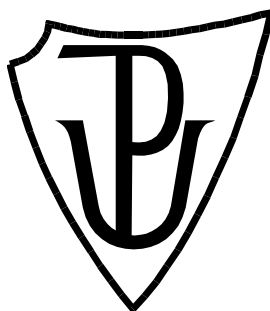


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



## Úloha antimikrobiálních peptidů v imunitní obraně včel při infekcích bakteriálními patogeny

### DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	<b>Bc. Silvie Dostálková</b>
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Konzultant:	Mgr. Jiří Danihlák, Ph.D.
Rok:	2016

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

V Olomouci dne 25. 4. 2016

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu práce doc. Mgr. Markovi Petřivalskému, Dr. za trpělivost při psaní této diplomové práce a cenné připomínky k experimentální části. Velmi bych také chtěla poděkovat svému konzultantovi Mgr. Jířímu Danihlíkovi, Ph.D. za veškerý věnovaný čas, všestrannou pomoc a ochotu kdykoliv se vším poradit.

Můj dík patří také MVDr. Jaroslavu Bzdilovi, Ph.D. za poskytnuté rady z oblasti mikrobiologie a Mgr. Márii Šmečilové, Ph.D. za navržení primerů pro testování a podnětné rady z oblasti molekulární biologie

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také všem zaměstnancům Katedry biochemie za vstřícný a přátelský přístup během celého mého studia.

Tato práce byla podpořena studentským projektem IGA\_PřF\_2015\_026.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Silvie Dostálková
Název práce	Úloha antimikrobiálních peptidů v imunitní obraně včel při infekcích bakteriálními patogeny
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.
Konzultant	Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2016

### Abstrakt

Nedílnou součástí imunitního systému hmyzu jsou rychlé a nespecifické reakce humorálního imunitního systému, při nichž se uplatňují lektiny, lysozym, fenoloxidasa a antimikrobiální peptidy. Mezi zástupce včelích antimikrobiálních peptidů patří peptidy apidaeciny, abaecin, defensiny a jelleiny. V této práci byl optimalizován protokol pro stanovení antimikrobiální aktivity peptidů apidaecinu Ia vůči bakteriálnímu kmenu *Escherichia coli* a jelleinů I a II vůči 9 různým bakteriálním kmenům *Paenibacillus larvae*, který je původcem závažného onemocnění moru včelího plodu.

Antimikrobiální účinek peptidů byl sledován měřením růstových křivek bakterií v tekutém médiu. Antimikrobiální účinek jelleinu I a II nebyl vůči testovaným kmenům *P. larvae* prokázán. Pro kvantifikaci počtu živých a mrtvých bakteriálních buněk po aplikaci antimikrobiálních látek byly zavedeny citlivější metody fluorescenční a luminiscenční. Hodnoty fluorescenčního poměru získané testováním pomocí fluorescein diacetátu a propidium jodidu nevykazovaly linearitu regrese mezi hodnotami fluorescenčního poměru a hodnotami životnosti buněk, navíc fluorescenční signál fluorescein diacetátu byl velice nízký. Naopak stanovení životnosti buněk pomocí resazurinu bylo optimalizováno pro zjištění životnosti bakterií po jejich inkubaci s antimikrobiální látkou. Při měření luminiscence komerčním kitem (BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay, Promega) ošetřených bakteriálních vzorků ošetřených peptidem nebo antibiotikem byl na počátku měření pozorovaný prudký nárůst koncentrace ATP.

Byl zaveden chov včel *in vitro*, kdy experimentální včely byly využity pro studium exprese genů pro MRJP proteiny (major royal jelly proteins), z nichž MRJP1 je

prekurzorovým proteinem jelleinů. Pro měření exprese genů byl optimalizován protokol pro izolaci RNA ze vzorků včelích hlav, přepisu do cDNA a byly navrženy primery pro geny MRJP proteinů.

Včely krmené 30% sacharosou, pylem a patogenem *Ascospaera apis* měli sníženou expresi genů *Mrjp1* a *Mrjp2* ve srovnání s kontrolní skupinou, včely krmené 30% sacharosou, pylem a patogenem *P. larvae CCM 4483* měli sníženou expresi genů *Mrjp2* v porovnání se včelami krmenými jen 30% sacharosou a pylem. U včel, které byly krmeny stejným patogenem, ale bez přídavku pylu, nebyla exprese genu *Mrjp2* signifikantně odlišná od kontrolní skupiny.

Klíčová slova	včela medonosná, antimikrobiální peptidy, jelleiny, <i>Paenibacillus larvae</i> , MRJP proteiny
Počet stran	76
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname Bc. Silvie Dostálková

Title The role of antimicrobial peptides in bee immune responses to infections by bacterial pathogens

Type of thesis Master

Department Department of biochemistry

Supervisor doc. Mgr. Marek Petřivalský, Dr.

The year of presentation 2016

### Abstract

Nonspecific and fast reactions of humoral immunity are an integral part of insect immune system. Lectins, lysozymes, phenoloxidase and antimicrobial peptides belong to humoral immunity and play essential role in immune system. The representatives of bee antimicrobial peptides include peptides apidaecins, abaecin, defensins and jelleines. In this work an optimized protocol was developed for determining the antimicrobial activity of the peptides apidaecin Ia against bacterial strains of *Escherichia coli* and jelleines I and II against 9 bacterial strains of *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American foulbrood disease.

The antimicrobial effect of the peptides was monitored by measuring the growth curves of the bacteria in liquid medium. No antimicrobial effect of jellein I and II against tested strains of *P. larvae* was monitored. To quantify the number of live and dead bacterial cells after application of antimicrobial substances, more sensitive fluorescence and luminescence methods were introduced. The values of fluorescence ratio obtained by testing with fluorescein diacetate and propidium iodide did not show linearity with viability of the cells, in addition the fluorescence signal of fluorescein diacetate was very low. On the other hand, determination of cell viability by fluorescent dye resazurin was optimized for the detection of bacterial viability after incubation with an antimicrobial substance. During the measurement of luminescence using a commercial kit (Bacteria-Glo™ Microbial Cell Viability Assay, Promega) on bacterial samples treated with peptides or antibiotics, a fast increase in the concentration of ATP was observed at the beginning of the measurements.

Method for rearing bees in vitro was introduced when experimental groups of bees were used for studying the expression of genes for MRJP proteins, among which the

MRJP1 is precursor protein of jelleines. For the measurement of gene expression protocols have been optimized for RNA isolation from bee heads, transcription into cDNA and primers were designed for the genes of MRJP proteins.

Bees fed with 30% sucrose, pollen and pathogen *Ascosphaera apis* had decreased expression of the genes *Mrjp1* and *Mrjp2* compared to control group, bees fed with 30% sucrose, pollen and pathogen *P. larvae* CCM 4483 had downregulated expression of genes *Mrjp2* in comparison to bees fed only 30% sucrose and pollen. Bees fed the same pathogen, but without addition of pollen did not significantly differ in gene expression of *Mrjp2* from the control group.

Keywords	honey bee, antimicrobial peptides, jelleines, <i>Paenibacillus larvae</i> , MRJP protein family
Number of pages	76
Number of appendices	0
Language	Czech

## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	11
<b>2</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	12
2.1	Imunitní systém hmyzu .....	12
2.1.1	Sociální imunita .....	12
2.1.2	Buněčná imunita.....	13
2.1.3	Humorální imunita .....	13
2.2	Antimikrobiální peptidy včely medonosné .....	19
2.2.1	Apidaeciny .....	19
2.2.2	Abaecin .....	20
2.2.3	Defensiny .....	20
2.2.4	Jelleiny .....	21
2.2.5	Peptidy včelího jedu.....	22
2.3	MRJP proteiny.....	23
2.3.1	Expresa MRJP proteinů v organismu včel.....	24
2.3.2	Vlastnosti a funkce MRJP proteinů .....	25
2.4	Studium exprese parametrů humorální imunity v průběhu bakteriální infekce.....	26
2.5	Metody studia aktivity antimikrobiálních peptidů .....	27
2.6	Chov včel <i>in vitro</i> .....	29
2.6.1	Bakteriální patogeny .....	30
2.6.2	Parazitické houby .....	30
2.6.3	Metody infikování včel bakteriálními patogeny .....	31
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	32
3.1	Materiál .....	32
3.1.1	Chemikálie .....	32
3.1.2	Biologický materiál.....	32
3.1.3	Přístroje a vybavení.....	33
3.1.4	Synteticky připravené antimikrobiální peptidy.....	34
3.1.5	Použité roztoky a média .....	34
3.1.6	Použité kity .....	35
3.2	Metody.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2.1	Příprava zásobních roztoků peptidů.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2.2	Kultivace mikroorganismů a příprava bakteriální kultury pro testování antimikrobiální aktivity peptidů.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2.3	Stanovení počtu kolonií tvořících jednotku v suspenzi bakteriální kultury.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>



3.2.4	Měření růstové křivky bakterií.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2.5	Stanovení životnosti bakterií pomocí fluorescein diacetátu (FDA) a propidium jodidu (PI).....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2.6	Stanovení životnosti bakterií pomocí resazurinu	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2.7	Stanovení životnosti bakterií pomocí luminiscence	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2.8	Izolace a přečištění RNA z hltanových žláz včely medonosné.....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2.9	Přepis izolované RNA na cDNA pomocí reakce reversní transkriptasy	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2.10	Primery používané pro PCR reakce .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2.11	Kvantitativní PCR (qPCR).....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
3.2.12	Chov včely medonosné <i>in vitro</i> .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.1	Stanovení počtu kolonií tvořících jednotku v suspenzi bakteriální kultury	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.2	Měření růstových křivek bakterií .....	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.3	Stanovení životnosti bakterií pomocí fluorescenčních a luminiscenčních metod	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.3.1	Metoda využití fluorescein diacetátu (FDA) a propidium jodidu (PI)	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.3.2	Stanovení životnosti bakterií pomocí resazurinu	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.3.3	Stanovení životnosti bakterií pomocí luminiscence	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.3.4	Spotřeba pylu u <i>in vitro</i> chovaných experimentálních skupin včel	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4	Optimalizace protokolu pro studium exprese MRJP proteinů	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4.1	Izolace RNA a následný přepis RNA na cDNA	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4.2	Validace primerů pro provozní geny ...	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4.3	Testování primerů navržených pro MRJP proteiny	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
4.4.4	Relativní kvantifikace exprese genů pro MRJP proteiny	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>Chyba! Záložka není definována.</b>
<b>7</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>42</b>



## **Cíle práce**

1. Cílem práce je optimalizace protokolu pro studium antimikrobiální aktivity včelích antimikrobiálních peptidů a sledování změn v expresi antimikrobiálních peptidů v průběhu nákazy včely medonosné vybranými patogeny
2. V rámci teoretické části bude vypracovaná rešerše zaměřená na problematiku:
  - imunitního systému hmyzu a antimikrobiálních peptidů včel
  - MRJP proteinů
  - testování antimikrobiální aktivity peptidů a metod používaných pro studium jejich aktivity
3. V praktické části budou realizovány experimenty zaměřené na:
  - optimalizaci protokolu pro testování antimikrobiální aktivity peptidů
  - testování antimikrobiální aktivity peptidů proti různým patogenním i nepatogenním bakteriálním kmenům
  - kvantifikaci exprese a hladiny včelích antimikrobiálních peptidů v reakci na bakteriální infekci

## 1 Úvod

Včela medonosná (*Apis mellifera*) je celosvětově rozšířený, hospodářsky velmi významný eusociální hmyzí druh. Tento hmyz je velmi důležitý zejména pro svou přirozenou opylovací schopnost, která je nezbytná pro pěstování nejen hospodářsky významných plodin, ale i pro rozmnožování rostlin rostoucích ve volné přírodě. Včelí produkty jsou hojně využívány nejen v potravinářství (med), ale i pro své léčebné účinky (propolis, včelí jed, mateří kašička).

