**, 212-227.
- Klaudiny J., Albert T., Bachanova K., Kopernick J., Simuth J. (2005): Two structurally different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 11-22.
- Krause E., Wenschuh H., Jungblut P.R. (1999): The Dominance of Arginine-Containing Peptides in MALDI-Derived Tryptic Mass Fingerprints of Proteins. *Anal. Chem.* **71**, 4160-4165.
- Kreil G., Haiml L., Suchanek G. (1980): Stepwise cleavage of the pro part of promelittin by dipeptidylpeptidase-iv - evidence for a new type of precursor-product conversion. *European journal of biochemistry* **111**, 49-58.
- Krutchinsky A.N., Chait B.T. (2002): On the nature of the chemical noise in MALDI mass spectra. *American society for mass spectrometry* **13**, 129-134.
- Lambert S. (2009): Disposable Pipette tip Extraction - Leaner, Greener Sample Preparation. *Chromatography Today (June)*, 12-14.
- Lavine M.D., Strand M.R. (2002): Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 1295-1309.
- Lourenco A.P., Guidugli-Lazzarini K.R, Freitas F.C.P. Bitondi M.M.G, Simões Z.L.P. (2013): Bacterial infection activates the immune system response and dysregulates microRNA expression in honey bees. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **43**, 474-482.
- Li W. F., Ma G.X., Zhou X.X. (2006): Apidaecin-type peptides: Biodiversity, structure-function relationships and mode of action. *Peptides* **27**, 2350-2359.
- Lugtenberg B., van Alphen L. (1983): Molecular architecture and functioning of the outer-membrane of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria. *Biochimica et biophysica acta* **737**, 51-115.
- Matsuzaki K., Yoneyama S., Fujii N., Miyajima K., Yamada K., Kirino Y., Anzai K. (1997): Membrane Permeabilization Mechanisms of a Cyclic Antimicrobial Peptide, Tachyplexin I, and Its Linear Analog. *Biochemistry* **36**, 9799-9806.
- Musson D.G., Birk K.L., Cairns A.M., Majumdar A.K., Rogers J.D. (1998): High-performance liquid chromatographic methods for the determination of a new carbapenem antibiotic, L-749,345, in human plasma and urine. *Journal of Chromatography B* **720**, 99-106.
- Nováková L., Vlčková H. (2009): A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta* **656**, 8-35.
- Otvos L., O.I., Rogers M.E., Consolvo P.J., Condie B.A., Lovas S., Bulet P., Blaszczyk-Thurin M. (2000): Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry and Molecular Biology* **39**, 14150–9.
- Otvos L. (2002): The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**, 1138-1150.
- Önnerfjord P., Ekström S., Bergquist J., Nilsson J., Laurell T., Marko-Varga G. (1999): Homogeneous Sample Preparation for Automated High Throughput Analysis with Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-flight Mass Spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry* **13**, 315-322.
- Piantavigna S., Czihal P., Mechler A., Richter M., Hoffmann R., Martin L.L. (2009): Cell Penetrating Apidaecin Peptide Interactions with Biomimetic Phospholipid Membranes. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* **15**, 139-146.

- Powers J.P.S. and Hancock R.E.W. (2003): The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Peptides* **24**, 1681-1691.
- Raj P.A., Dentino R.A. (2002): Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiology Letters* **206**, 9-18.
- Rappsilber, J., Mann, M. and Ishihama, Y. (2007): Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature Protocols* **2**, 1896-1906.
- Salt, G. (1970): Experimental Studies in Insect Parasitism .15. Means of Resistance of a Parasitoid Larva. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **176**, 105-114
- Saunders C.K., Ghanem A., Hon Boon W., Hilder F.E., Haddad R.P. (2009): Separation and sample pre-treatment in bioanalysis using monolithic phases: A review. *Analytica Chimica Acta* **652**, 22-31.
- Siede R., Meixner M. D., Büchler R. (2012): Comparison of transcriptional changes of immune genes to experimental challenge in the honey bee (*Apis mellifera*). *Journal of Apicultural Research* **51**, 320-328.
- Sleno L., Volmer D.A. (2006): Assessing the properties of internal standards for quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of small molecules. *Rapid column mass spectrometry* **20**, 1517-1524.
- Supelco Bulletin (1998): Guide to solid phase extraction. *Sigma-Aldrich Co* **910**, 1-12.
- Szájli E., Féher T., Medzihradzky K.F. (2008): Investigating the Quantitative Nature of MALDI-TOF MS\*. *Molecular and Cellular Proteomics* **7.12**, 2410-2418.
- Turner R.J. (1994) Immunology - A comparative Approach
- Vilmos P. and Kurucz É. (1998): Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology letters* **62**, 59-66.
- Vincent J., Schweitz H., Lazdunski M. (1975): Structure-Function Relationships and Site of Action of Apamin, a Neurotoxic Polypeptide of Bee Venom with an Action on the Central Nervous System. *Biochemistry* **14**, 2521-2525.
- Vizioli J., Salzet M. (2002): Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *TRENDS in Pharmacological Sciences* **23**, 494-496.
- Vorm O., Roepstorff P., Mann M. (1994): Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. *Anal. Chem.* **66**, 3281-3287.
- Wojda I., Kowalski P. and Jakubowicz T. (2004): JNK MAP kinase is involved in the humoral immune response of the greater wax moth larvae *Galleria mellonella*. *Arch Insect Biochem Physiol* **56**, 143-154.
- Yeaman M. R., Yount N. Y. (2003): Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological Reviews* **55**, 27-55.
- Xu Y., Du L., Soli D.E., Braun P.M., Dean C.D., Musson D.G. (2005): Simultaneous determination of a novel KDR kinase inhibitor and its N-oxide metabolite in human plasma using 96-well solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **817**, 287-296.
- Zasloff M. (2003): Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389-395.