Studium imunitního systému hmyzu nabývá v posledních letech na důležitosti. Dobře vyvinutá nespecifická imunita hmyzu s velmi rychlou imunitní odpovědí představuje nové možnosti při hledání vysoce účinných látek především vůči bakteriálním patogenům, proti kterým jsou reakce nespecifické imunity převážně zaměřeny. Příkladem mohou být například antimikrobiální peptidy, jejichž inhibiční aktivita vůči bakteriím vede k jejich potencionálnímu využití pro léčbu bakteriálních onemocnění.

Problematika antimikrobiálních peptidů již byla studována v rámci mé bakalářské práce (Dostálková, 2014), kdy byla optimalizována metoda testování antimikrobiální aktivity peptidů pomocí difúzních testů. V rámci bakalářské práce byly také provedeny prvotní experimenty s využitím metody měření růstových křivek bakterií. Tato diplomová práce navazuje na dříve provedené experimenty z testování antimikrobiální aktivity vybraných peptidů (apidaecin Ia, jellein I a jellein II).

Studium exprese jednotlivých komponent imunitního systému včel a vlivu včelích patogenů na imunitní systém může vést k důležitým poznatkům, které mohou být nápomocné i při praktickém včelaření. Sledování jednotlivých komponent humorální imunity může v budoucnu pomoci selektovat včelstva odolnější vůči chorobám, či poukázat na škodlivost některých chemikálií využívaných v zemědělství a jejich účinku na včely.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Imunitní systém hmyzu

Imunitní systém bezobratlých je založen na nespecifických imunitních reakcích (neadaptivní neboli vrozená imunita). Nespecifické složky imunity se vyznačují rychlou imunitní odpovědí, ale na rozdíl od specifických imunitních mechanismů obratlovců (adaptivní imunita) nemají tzv. imunologickou paměť. U hmyzu je nespecifická imunitní odpověď tvořena třemi základními úrovněmi – fyzikální bariérou, buněčnou imunitou a humorální imunitou.

Fyzikální bariéru představuje kutikula, slizová vrstva, či stěna střeva, které znesnadňují vstup patogenů do organismu. Můžeme sem také zařadit i fyziologické změny pH (např. změna pH v trávicím traktu hmyzu) nebo biofilm symbiotických mikroorganismů, zabraňující mikrobiální invazi (Crailsheim a Riessberger-Galle, 2001; Olofsson a Vásquez, 2008; Evans a Spivak, 2010). Po narušení fyzikální bariéry dochází v rámci imunitního systému k aktivaci druhé obranné linie v podobě buněčné a humorální imunity.

#### 2.1.1 Sociální imunita

Včela medonosná (*Apis mellifera*) patří mezi zástupce eusociálního hmyzu (tj. hmyz žijící ve společenstvích o několika stovkách až tisících jedinců stejného druhu). V rámci společenství mezi sebou včely dokážou spolupracovat například při zajišťování výživy nebo při obraně před predátory. V rámci takové spolupráce byla mezi druhy eusociálního hmyzu vyvinuta také obranyschopnost celého společenstva, která je založena právě na spolupráci mezi jednotlivci – „sociální imunita“ (Cremer *et al.*, 2007). Mezi obranné mechanismy sociální imunity u včelstev patří hygienické chování včelstva a tzv. „grooming“. V rámci hygienického chování včelstva probíhá vyklizení uhynulého, nemocného plodu buď jeho vynesemím ven z úlu, nebo jeho konzumací (Panasiuk *et al.*, 2010). Toto chování je velmi efektivní při snižování infekčního tlaku z okolí. Druhým obranným mechanismem sociální imunity je „grooming“ - vzájemné čištění včel od roztočů na jejich tělech (Evans a Spivak, 2010). Sociální imunita vytváří tedy jakousi další ochrannou vrstvu při obraně včelstva vůči patogenům.

### 2.1.2 Buněčná imunita

Na buněčné imunitě hmyzu se podílí cytotoxicita (tvorba látek cytotoxických pro cizí buňky), fagocytóza (pohlčení patogenu imunitní buňkou), nodulace (zachycení agregací buněk kolem patogena), enkapsulace (zapouzdření větších patogenů) a koagulace (Turner, 1994; Gillespie a Kanost, 1997). Tyto mechanismy jsou zajišťovány specifickými buňkami – hemocyty. V hemolymfě hmyzu se nejčastěji vyskytují prohemocyty, plasmocyty, granulocyty, sferulocyty a oenocyty (Lavine a Strand, 2002). Zastoupení hemocytů v organismu se mění s věkem (Turner, 1994; Amaral *et al.*, 2010). Některé hemocyty produkují také látky účastníci se humorální imunitní odpovědi, což vede k úzkému propojení těchto dvou složek imunitního systému a nelze je tedy ostře vymezit.

### 2.1.3 Humorální imunita

Jednotlivé aktivní molekuly tvoří humorální imunitu (látkovou imunitu). Mezi tyto molekuly se zařazují lektiny (aglutininy), lysozym, fenoloxidasa a antimikrobiální peptidy (Turner, 1994). Tyto látky jsou většinou sekretovány v tukovém tělese. Mohou však také být i konstitutivně produkovány a vždy přítomny v hemolymfě (např. lektiny). Obsah těchto látek v organismu mnohdy závisí také na pohlaví a fázi vývoje (např. aktivita fenoloxidasy) (Turner, 1994; Evans *et al.*, 2006; Laughton *et al.*, 2011).

#### 2.1.3.1 Lektiny

Lektiny jsou definovány jako glykoproteiny neimunitního původu, které mají schopnost rozpoznávat glykosylované části na buněčné stěně bakterií a vázat se na ni. Takto navázané lektiny aglutinují na povrchu patogena, čímž usnadňují další imunitní zásahy jako je fagocytóza, enkapsulace a melanizace (Boman a Hultmark, 1987).

#### 2.1.3.2 Lysozym

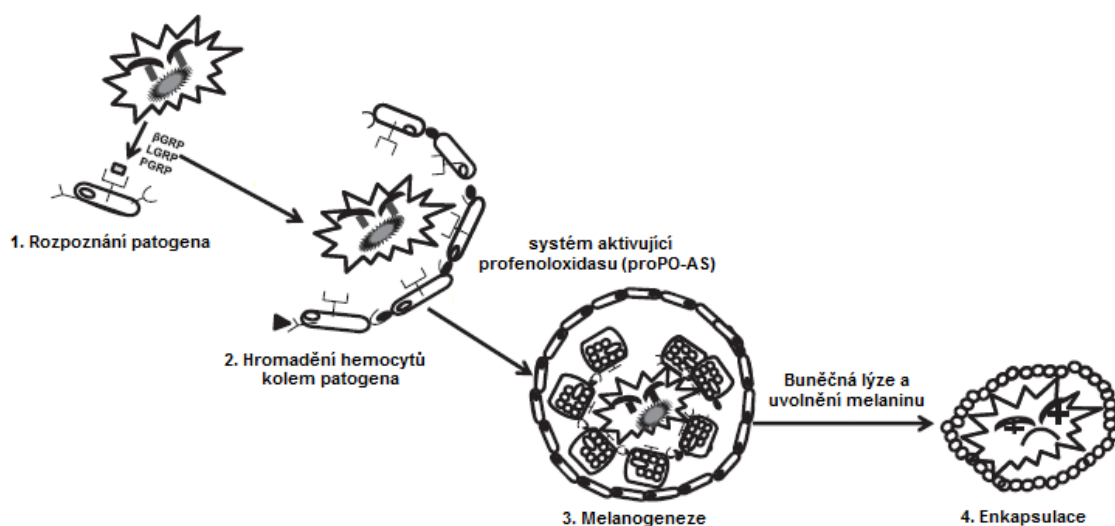
Lysozym (EC 3.2.1.17) hydrolyzuje  $\beta$ -1,4,-glykosidovou vazbu mezi *N*-acetylmuramovou kyselinou a *N*-acetyl-D-glukosaminem v peptidoglykanu mureinu, který tvoří základní složku bakteriálních buněčných stěn a vazbu mezi *N*-acetyl-D-glukosaminovými zbytky chitinu v buněčných stěnách hub. V rámci živočišné říše se vyskytují tři typy lysozymů – c-typ (chicken – kuřecí typ), g-typ (goose – husí) a i-typ (invertebrate – bezobratlí). Přestože se jednotlivé lysozomy sekvenčně liší, strukturně jsou si velmi podobné. Předpokládá se tedy, že vznikly z jednoho bílkovinného prekurzoru. U bezobratlých se vyskytuje c-typ a i-typ

lysozymu. G- typ lysozymu se vyskytuje především u strunatců, ale geny odpovídající tomuto typu lysozymů byly nalezeny i u některých mlžů (Callewaert a Michiels, 2010).

U včel dochází k expresi tří typů lysozymů a to dvou c-lysozymů a jednoho i-lysozymu. Koncentrace lysozymu v hemolymfě u larev a dospělých včel se pohybuje mezi 5-25  $\mu\text{g/ml}$ . Při nákaze může tato koncentrace vzrůst až na hladinu 1300  $\mu\text{g/ml}$  u larev, u dospělých včel na 40  $\mu\text{g/ml}$  (Glinski a Jarosz, 1993).

### 2.1.3.3 Fenoloxidasová kaskáda

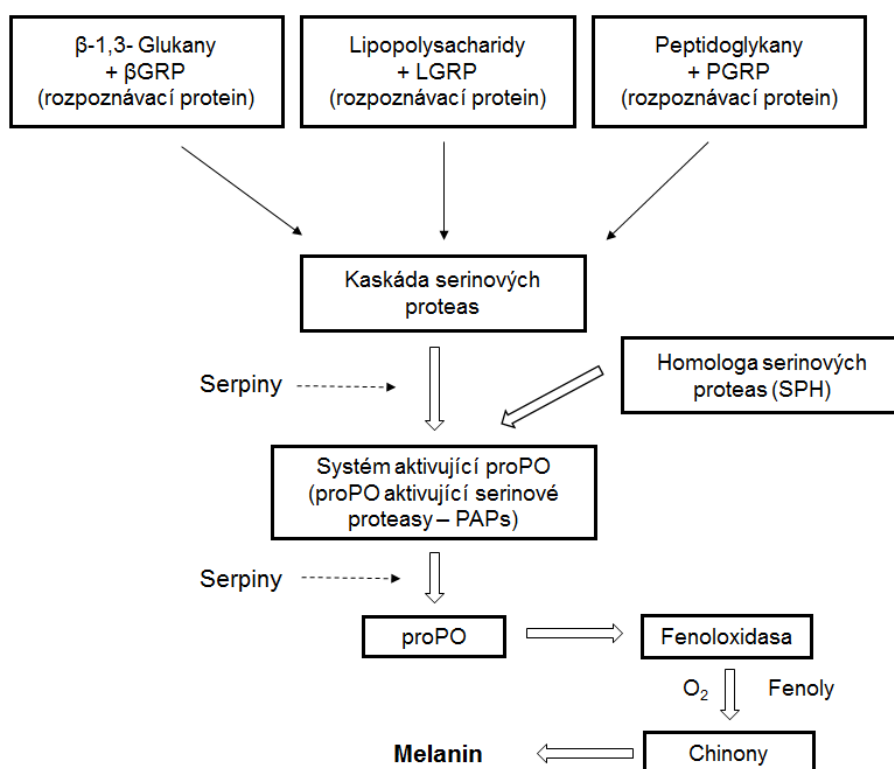
Fenoloxidasa (PO, EC 1.14.18.1) je enzym účastnící se obranných reakcí a procesu hojení poškozených tkání. Konečným produktem fenoloxidasové reakce jsou indolové sloučeniny, které jsou následně polymerizovány na melanin. Melanin se uplatňuje v procesu melanizace (Obr. 1), kdy dochází k jeho hromadění (nodulace, enkapsulace) v místě poškozených tkání nebo v okolí patogena (Boman a Hultmark, 1987; Cerenius a Söderhäll, 2004). Enzymová reakce PO produkuje celou řadu meziproductů (chinony, difenoly, superoxidové a peroxidové radikály), které se uplatňují při obraně vůči patogenům (Gram-pozitivní, Gram-negativní bakterie; houby a viriony) (Ashida a Brey, 1997).



Obr. 1: Proces melanizace probíhající ve čtyřech krocích. 1 – rozpoznání patogena pomocí specifických molekul na jeho povrchu. 2 – hemocyty obklopují patogena. 3 – proces melanogeneze probíhající uvnitř hemocytů. 4 – uvolnění melaninu a enkapsulace patogena (upraveno dle Santoyo a Córdoba-Aguilar, 2012).

Kvůli vznikajícím toxickým meziproductům je nutný komplexní systém aktivace a inhibice fenoloxidasové kaskády, na kterém se podílejí inaktivní PO zymogeny – profenoloxidasy (proPO), inhibitory a signální molekuly (Santoyo a Córdoba-Aguilar, 2012). PO je tedy exprimována ve formě inaktivních zymogenů proPO. Syntéza proPO probíhá nejčastěji v hemocytech (Cerenius a Söderhäll, 2004). U včel se vyskytuje na rozdíl od jiných druhů hmyzu, pouze jeden gen pro syntézu proPO (Evans *et al.*, 2006).

Aktivační systém fenoloxidasové reakce (Obr. 2) je spouštěn přítomností sloučenin mikrobiálního původu v organismu ( $\beta$ -1,3-glukany z buněčných stěn hub, lipopolysacharidy a peptidoglykany z buněčných stěn bakterií) na něž se navážou rozpoznávací proteiny (bGRP, LGRP, nebo PGRP) (Cerenius a Söderhäll, 2004). Vazbou rozpoznávacích proteinů dochází k aktivaci serinové kaskády. Serinové proteasy spouští systém aktivující profenoloxidasu (proPO-AS) a tím dochází k rozštěpení inaktivní formy proPO na aktivní PO. Aktivní fenoloxidasa se poté zapojuje při oxygeanci fenolů na o-difenoly a oxidaci o-difenolů na o-chinony (Santoyo a Córdoba-Aguilar, 2012). Regulace serinové kaskády je zajištěna inhibitory ze superrodiny serpinů.



Obr. 2: Schéma aktivačního systému fenoloxidasové reakce (upraveno dle Cerenius a Söderhäll, 2004; Santoyo a Córdoba-Aguilar, 2012).



#### 2.1.3.4 Antimikrobiální peptidy

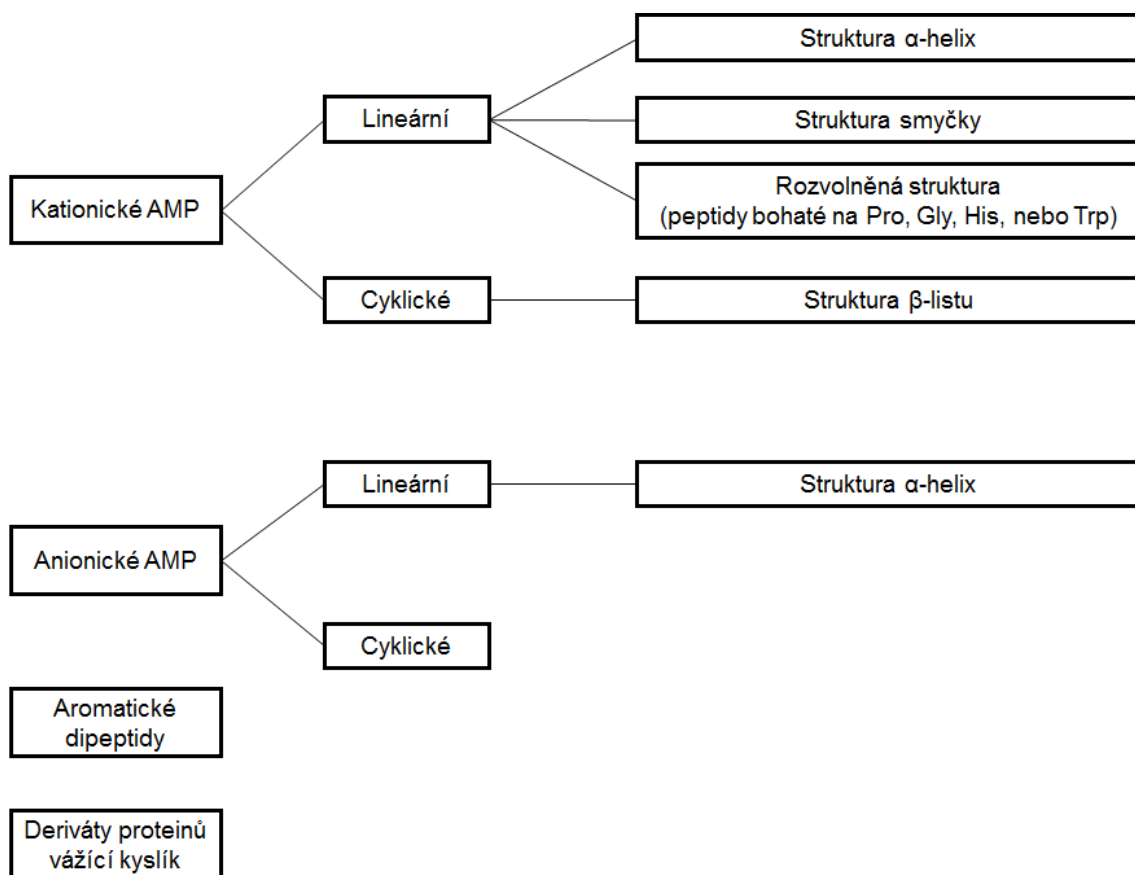
Antimikrobiální peptidy (AMP) lze charakterizovat jako látky mající krátký aminokyselinový řetězec (30 - 60 aminokyselin). Vyznačují se tepelnou stabilitou a většina těchto peptidů má pozitivní náboj. Ten umožňuje vazbu antimikrobiálních peptidů na povrch membrán prokaryotických buněk a jejich další působení na buňku, které vede až k buněčné smrti. AMP jsou produkovány napříč všemi organismy od prokaryot až po eukaryota (Li *et al.*, 2012).

Mechanismus účinku AMP je založen na schopnosti peptidu vázat se na bakteriální membrány a jeho následném působení na bakteriální buňku. Mechanismy účinku u jednotlivých AMP se značně odlišují, obecně je lze rozdělit na dva základní mechanismy. První typ mechanismu účinku spočívá v interakci AMP s buněčnými membránami, kdy dochází k narušení cytoplasmatické membrány (CM) (tvorba pórů v CM, lýze), které vede k narušení membránového potenciálu a úniku vnitřního obsahu buňky. Druhý mechanismus je založen na průniku peptidu CM a jeho následné interakci s vnitrobuněčnými cíli. Mezi tyto vnitrobuněčné cíle patří např. replikace DNA a proteosyntéza, skládání proteinů, syntéza buněčné stěny a inhibice enzymové aktivity. AMP mohou zasáhnout i do procesů buněčného dělení nebo energetických dějů v eukaryotních organelách (Brodgen, 2005; Teixeira *et al.*, 2012).

V imunitním systému hmyzu hrají AMP velkou úlohu právě jako součást humorální imunity, jsou syntetizovány jako obranná odpověď vůči patogenům. AMP jsou geneticky kódované a syntetizované na ribozomech. Jejich syntéza v hmyzím organismu probíhá v tukovém tělísku, ale i v hemocytech, ve střevech, slinných žlázách a reprodukčním ústrojí (Vilmos a Kurucz, 1998). Aktivní peptidy jsou poté sekretovány do hemolymfy (Li *et al.*, 2012).

Produktem exprese některých hmyzích AMP jsou neaktivní proteinové prekurzory. Jejich aktivace probíhá až po napadení organismu bakteriálním patogenem, kdy se z neaktivního prekurzoru odštěpí pomocí proteas aminokyselinové sekvence aktivních peptidů. Mezi AMP, které jsou exprimovány ve formě neaktivních prekurzorů, patří například melittin, apidaeciny nebo cecropin (Kreil *et al.*, 1980; Casteels-Josson *et al.*, 1993; Dickinson *et al.*, 1988).

AMP lze obecně rozdělit podle struktury na cyklické a lineární a podle náboje na peptidy kationtové a aniotové. Dále také podle zvýšeného obsahu konkrétních AK, jak je uvedeno na schématu (Obr. 3) (Andreu a Rivas, 1998; Powers a Hancock, 2003; Neubauerova *et al.*, 2009; Yi *et al.*, 2014). U hmyzu bylo dosud identifikováno více než 200 AMP. Tyto hmyzí peptidy se rozdělují do pěti samostatných skupin na základě jejich aminokyselinové sekvence a antimikrobiální aktivity: cecropiny, hmyzí defensiny, peptidy bohaté na glycin, peptidy bohaté na prolin (Li *et al.*, 2012).



Obr. 3: Schéma rozdělení antimikrobiálních peptidů (upraveno dle Andreu a Rivas, 1998; Powers a Hancock, 2003).

- a) Cecropiny - patří mezi první AMP, které byly úspěšně izolovány a charakterizovány (Brey a Hultmark, 1998). Jsou si strukturně velmi podobné. Celková aminokyselinová sekvence těchto peptidů je složena z 35-39 AK a v jejich struktuře není obsažen cystein. (Li *et al.*, 2012). Hmyzí cecropiny vytvářejí dva lineární řetězce  $\alpha$ -helix, které jsou vzájemně propojeny Ala-Gly-Pro pantem (Steiner, 1982; Holak *et al.*, 1988). Vyznačují se silně bazickou N-terminální sekvencí a silně hydrofobním úsekem v C-terminální části (Steiner *et al.*, 1981).
- b) Hmyzí defensiny - jsou tvořeny sekvencí 36-51 AK a obsahují šest konzervovaných cysteinových reziduí. Struktura je tvořena  $\alpha$ -helix smyčkou a dvěma antiparalelními  $\beta$ -skládanými listy, které jsou stabilizovány cysteinovými disulfidovými můstky (Otvos, 2000a; Klaudiny *et al.*, 2005). Ve struktuře těchto peptidů se hojně vyskytují arginin a lysin, které udávají těmto peptidům silný kladný náboj (Otvos, 2000a). Do skupiny defensinů patří i royalisin izolovaný z mateří kašičky včely medonosné (Fujiwara *et al.*, 1990).
- c) Peptidy bohaté na glycin – vysoký obsah glycinových reziduí v sekvenci těchto peptidů má velký vliv na jejich terciární strukturu a mechanismus účinku (Li *et al.*, 2012). Nejznámějšími zástupci jsou attaciny (Hultmark *et al.*, 1983), sacrotoxiny (Natori, 1977), a malý protein hymenoptacin izolovaný z včely medonosné (Casteels *et al.*, 1993).
- d) Peptidy bohaté na prolin - obsahují ve své struktuře zvýšený obsah prolinových reziduí. Vytvářejí rozvolněné molekuly složené z 14-59 AK. V jejich struktuře se často objevují triplety a dublety prolinu s bazickými aminokyselinami argininem a histidinem (Pro-Arg-Pro; Pro-His-Pro) (Bulet a Stöcklin, 2005). Mezi nejvýznamnější zástupce této skupiny patří apidaeciny (Casteels *et al.*, 1989) a abaeciny (Casteels *et al.*, 1990, Yoshiyama a Kimura, 2010) izolované z včely medonosné a drosocin izolovaný z octomilky obecné (*Drosophila melanogaster*) (Bulet *et al.*, 1993).

## 2.2 Antimikrobiální peptidy včely medonosné

Mezi první AMP, které byly detekovány u včely medonosné (*Apis mellifera*), patří apidaeciny, abaecin a malý protein hymenoptacin vyskytující se v hemolymfě (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990; Casteels *et al.*, 1993). AMP byly také detekovány v mateří kašičce včel a to peptid royalisin, patřící do skupiny defensinů (Fujiwara *et al.*, 1990) a jelleiny (Fontana *et al.*, 2004).

Mezi další zástupce AMP včely medonosné patří také melittin, apamin, adolapin a MCD peptid, vyskytující se ve včelím jedu (Fennell *et al.*, 1968; de Lima a Brochetto-Braga, 2003).

### 2.2.1 Apidaeciny

Apidaeciny izolované ze včely medonosné mají sekvenci 18 AK. Tyto peptidy jsou bohaté na prolin a u včel se vyskytují ve 4 isoformách Ia, Ib, II a III (Tab. 1). Složení jednotlivých isoform se liší záměnou 6. AK na N-konci valinu za isoleucin (isoformy II, a III), nebo záměnou koncové AK isoleucinu za leucin (isoforma Ia a Ib) (Casteels *et al.*, 1989). Isoforma III má nahrazenou 9. AK prolin za serin. Isoforma III peptidu apidaecinu nebyla dosud jako jediná v organismu včely detekována, její existence je pouze predikovaná (Li *et al.*, 2006).

Syntéza apidaecinů probíhá z jedné prekurzorové molekuly, která je proteolyticky sestřižena na jednotlivé sekvence propeptidů, posléze aktivních peptidů. Casteels-Josson *et al.* (1993) popisují na základě analýzy cDNA knihovny tři varianty pro geny apidaecinů – *Apid14*, *Apid 22* a *Apid73* kodující prekurzorový protein.

Apidaeciny se vyznačují vysokou antimikrobiální aktivitou vůči Gram-negativním bakteriím. Nebyla u nich pozorována antimikrobiální aktivita vůči kvasinkám a houbám. Mechanismus účinku těchto peptidů je založen na intracelulárním působení, a to navázáním peptidu na bakteriální chaperon DnaK a chaperonin GroEL vedoucím k inhibici skládání proteinů (Casteels a Tempst, 1994; Otvos, 2000b).

Tab. 1: Jednotlivé isoformy apidaecinu vyskytující se u včely medonosné (upraveno dle Li *et al.*, 2006; Casteels *et al.*, 1989; Casteels-Josson *et al.*, 1993). Tučně vyznačeny odlišnosti v aminokyselinové sekvenci (převzato z Danihlík, 2015).

Isoforma	Peptidová sekvence	Uniprot číslo	Název genu	Počet kopií/gen
Ia	GNNRPF <b>V</b> YIPQPRPPHP <b>R</b> I	Q06601	<i>Apid14</i>	1
		P35581	<i>Apid22</i>	1
		Q06602	<i>Apid73</i>	1
Ib	GNNRPF <b>V</b> YIPQPRPPHP <b>R</b> L	Q06601	<i>Apid14</i>	2
		P35581	<i>Apid22</i>	3
		Q06602	<i>Apid73</i>	6
II	GNNRPF <b>I</b> YIPQPRPPHP <b>R</b> L	Q06601	<i>Apid14</i>	2
III	GNNRPF <b>V</b> YISQPRPPHP <b>R</b> L	Q06602	<i>Apid73</i>	2

### 2.2.2 Abaecin

Casteels *et al.* charakterizovali abaecin poprvé v roce 1990. Aminokyselinová sekvence tohoto peptidu je YVPLPNVPQPGRRPFPTFPGQGPFNPKIKWPQGY s celkovým počtem 34 AK. Abaecin obsahuje sekvence podobné apidaecinům a diptericinům, ale díky fyziologickým rozdílům je tento peptid klasifikován samostatně mimo tyto dvě skupiny peptidů (Casteels *et al.*, 1990). Syntéza abaecinu probíhá z jedné prekurzorové molekuly, aktivní peptid je získán odštěpením sekvence 19 AK nacházejících se před aktivním peptidem (Casteels-Josson *et al.*, 1994). Antimikrobiální aktivita abaecinu byla pozorována vůči Gram-negativním (G-) i Gram-pozitivním (G+) bakteriím. Proti G- bakteriím je však méně účinný než apidaecin.

### 2.2.3 Defensiny

U včely medonosné byly dosud identifikovány dva typy defensinů. Defensin izolovaný z hemolyfmy (Casteels-Josson *et al.*, 1994) a royalisin izolovaný z mateří kašičky (Fujiwara *et al.*, 1990). Na základě analýzy genomu včely bylo později zjištěno, že v organismu včely jsou kódovány dvě isoformy defensinů – defensin-I a defensin-II (Klaudiny *et al.*, 2005). Defensin vyskytující se v hemolymě i royalisin z mateří kašičky odpovídají isoformě defensinu I. Oba dva defensiny se od sebe sekvenčně odlišují. Defensin-I obsažený v hemolymfě obsahuje na C-konci peptidu fenylalanin (amidový C-konec). Royalisin obsahuje ve své aminokyselinové sekvenci na pozici 50 tyrosin místo argininu vyskytujícího se u defensinu-I z hemolymfy (Casteels, 1998).

Isoforma defensinu-II je pouze predikovaná na základě analýzy cDNA a dosud nebyla nalezena v aktivní formě peptidu (Klaudiny *et al.*, 2005).

#### 2.2.4 Jelleiny

Jelleiny byly poprvé izolovány z mateří kašičky afrikanizovaných včel (*Apis mellifera scutellata*). Jsou složeny ze sekvence 8-9 AK a objevují se ve čtyřech isoformách - jellein I, jellein II, jellein III a jellein IV (Tab. 2). Jednotlivé isoformy se od sebe odlišují změnami v AK sekvenci. Jellein I neobsahuje na rozdíl od jelleinu II na N-konci threonin, jellein III obsahuje jako poslední AK na N-konci kyselinu glutamovou. Jellein IV nemá na rozdíl od ostatních jelleinů na C-konci leucin (Fontana *et al.*, 2004).

Antimikrobiální aktivita těchto peptidů byla pozorována vůči G<sup>+</sup>, G<sup>-</sup> bakteriím i kvasinkám. Jednotlivé isoformy jelleinů vykazují odlišnou antimikrobiální aktivitu, což je pravděpodobně způsobeno právě změnami v jejich struktuře. Největší antimikrobiální aktivitu vykazuje jellein I, který působí na G<sup>+</sup>, G<sup>-</sup> bakterie i kvasinky. Vyšší antimikrobiální aktivita jelleinu I je způsobena přítomností prolinu na první pozici N-konce peptidu, což bylo potvrzeno simulacemi molekulové dynamiky peptidu (dos Santos Carbera *et al.*, 2014). Obdobnou aktivitu jako jellein I má i jellein II, ovšem jeho minimální inhibiční koncentrace jsou už vyšší (někdy až o 20 µg/ml). Jellein III vykazuje pouze slabou antimikrobiální aktivitu vůči bakteriálním kmenům a u jelleinu IV nebyla doposud antimikrobiální aktivita prokázána, což je pravděpodobně způsobeno chybějícím leucinem na C-konci peptidu (Fontana *et al.*, 2004, Romanelli *et al.*, 2011).

Tab. 2: Formy jelleinů vyskytující se v mateří kašičce včel. Tučně vyznačeny odlišnosti v aminokyselinové sekvenci (upraveno dle Fontana *et al.*, 2004).

Peptid	Peptidová sekvence
Jellein I	PFKIS <sup>I</sup> IHL
Jellein II	<b>T</b> PFKIS <sup>I</sup> IHL
Jellein III	<b>E</b> PKIS <sup>I</sup> IHL
Jellein IV	TPFKIS <sup>I</sup> HL

Nižší aktivita jelleinu II, III a IV je také připisována přítomnosti threoninu a kyselině glutamové v sekvenci peptidů. Tyto AK přitahují molekuly vody k N-konci peptidu, což může být příčinou snížené interakce peptidu s membránou (dos Santos Carbera *et al.*, 2014). Na základě studia interakce jelleinu I s povrchy membrán byla také pozorována tendence peptidu agregovat na hydrofilních koncích membrán. Předpokládaným mechanismem účinku těchto peptidů je tedy narušení povrchu membrány a tvorba pórů vedoucích k úniku vnitřního obsahu ven z buňky (dos Santos Carbera *et al.*, 2014).

Jelleiny jsou syntetizovány průběžně ve žlázách dělnic a sekretovány do mateří kašičky, kde se uplatňují v boji vůči patogenům. Jsou syntetizovány v podobě jednoho velkého pekurzorového proteinu MRJP-1, který je poté pomocí exoproteinas štěpen na jednotlivé isoformy jelleinů (Fontana *et al.*, 2004).

### 2.2.5 Peptidy včelího jedu

Nejvíce obsaženým peptidem včelího jedu je melittin (40-60% hmotnosti sušiny). Aminokyselinová sekvence tohoto peptidu obsahuje 26 residuí, které udávají peptidu amfipatický charakter. Melittin velmi dobře interaguje s lipidovými membránami, což vede ke zvýšení jejich propustnosti (de Lima a Brochetto-Braga, 2003). Jeho tetramerní struktura má vlastnosti ionoforu a je zodpovědná za bolest způsobenou včelím bodnutím (Edstrom, 1992).

Chemickou podobnost vykazují další peptidy včelího jedu apamin a MCD peptid (mastocyte degranulating peptide). Apamin je malý peptid (složen ze sekvence 18 AK) a pravděpodobně se podílí na blokaci post-synaptických iontových kanálků (Hider a Ragnarson, 1981). MCD peptid má podobné vlastnosti jako apamin. Je mu však přiřazována hlavní úloha při vylučování histaminu (Edstrom, 1992).

### 2.3 MRJP proteiny

Mateří kašička (MK) je produkována hltanovými žlázami mladých včelích dělnic. Je hlavní složkou potravy včelích larev a nezbytnou komponentou pro vývoj včelí matky (Obr. 4). Složení mateří kašičky se v průběhu stáří larvy mění, obecně je však MK tvořena vodou (60 - 70%), proteiny (12-15%), sacharidy (10-16%), lipidy (3-6%), vitamíny a aminokyselinami. Proteiny rozpustné ve vodě tvoří 46-89% z celkového počtu proteinů (Takenaka, 1982; Howe *et al.*, 1985; Chen a Chen, 1995).

Hlavní skupinou proteinů zastoupených v mateří kašičce je rodina proteinů MRJPs (major royal jelly proteins). Tyto proteiny tvoří až 82-90 % z celkového proteinového obsahu MK. Na základě analýzy cDNA knihovny bylo detekováno pět základních proteinů z této rodiny – MRJP1, MRJP2, MRJP3, MRJP4, MRJP5. Proteiny MRJP3 a MRJP5 byly na základě této analýzy identifikovány jako polymorfní (Schmitzová *et al.*, 1998). Albert a Klaudiny na základě analýzy cDNA v roce 2004 identifikovali ještě další tři MRJP proteiny (MRJP6, MRJP7, MRJP8).

MRJP jsou sekreční proteiny, syntetizovány s N-koncovým signálním peptidem (16-20 AK). MRJP proteiny jsou složeny ze sekvence 400-578 AK s teoretickou molekulovou hmotností pohybující se mezi 45-68 kDa (viz Tab. 3) (Schmitzová *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 1999a; Albert *et al.*, 1999b). Většina MRJP proteinů se vyznačuje vysokým obsahem pro včely esenciálních aminokyselin ve své sekvenci (např. Arg, Lys, Ile, Met, Phe). MRJP 1-5 patří mezi nejvíce zastoupené proteiny v MK, předpokládá se tedy, že mají především nutriční (výživovou) funkci (Schmitzová *et al.*, 1998; Albert *et al.*, 1999a; Albert *et al.*, 1999b).



Obr. 4: Včelí larvy v buňce s mateří kašičkou (autor J. Danihlík).



Tab. 3: Molekulární charakteristika jednotlivých včelích MRJP proteinů. Hodnoty byly určeny na základě analýzy genomové sekvence (upraveno dle Buttsted *et al.*, 2014).

MRJP protein	Celkový počet AK	Molekulová hmotnost (kDa)	pI	Uniprot číslo
1	413	46,86	5,03	O18330
2	435	49,15	6,65	O77061
3	524	59,49	6,50	Q17060
4	444	50,67	5,74	Q17061
5	578	68,13	5,95	O97432
6	417	47,58	6,01	Q6W3E3
7	426	48,66	4,85	Q6IMJ9
8	400	45,06	5,81	Q6TGR0
9	403	46,27	8,62	Q4ZJX1

### 2.3.1 Exprese MRJP proteinů v organismu včel

Všechny druhy MRJP proteinů byly dosud izolovány z mateří kašičky včely medonosné. Pouze protein MRJP8 byl detekován jen v mateří kašičce afrikanizovaných včel (*Apis mellifera scutellata*) (Santos *et al.*, 2005). Kromě mateří kašičky byly proteiny MRJP1 a 2 také nalezeny v zásobách pylu (tzv. perga) ve včelstvu (Scarselli *et al.*, 2005; Bilíková a Šimúth, 2010). Drapeu *et al.* (2009) pozorovali expresi genů MRJP proteinů nejen u včelích dělnic, ale i u trubců a včelí matky.

Expresa MRJP proteinů závisí na stáří včelích dělnic. V průběhu svého života včelí dělnice vystřídají ve včelstvu několik vývojových fází. Mladé včelí dělnice se ihned po vylíhnutí stávají čističkami (čištění buněk a jejich příprava matce k zaklazení). Přibližně 4. den od vylíhnutí dochází u mladých dělnic k aktivaci hltanových žláz produkujících MK. Ze včel se tedy stávají krmičky (krmení starších larev), posléze kojičky (krmení mladších larev; 6. den po vylíhnutí). Asi 12. den po vylíhnutí dochází u mladých dělnic k aktivaci voskotvorných žláz a ze včel se stávají stavitelky (stavba včelího díla). Ve třetím týdnu života dělnic dochází k tvorbě největšího množství včelího jedu a z mladých dělnic se stávají strážkyně na česně (střežení vchodu do úlu), 21. den života se z dělnic stávají létavky (přínos potravy do včelstva) (Čermák *et al.*, 2016).

Studiem exprese MRJP proteinů v různých stádiích vývoje včelích dělnic bylo zjištěno, že hladina exprese a výskyt MRJP proteinů v hltanových žlázách včel je vyšší u kojiček starajících se o plod, než u létavek, které se vývoje včelího plodu neúčastní. To potvrzuje především nutriční funkci těchto proteinů (Buttsted *et al.*, 2014). Expresa MRJP proteinů (MRJP1-8) byla také opakovaně pozorována v mozku včely medonosné (houbovitá tělesa). Expresa genů pro tyto proteiny byla opět zvýšená u kojiček oproti hodnotám u včelí matky, trubců a dělnic (Garcia *et al.*, 2009; Peixoto *et al.*, 2009).

Syntézu některých MRJP proteinů ovlivňuje také bakteriální infekce. Po 8 hodinové infekci včely medonosné bakterií *Escherichia coli* (infekce indukována vpíchnutím bakteriální suspenze do zadečku včely) byla pozorována zvýšená hladina exprese genů MRJP3 a snížená hladina exprese pro MRJP4 geny (Scharlaken *et al.*, 2007). MRJP proteiny byly také detekovány v hemolymfě včelích larev infikovaných bakterií *E. coli* (Randolt *et al.*, 2008).

### 2.3.2 Vlastnosti a funkce MRJP proteinů

Bilíková *et al.* (2009) zjistili, že MRJP proteiny mají podobné fyzikálně-chemické vlastnosti jako albuminové proteiny (ovalbumin, sérový albumin). Na základě této podobnosti byl MRJP proteinům přiřazen název apalbuminy (MRJP1 je pojmenován jako apalbumin 1, MRJP2 jako apalbumin 2 a podobně).

MRJP proteiny jsou také řazeny do proteinové rodiny MRJP/Yellow proteins a to kvůli vysoké podobnosti (až 20-30% aminokyselinové sekvence) MRJP proteinů se skupinou Yellow proteinů z organismu *Drosophila melanogaster* (Schmitzová *et al.*, 1998; Albert a Klaudiny, 2004). Yellow proteiny se se zapojují do mechanismu melaninové pigmentace kutikuly (Nash, 1976) a spolu s MRJP proteiny mají pravděpodobně společný i evoluční původ.

Přesná funkce všech MRJP proteinů není dosud úplně prostudována. Proteinům MRJP1 a 2 je připisována především nutriční funkce. MRJP proteiny jsou také jednou ze složek MK, které se podílejí na vývoji a rozlišení včelí larvy na matku (Kamakura, 2011; Huang *et al.*, 2012).

## 2.4 Studium exprese parametrů humorální imunity v průběhu bakteriální infekce

Jak již bylo zmíněno výše, látky tvořící součást humorální imunity (AMP, fenoloxidasa atp.) jsou v hemolymfě včel zastoupeny proměnlivě v různých hladinách v závislosti na vývojové fázi včely. Hladina těchto látek v hemolymfě se mění i v průběhu bakteriální infekce.

Je prokázáno, že infekce včel bakterií *Escherichia coli* vede k zvýšení produkce AMP. Na základě indukce bakteriální infekce *E. coli* byly poprvé detekovány a izolovány v hemolymfě včel například peptidy apidaecin a abaecin (Casteels *et al.*, 1989; Casteels *et al.*, 1990). Také hladina transkripce hymenoptaecinu se 6 hod po infekci *E. coli* zvyšuje až 100x (Kucharski a Maleszka, 2003). Zvýšená hladina peptidů apidaecinu a defensinu byla pozorována v průběhu infekce včelím bakteriálním patogenem *Paenibacillus larvae* (Evans, 2006).

Při septickém poranění zakuklené včelí larvy pomocí spor *Ascospaera aspis*, dochází k vysoké tvorbě melaninu v místě poranění, které indukuje aktivaci fenoloxidasy už 1 hod po infekci patogenem. V případě infekce kukly bakterií *Paenibacillus larvae* je hladina generovaného melaninu ještě vyšší (Aronstein a Holloway, 2013).

Již zmiňovaná exprese prekurzorových proteinů jelleinů MRJP se také v průběhu bakteriální infekce mění jak při infekci bakterií *E. coli* (Scharlaken *et al.*, 2007; Randolt *et al.*, 2008), tak i v průběhu infekce bakterií *P. larvae* (Chan *et al.*, 2009).

## 2.5 Metody studia aktivity antimikrobiálních peptidů

Pro stanovení antimikrobiální aktivity peptidů je nejčastěji využíváno difúzních testů (kvalitativní stanovení) a stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC, kvantitativní stanovení) (Dutta *et al.*, 2008; Votava *et al.*, 2010; Berthold *et al.*, 2013). Pro přesnější zjištění účinnosti peptidů na prokaryotní buňky bývá také využíváno spektrofotometrických, fluorescenčních či luminiscenčních metod.

Spektrofotometrické stanovení antimikrobiální aktivity probíhá měřením růstových křivek bakterií (Bíliková *et al.*, 2009). Pro měření růstových křivek bakterií se využívá 96-jamková destička, do které je napipetován daný objem růstového média společně s antimikrobiálním peptidem. Peptid (koncentrace peptidu udávána v  $\mu\text{g/ml}$ ) bývá obvykle naředěn v geometrické koncentrační řadě s faktorem ředění 2 (Berthold *et al.*, 2013). Do jamky se poté doplní stejný objem bakteriální suspenze, která je naředěna v tekutém médiu na určitou hodnotu optické hustoty (OD, optical density; nejčastěji  $\text{OD}_{600} = 0,5$ ). Bakteriální růst je zaznamenáván po dobu několika hodin měřením absorbance při 600 nm (Madigan *et al.*, 2010).

Principem fluorescenčních metod je interakce fluorescenčních barviv s živými a mrtvými buňkami. Godballe (2013) využívá pro testování antimikrobiální aktivity komerčního kitu The LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Invitrogen), který využívá pro stanovení aktivity dvou fluorescenčních barviv - SYT09 zelené fluorescenční barvivo (excitační/emisní maxima kolem 480/500 nm) a červené fluorescenční barvivo propidium jodid (PI; excitační/emisní maxima 490/635). Tato barviva mají různou schopnost pronikat bakteriální membránou. SYT09 proniká bakteriální membránou živých i mrtvých buněk, PI však dokáže proniknout pouze do buněk s poškozenou membránou. Při použití obou barviv zároveň PI potlačuje fluorescenční signál barvy SYT09 v membránách mrtvých bakteriálních buněk. Na základě odlišného fluorescenčního signálu lze tedy rozlišit přítomnost živých a mrtvých buněk. Vytvořením kalibrační křivky, která vykazuje lineární závislost fluorescenčního signálu na poměru živých a mrtvých bakterií, kdy je bakteriální suspenze tvořena živými a mrtvými buňkami smíchanými v určitém poměru, lze poté určit procentuální počet živých a mrtvých bakteriálních buněk v neznámém vzorku.

Hudman a Sargentiny (2013) používají pro určení životnosti bakterií po aplikaci různého typu záření metodu založenou na purpurovém oxidačně-redukčním indikačním barvivu resazurinu. Principem metody je převádění resazurinu na resorufin pomocí

oxidoreduktas přítomných v živých bakteriálních buňkách. Fluorescenční produkt reakce resorufin, lze poté detekovat na základě fluorescenčního signálu (excitace 560 nm, emise 590 nm). Výhodou této metody je také možnost kolorimetrického stanovení. Po inkubaci bakterií s resazurinem dochází ke snadno viditelné barevné změně, kdy nepřeměněný resazurin má tmavě modrofialové zbarvení a reakční produkt resorufin růžovofialové až světle růžové zbarvení.

Luminiscenční metody pro stanovení antimikrobiální aktivity využívají speciální bakteriální kmeny s insertovanými geny pro luminiscenci (*lux* geny). Takto geneticky upravené bakterie (např. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) mají přirozenou schopnost bioluminiscence. Tato schopnost však přetrvává pouze u plně životaschopných bakteriálních buněk. V okamžiku, kdy dojde k ovlivnění viability bakterií např. působením antimikrobiálních látek, dochází k poklesu luminiscenčního záření bakterie nebo úplnému vymizení v případě smrti bakterií (Godballe, 2013; Vojtek *et al.*, 2014; Vacl 2015).

## 2.6 Chov včel *in vitro*

Chov včel v laboratorních podmínkách je využíván pro různé účely, dělají se fyziologické, toxikologické i parazitologické studie. Mohou se samostatně studovat konkrétní jedinci ze včelstva, nebo různé oddělené experimentální skupiny za vysoce kontrolovaných podmínek. Při chovu *in vitro* je však nutné sledovat a regulovat určité faktory, mezi které patří např. výběr vhodného experimentálního prostředí, vhodný výběr studovaných objektů apod.

Williams *et al.* (2013) doporučují pro chov včel *in vitro* několik metod, které se odlišují na základě parametrů sledovaných v laboratorních podmínkách. Takovými parametry může být například staří včel (čerstvě vylíhnuté včely, dělnice s nedefinovaným stářím), stadium vývoje včel (létavky, mladší vývojová stadia dělnic), nebo přítomnost matky, trubců ve sledované experimentální skupině.

Pro *in vitro* chov čerstvě vylíhnutých včel, u nichž není třeba chovat i matku, je doporučeno z vybraného včelstva vyjmout celý rámeček se zavíčkovanými nevyvíhnutými včelami, u nichž se očekává vylíhnutí do 3 dnů. Tento rámeček je poté umístěn do laboratorního inkubátoru (teplota mezi 32 a 36 °C), ve kterém je zajištěna dostatečná vlhkost (vložením nádoby s vodou dovnitř inkubátoru). Čerstvě vylíhnuté včely jsou umístěny do chovných klíček (Obr. 5) a za daných laboratorních podmínek jsou chovány v inkubátoru po dobu několika dnů (délka chovu včel se odvíjí od sledovaných parametrů konkrétního experimentu). Potrava vylíhnutých včel je zajištěna podáváním krmných roztoků (nejčastěji vodný roztok sacharosy).



Obr. 5: Chovná klíčka s vylíhnutými včelami a krmivem aplikovaným v injekční stříkačce.

### 2.6.1 Bakteriální patogeny

Mezi hlavní bakteriální patogeny včel patří bakterie *Paenibacillus larvae* a *Melissococcus plutonius*.

*P. larvae* je Gram-pozitivní bakterie, která způsobuje onemocnění mor včelího plodu. Patří mezi velmi nebezpečné patogeny, neboť vytváří vysoce odolné spory, které se dokážou snadno šířit po okolí. Spory této bakterie napadají pouze včelí larvy, v jejichž střevech se bakterie množí až do stadia, kdy proniknou skrze střevní epitel do tělní dutiny larvy (Yue *et al.*, 2008). Takové masivní namnožení způsobuje postupný proteolytický rozklad celé larvy, který vede k tvorbě mazlavé tekutiny na dně buněk. Po jejím zaschnutí vzniká tzv. příškvár obsahující spory *P. larvae*. Včely ve snaze odklidit uhynulý plod odvíčkovávají napadené buňky, čímž dochází k úniku bakterií i spor, jejich zachycení na dospělých včelách a může tak docházet k opětovnému šíření bakterie na další larvy (Genersch, 2010). Zbytky rozkládajících se larv jsou po pozření dospělými včelami stráveny, takže včely s dobrým čistícím pudem mohou významně zředit koncentraci bakterií a spor ve včelstvu, načež se včelstvo může samo ozdravit. Mechanismus patří mezi sociální imunitu (Panasiuk *et al.*, 2010).

*M. plutonius* je hlavním původcem onemocnění hniloby včelího plodu. Onemocnění bývá často doprovázeno také sekundárními patogeny (např. *Paenibacillus alvei*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*) (Forsgren, 2010). Bakterie napadají žaludek larvy, kde se i rozmnožují. Napadená larva má v důsledku bakteriální infekce nedostatek potravy, což vede k jejímu postupnému vyhladovění. Uhynulou larvu lze v buňce rozpoznat na základě neobvyklé polohy (stočená kolem stěny buňky, natažená podélně). Mění se také barva larvy od bílé až po žlutohnědou, hnědou a černou a dochází k celkovému „vysušení“ napadené larvy (Forsgren, 2010). Na rozdíl od bakterie *P. larvae*, bakterie *M. plutonius* nevytváří odolné spory. K přenosu choroby dochází alimentární nákazou (tzn. pozření kontaminované potravy).

### 2.6.2 Parazitické houby

Mezi parazitické houby způsobující mykotická onemocnění postihující včelí plod se zařazují houba *Ascosphaera apis* a plísně z rodu *Aspergillus*.

*A. apis* způsobující zvápenatění včelího plodu napadá včelí larvy v podobě drobných výtrusů – askospor. Tyto spory klíčí v žaludku, posléze začne ve střevě prorůstat mycelium, které které proniká stěnou střeva až do tělní dutiny. Prorůstáním mycelia na povrch larvy dochází k její mumifikaci a vzniku „zvápenatělé“ bílé mumie (Obr. 6). Za

vhodných podmínek prostředí dochází k dozrávání plodnic houby a tvorbě výtrusů, což vede ke změně barvy mumifikované larvy z bílé na černou (Aronstein a Holloway, 2013).

Podobnými příznaky jako zvápenatění včelího plodu se projevuje onemocnění zkamenění včelího plodu. Je způsobeno především plísní *Aspergillus flavus*. Toto onemocnění není příliš časté. Projevuje se plodem, který je postižen plísní (nažloutlý plod, později vzhled podobný chomáčkům vaty), posléze se objevují vyschnuté, tvrdé mumie larev.

### 2.6.3 Metody infikování včel bakteriálními patogeny

Standardním způsobem aplikace patogenů do včelích larev je přidání daného patogenu do jejich potravy (Crailsheim *et al.*, 2013). Infekce může být také indukována sprejováním bakteriální kultury na stěny buňky (Chan *et al.*, 2009).

Infikování dospělých *in vitro* chovaných včel se nejčastěji také provádí přimícháním testované látky (bakteriálního patogenu) k potravě podávané včelám *ad libitum* (např. 50% roztok sacharosu) (Williams *et al.*, 2013). Infekci lze však provést například i vpíchnutím patogenu do zadečkové (Scharlaken *et al.*, 2007) nebo hrudníkové části (Kucharski a Maleszka, 2003) včelího těla.



Obr. 6: Mumifikované larvy včel napadené houbou *Ascosphaera apis* (převzato od Aronstein a Murray, 2010).



## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

- Carl Roth: kvasničný extrakt, agar
- Fluka: Mueller Hinton broth, tetracyklin hydrochlorid, trypton, fluorescein diacetát
- Penta: hydrogenfosforečnan draselný
- Promega: PCR Markers
- Sigma-Aldrich: glukosa, pyruvát sodný, chlorid sodný, uhličitan sodný, dihydrogenfosforečnan draselný, trifluoroctová kyselina, propidium jodid

#### 3.1.2 Biologický materiál

Bakteriální kmeny použité pro testování byly součástí sbírky referenčních kmenů České sbírky mikroorganismů Masarykovy Univerzity v Brně (Czech Collection of Microorganisms, Masaryk University Brno, Czech Republic).

Testované bakteriální kmeny:

*Escherichia coli* NCTC 10538

*Escherichia coli* CCM 4517

*Paenibacillus larvae* CCM 38

*Paenibacillus larvae* CCM 39

*Paenibacillus larvae* CCM 4483

*Paenibacillus larvae* CCM 4484

*Paenibacillus larvae* CCM 4485

*Paenibacillus larvae* CCM 4486

*Paenibacillus larvae* CCM 4487

*Paenibacillus larvae* CCM 4488

*Paenibacillus larvae* CCM 5680

*Paenibacillus larvae* (nesbírkový kmen – izolát z klinicky nemocného včelstva)

Rámek se zavíčkovaným plodem včely medonosné kraňské (*Apis mellifera carnica*) pro chov včel *in vitro* byl darován z chovu Mgr. Jiřího Danihlíka, Ph.D., stejně jako rouskový pyl a spory houby *Ascospaera apis*. Včely pocházely z jednoho klinicky zdravého produkčního včelstva, rouskový pyl by sbírán v sezóně 2014 na pylochytech

několika včelstev, následně byl skladován v mrazáku při -80 °C. Mikroskopická analýza pylu byla provedena na pracovišti AGES-SPB, Abteilung Bienenkunde und Bieneschutz, Amonstrasse 3/1, A-3293 Lunz am See, Rakousko. Spory houby *Ascospaera apis* byly získány z mumií larev klinicky nemocného včelstva od chovatele z Nového Jičína.

### 3.1.3 Přístroje a vybavení

Analytické váhy (Sartorius, Německo)

Autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Digitální fotoaparát (SONY, Japonsko)

Digitální pH metr WTW 526 (InoLab, Německo)

Digitální předvážky (Radwag®, Česká republika)

Elektroforetický systém Mini PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, USA)

Elektromagnetická míchačka IKA (Labicom, Česká republika)

Flowbox Bioban (Steril, Itálie)

Chlazená centrifuga 5415 R (Eppendorf, Německo)

Inkubátor EN 120 (Nüve, Turecko)

Mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA)

Minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika)

PCR termocykler (Eppendorf, Německo)

CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio Rad, USA)

Spektrofotometr BioSpec-nano (Shimadzu, USA)

Spektrofotometr Lightwave II (Biochrom, VB)

Ultrazvuková lázeň (Kraintek, ČR)

Vortex mixer (Stuart, UK)

Zdroj pro elektroforézu PowerPac 300 (Bio-Rad, USA)

### 3.1.4 Synteticky připravené antimikrobiální peptidy

Peptidy apidaecin Ia, jellein I, jellein II a na C- konci amidovaný peptid jellein I byly nasyntetizovány v čistotě >99 % firmou Clone Star Peptide Services, Brno (viz Tab. 4).

Tab. 4: Sekvence a molekulová hmotnost synteticky připravených antimikrobiálních peptidů.

Název peptidu	Sekvence	Molekulová hmotnost (Da)
apidaecin Ia	GNNRPVYIPQPRPPHPRI	2107,163
jellein I	PFKISIHLL	953,562
jellein II	TPFKISIHLL	1054,626
jellein I-amid	PFKISIHLL-NH <sub>2</sub>	952,59

### 3.1.5 Použité roztoky a média

- Fluorescein diacetát (zásobní roztok): 5 mg/ml v acetonu
- Fluorescein diacetát (pracovní roztok): 50x ředěný zásobní roztok v tekutém MYPGP médiu, nebo fyz. roztoku (0,1 mg/ml)
- Fyziologický roztok: 0,9% NaCl s 1% glukosou
- GITC pufr: 5,25 M guanidium thiokyanát, 50 mM Tris-HCl (pH 6,4), 20 mM EDTA, 1,3% Triton X-100, 1% 2-merkapt ethanol (Williams *et al.*, 2013)
- K-fosfátový pufr pH 7,2: 26 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7,2 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- Propidium jodid (zásobní roztok): 10 mg/ml v 0,1 M K-fosfátovém pufru pH 7,2
- Propidium jodid (pracovní roztok): 200x ředěný zásobní roztok v tekutém MYPGP médiu, nebo fyz. roztoku (0,05 mg/ml)
- Resazurin: 0,01% (w/v) vodný roztok
- Sacharosa: 30% (w/v) vodný roztok
  
- MYPGP agar: 10 g/l Mueller Hinton broth, 15 g/l kvasničný extrakt, 3 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g/l pyruvát sodný, 20 g/l agar (pevné médium)
- MYPGPn agar: 10 g/l Mueller Hinton broth, 15 g/l kvasničný extrakt, 3 g/l K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1g/l pyruvát sodný, 20 g/l agar, nalidixová kyselina 20 µg/ml (pevné médium) (de Graaf *et al.*, 2013)

Do každého připravovaného média bylo po autoklávování přidáno 20 ml/l 10% glukosy. Pevná média byla nalévána do Petriho misek s průměrem 9 mm do výšky 4 mm.

### 3.1.6 Použité kity

- Agencourt RNAClean XP (Beckman Coulter)
- BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega)
- RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)
- Syber Select Master Mix (Life Technologies)
- Transcriptor High Fidelity Kit (Roche)

## 4 Literatura

- Albert Š., Bhattacharya D., Klauđiny J., Schmitzová, J., Šimúth J. (1999a): The family of major royal jelly proteins and its evolution. *Journal of Molecular Evolution* **49**, 290–297.
- Albert Š., Klauđiny J., Šimúth J. (1999b): Molecular characterization of MRJP3, highly polymorphic protein of honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 427–434.
- Albert Š., Klauđiny J. (2004): The MRJP/YELLOW protein family of *Apis mellifera*: Identification of new members in the EST library. *Journal of Insect Physiology* **50**, 51-69.
- Amaral I. M. R., Neto J. F. M., Pereira G. B., Franco M. B., Beletti M. E., Kerr W. E., Bonetti A. M., Ueira-Vieira C. (2010): Circulating hemocytes from larvae of *Melipona scutellaris* (Hymenoptera, Apidae, Meliponini): Cell types and their role in phagocytosis. *Micron*, **41**, 123-129.
- Andreu D., Rivas L. (1998): Animal antimicrobial peptides: An overview. *Biopolymers* **47**, 415-433.
- Aronstein K, Murray K. D. (2010): Chalkbrood disease in honey bees. *Journal of invertebrate pathology* **103**, S20–S29.
- Aronstein K., Holloway B (2013): Honey bee fungal pathogen, *Ascosphaera apis*; current understanding of host-pathogen interactions and host mechanisms of resistance. In *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them - Science, Technology and Education* (Méndez-Vilas, A). Formatex Research Center, 402–410.
- Ashida M., Brey P. (1997): Recent advances in research on the insect prophenoloxidase cascade. In: *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. 1st ed. (Brey P. T., Hultmark D.), Chapman & Hall, London, UK, 325 stran.
- Berthold N., Czihal P., Fritsche S., Sauer U., Schiffer G., Knappe D., Alber G., Hoffmann R. (2013): Novel apidaecin 1b analogs with superior serum stabilities for treatment of infections by Gram-negative pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**, 402-409.
- Bíliková K., Mirgorodskaya E., Bukovská G., Gobom J., Lehrach H., Šimúth J. (2009): Towards functional proteomics of minority component of honeybee royal jelly: The effect of post-translational modifications on the antimicrobial activity of apalbumin2. *Proteomics* **9**, 2131-2138.
- 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**, 8776–8781.
- Boman H., G., Hultmark D. (1987): Cell-free immunity in insects. *Annual Review of Microbiology* **41**, 103-26.
- Brey P. T., Hultmark D. (1998): *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. 1st ed., Chapman & Hall, London, UK, 325 stran.
- Brodgen K. A. (2005): Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **3**, 238-250.
- Bulet P., Dimarcq J. L., Hetru C. (1993): A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 14893-14897.
- Bulet P., Stöcklin R. (2005): Insect antimicrobial peptides: Structures, properties and gene regulation. *Protein and Peptide Letters* **12**, 3-11.
- Buttsted A., Moritz F. A. R., Erler S. (2014): Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. *Biological reviews* **89**, 255-269.
- Callewaert L., Michiels Ch. W. (2010): Lysozymes in the animal kingdom. *Journal of Biosciences* **35**, 127-160.

- Casteels P., Ampe Ch., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. (1989): Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal* **8**, 2387-2391.
- Casteels P., Ampe Ch., Riviere L., van Damme J., Elicone Ch., Fleming M., Jacobs F., Tempst P. (1990): Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honey bee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry* **187**, 381-386.
- Casteels P., Ampe Ch., Jacobs F., Tempst P. (1993): Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honey bee (*Apis mellifera*). *The 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 P. (1998) Immune Response in *Hymenoptera*. In: *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*. 1st ed. (Brey P. T., Hultmark D.), Chapman & Hall, London, UK, 325 stran.
- Casteels-Josson K., Capaci T., Casteels P., Tempst P. (1993): Apidaecin multipeptide precursor structure: a putative mechanism for amplification of the insect antibacterial response. *The 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 post-translational conversion of the precursor structures. *The Journal of Biological Chemistry* **269**, 28569-28575.
- Cerenius L., Söderhäll K. (2004): The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunological Reviews* **198**, 116–126.
- Chan Q., Melathopoulos A., Pernal S., Foster L. (2009): The innate immune and systemic response in honey bees to a bacterial pathogen, *Paenibacillus larvae*. *BMC Genomics* **10**, 387.
- Chen C. and Chen S. Y. (1995) Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions. *Food Chemistry* **54**, 195–200.
- Crailsheim K., Riessberger-Galle U. (2001): Honey bee age-dependent resistance against American foulbrood. *Apidologie* **32**, 91-103.
- Crailsheim K., Brodschneider R., Aupinel P., Behrens D., Genersch E., Vollmann J., Riessberger-Gallé U. (2013): Standard methods for artificial rearing of *Apis mellifera* larvae. *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research, Journal of Apicultural Research* **52**.
- Cremer S., Armitage S. A. O., Schmid-Hempel P. (2007): Social Immunity. *Current Biology* **17**: R693-R702.
- Čermák K., Gruna B., Hajdušková J., Holub P., Klíma Z., Kovařík I., Navrátil S., Rytina L., Texl P., Texl F., Tůma Z. (2016): *Včelařství – svazek I*. 1st ed. (Rytina L. ed.), PSNV, České Budějovice, Česká republika, 180 stran.
- Danihlík J. (2015): *Vývoj metody pro purifikaci a kvantifikaci silně bazického peptidu apidaecinu*. Disertační práce, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.
- Dickinson L., Russell V., Dunn P. E. (1988): A family of bacteria-regulated, cecropin D-like peptides from *Manduca sexta*. *The Journal of Biological Chemistry* **263**, 19424-19426.
- de Graaf D. C., Alippi A. M., Antúnez K., Aronstein K. A., Budge G., Koker D. D., Smet L. D., Dingman D. W., Evans J. D., Foster L. J., Fünfhaus A., Garcia-Gonzales E., Gregorc A., Human H., Murray K. D., Nguyen B. K., Poppinga L., Spivak M., van Engelsdorp D., Wilkins S., Genersch E. (2013): Standard methods for american foulbrood research. *Journal of Apicultural research* **52**, 1-28
- de Lima P. R. D., Brochetto-Braga M. R. (2003): Hymenoptera Venom Review Focusing on *Apis Mellifera*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **9**, 149-162.
- dos Santos Carbera M. P., Baldissera G., da Costa Silva-Goncalves L., Monson de Souza B., Riske K. A., Palma M. S., Ruggiero J. R., Arcisio-Miranda M. (2014): Combining

- experimental evidence and molecular dynamic simulations to understand the mechanism of action of the antimicrobial octapeptide jelleine-I. *Biochemistry* **53**, 4857–4868.
- Dostálková S. (2014): *Testování antimikrobiální aktivity peptidů*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.
- Dutta R. C., Nagpal S., Salunke D. M. (2008): Functional mapping of apidaecin through secondary structure correlation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **40**, 1005-1015.
- Drapeau M. D., Albert Š., Kucharski R., Prusko C., Maleszka R. (2006): Evolution of the Yellow/Major Royal Jelly Protein family and the emergence of social behavior in honey bees. *Genome Research* **16**, 1385–1394.
- Edstrom A. (1992): *Venomous and poisonous animals*. Malabar: Krieger Publishing Company, 210 stran.
- Evans J. D. (2004): Transcriptional immune responses by honeybee larvae during invasion by the bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **85**, 105–111.
- Evans J. D., Aronstein K., Chen Y. P., Hetru C., Imler J. L., Jiang H., Kanost M., Thompson G. J., Zou Z., Hultmark D. (2006): Immune pathways and defence mechanisms in honey bees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology* **15**, 645–656.
- Evans J. D., Spivak M. (2010): Socialized medicine: Individual and communal disease barriers in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S62-S72.
- Fontana R., Mendes M. A., de Souza B. M., Konno K., César L. M. M., Malaspina O., Palma M. S. (2004): Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides* **25**, 919-928.
- Forsgren E. (2010): European foulbrood in honeybees. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S5-S9.
- Fennell J. F., Shipman W. H., Cole L. J. (1968): Antibacterial Action of Melittin, a Polypeptide from Bee Venom. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* **127**, 707-710.
- 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. *The Journal of Biological Chemistry* **265**, 11333-11337.
- Garcia L., Saraiva Garcia C. H., Calábria L. K., Costa Nunes da Cruz G., Sánchez Puentes A., Bão S. N., Fontes W., Ricart C. A., Salmen Espindola F., Valle de Sousa M.: (2009). Proteomic analysis of honey beebrain upon ontogenetic and behavioral development. *Journal of Proteome Research* **8**, 1464–1473.
- Genersch E. (2010): American foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paenibacillus larvae*. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S10-S19.
- Gillespie J. P., Kanost M. R. (1997): Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* **42**, 611-643.
- Glinski Z., Jarosz J. (1993): Further evidence for cell-free immunity in the honeybee, *Apis mellifera*. *Apiacta* **28**, 69-78.
- Godballe T. (2013): *Mode of action studies on sythetic antimicrobial peptides*. Diplomová práce, Roskilde University, Dánsko.
- Hider R. C., Ragnarson U. (1981): A comparative study of apamin and related bee venom peptides. *Biochimica Biophysica Acta* **667**, 197-208.
- Hojo M., Kagami T., Sasaki T., Nakamura J., Sasaki, M. (2010): Reduced expression of major royal jelly protein 1 gene in the mushroom bodies of worker honeybees with reduced learning ability. *Apidologie* **41**, 194–202.
- Holak T. A., Engström Å., Kraulis P. J., Lindeberg G., Bennich H., Awlyn Jones T., Gronenborn A. M., Marius Clore G. (1988): The solution conformation of the antibacterial peptide cecropin A: a nuclear magnetic resonance and dynamical simulated annealing study. *Biochemistry* **27**, 7620-7629.
- Howe S. R., Dimick P. S., Benton A. W. (1985): Composition of freshly harvested and commercial royal jelly. *Journal of Apicultural Research* **24**, 52–61.

- Huang C. Y., Chi L. L., Huang W. J., Chen Y. W., Chen W. J., Kuo Y. C., Yuan C. M., Chen C. N. (2012): Growth stimulating effect on queen bee larvae of histone deacetylase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 6139–6149.
- Hudman D. A., Sargentini N. J. (2013): Resazurin-based assay for screening bacteria for radiation sensitivity. *SpringerPlus* **2**, 55 .
- Kamakura M. (2011): Royalactin induces queen differentiation in honeybees. *Nature* **473**, 478–483.
- Khilnani J. C, Wing H. J. (2015): Protocols to test the activity of antimicrobial peptides against the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *Journal of Microbiological Methods* **117**, 54–56.
- Klaudiny J., Albert Š., Bachanová K., Kopernický J., Šimúth J. (2005): Two structurally different defensin genes one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 11-22.
- Kreil G., Haiml L., Suchanek G. (1980): Stepwise cleavage of the pro part of promelittin by dipeptidylpeptidase IV. *European Journal of Biochemistry* **111**, 49-58.
- Kucharski R., Maleszka R. (2003): Transcriptional profiling reveals multifunctional roles for transferrin in the honeybee, *Apis mellifera*. *Journal of Insect Science* **3**, 1–8.
- Laughton A. M., Boots M., Siva-Jothy M. T. (2011): The ontogeny of immunity in the honey bee, *Apis mellifera* L. following an immune challenge. *Journal of Insect Physiology* **57**, 1023–1032.
- Lavine M. D., Strand M. R. (2002): Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 1295-1309.
- Leitner A., Foettinger A., Lindner W. (2007): Improving fragmentation of poorly fragmenting peptides and phosphopeptides during collision-induced dissociation by malondialdehyde modification of arginine residues. *Journal of Mass Spectrometry* **42**, 950-959.
- Li W., Ma G., Zhou X. (2006): Apidaecin-type peptides: biodiversity, structure-function relationships and mode of action. *Peptides* **27**, 2350-2359
- Li Y., Xiang Q., Zhang Q., Huang Y., Su Z. (2012): Overview on the recent study of antimicrobial peptides: Origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides* **37**, 207-215.
- Lourenço A. P., Mackert A., dos Santos Cristino A., Simões Z. L. P. (2008): Validation of Reference Genes for Gene Expression Studies in the Honey Bee, *Apis Mellifera*, by Quantitative Real-Time RT-PCR. *Apidologie* **39**, 372-385.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Clark D. P., Stahl D. A., (2010): *Brock biology of microorganisms*. 13th ed., Pearson Education Inc, San Francisco, USA, 1155 stran.
- Nash W. G. (1976): Patterns of pigmentation color states regulated by the y locus in *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology* **48**, 336–343.
- Natori S. (1977): Bactericidal substance induced in the haemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae. *Journal of Insect Physiology* **23**, 1169-1173.
- Neubauerová T., Macková M., Macek T., Koutek B. (2009): Kationické antimikrobiální peptidy. *Chemické listy* **103**, 460-468.
- Olofsson T., Vásquez A. (2008): Detection and Identification of a Novel Lactic Acid Bacterial Flora Within the Honey Stomach of the Honeybee *Apis mellifera*. *Current Microbiology* **57**, 356-363.
- Otvos L. (2000a): Antibacterial peptides isolated from insects. *Journal of Peptide Science* **6**, 497-511.
- Otvos L., (2000b): Interaction between heat-shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* **39**, 14150-14159.
- Panasiuk B., Skowronek W., Bienkowska M., Gerula D. (2010): Process of Cleaning Dead Brood from Cells in a Honeybee Colony. *Journal of Apicultural Science* **54**, 5-11.
- Peixoto L. G., Calábria L. K., Garcia L., Capparelli F. E., Goulart L. R., De Sousa M. V., Espindola F. S. (2009): Identification of major royal jelly proteins in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology* **55**, 671–677.



- Pfaffl M. W., Horgan G. W., Dempfle L. (2002): Relative Expression Software Tool (Rest©) for Group-Wise Comparison and Statistical Analysis of Relative Expression Results in Real-Time PCR. *Nucleic Acids Research* **30**, e36.
- Pfaffl M., Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. (2004): Determination of Stable Housekeeping Genes, Differentially Regulated Target Genes and Sample Integrity: Bestkeeper – Excel-Based Tool Using Pair-Wise Correlations. *Biotechnology Letters* **26**, 509-515
- Pfaffl M. (2004): Quantification strategies in real-time PCR In: *A-Z of quantitative PCR*. (Bustin S.A), International University Line, USA, str. 87-112.
- Powers J. P. S., Hancock R. E. W. (2003): The relationship between peptide structure and microbial activity. *Peptides* **24**, 1681-1691.
- Randolt K., Gimple O., Geissendörfer J., Reinders J., Prusko C., Mueller M. J., Albert Š., 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**, 155–167.
- Romanelli A., Moggio L., Montella R. C., 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**, 348-352.
- Santos K. S., Dos Santos L. D., Mendes M. A., De Souza B. M., Malaspina O., Palma, M. S. (2005): Profiling the proteome complement of the secretion from hypopharyngeal gland of Africanized nurse-honeybees (*Apis mellifera L.*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **35**, 85–91.
- Santoyo I., Córdoba-Aguilar A. (2012): Phenoloxidase: a key component of the insect immune system. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **142**, 1–16.
- Scharlaken B., De Graaf D. C., Memmi S., Devreese B., Van Beeumen J., Jacobs F. J. (2007): Differential protein expression in the honey bee head after a bacterial challenge. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **65**, 223–237.
- Schmitzová J., Klaudiny J., Albert S., Schröden W., Schreckengost W., Hanes J., Júdová J., Šimúth J. (1998): A family of major royal jelly proteins of the honeybee *Apis mellifera L.* *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**, 1020 – 1030.
- Scarselli R., Donadio E., Giuffrida M. G., Fortunato D., Conti A., Balestreri E., Felicioli R., Pinzauti M., Sabatini A. G., Felicioli A. (2005): Towards royal jelly proteome. *Proteomics* **5**, 769–776.
- Steiner H., Hultmark D., Engström Å., Bennich H., Boman H. G. (1981): Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature* **292**, 246-248.
- Steiner H. (1982): Secondary structure of the cecropins: antibacterial peptides from the moth *Hyalophora cecropia*. *FEBS Letters* **137**, 283-287.
- Takenaka T. (1982): Chemical composition of royal jelly. *Honeybee Science*. **3**, 69–74.
- Teixeira V., Feio M. J., Bastos M. (2012): Role of lipids in their interaction of antimicrobial peptides with membranes. *Progress in Lipid Research* **51**, 149-177.
- Turner R. J. (1994) Immunology - A comparative Approach.
- Vacl M. (2015): *Antimikrobiální aktivita hemolymfy včely medonosné, Apis mellifera L.* Diplomová práce, Masarykova Univerzita, Brno, Česká republika.
- Vilmos P., Kurucz E. (1998): Insect immunity: evolutionary roots of the mammalian innate immune system. *Immunology Letters* **62**, 59-66.
- Vojtek L., Dobeš P., Büyükgüzel E., Hyršl P. (2014): Bioluminescent assay for evaluating antimicrobial activity in insect haemolymph. *European Journal of Entomology*. **111**, 335–340.
- Votava M., Růžička F., Woznicová V., Černožská L., Dvořáčková M., Dvořáková Heroldová M., Holá V., Zahradníček O. (2010): *Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody*. Neptun, Brno, Česká republika, 495 stran.

- Williams G. R., Alaux C., Costa C., Csáki T., Doublet V., Eisenhardt D., Fries I., Kuhn R., McMahon D. P., Medrzycki P., Murray T. E., Natsopoulou M. E., Neumann P., Oliver R., Paxton R. J., Pernal S. F., Shutler D., Tanner G., Van der Steen J. J. M., Brodschneider R. (2013): Standard methods for maintaining adult *Apis mellifera* in cages under *in vitro* laboratory conditions. *The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for Apis mellifera research, Journal of Apicultural Research* **52**.
- Yi H. Y., Chowdhury M., Huang Y. D., Yu X. Q. (2014) Insect Antimicrobial Peptides and Their Applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* **98**: 5807-5822.
- Yoshiyama M., Kimura K. (2010): Characterization of antimicrobial peptide genes from Japanese honeybee *Apis cerana japonica* (Hymenoptera: Apidae). *Applied Entomology and Zoology* **45**, 609-614.
- Yue D., Nordhoff M., Wieler L. H., Genersch E. (2008): Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis of the interactions between honeybee larvae and *Paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood of honeybees (*Apis mellifera*). *Environmental Microbiology* **10**, 1612-1620.

## 5 Seznam použitých zkratk

AMP	antimikrobiální peptidy
CFU	colony forming unit (kolonii tvořící jednotka)
CM	cytoplasmatická membrána
E	účinnost reakce
FDA	fluorescein diacetát
G+	Gram-pozitivní
G-	Gram-negativní
HKG	housekeeping genes (provozní geny)
MCD	mastocyte degranulating peptide
MIC	minimální inhibiční konstanta
MK	mateří kašička
MRJP	major royal jelly protein
OD	optical density (optická hustota)
PI	propidium jodid
PO	fenoloxidasa
proPO	profenoloxidasa
proPO-AS	system aktivující profenoloxidasu
R	Pearsonův korelační koeficient
TFA	trifluoroctová kyselina
Tm	melting temperature (teplota tání)
TTC	tetracyklin