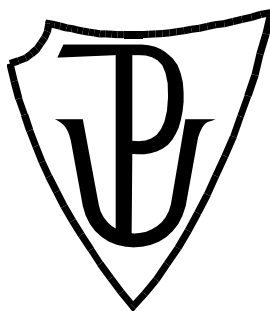


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Extracelulárně sekretované proteiny a peptidy

bakterie *Paenibacillus larvae*

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Aleš Kvasnička
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Danihlák Jiří, Ph.D.
Rok:	2018

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:

Tímto bych chtěl poděkovat mému vedoucímu Mgr. Jiřímu Danihlíkovi, Ph.D., za pozitivní, důsledný a profesionální přístup během konzultací, ale i v průběhu řešení teoretické a praktické části práce. Dále bych chtěl poděkovat zaměstnancům Katedry biochemie, bez nichž by byla práce nerealizovatelná.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Aleš Kvasnička
Název práce	Extracelulárně sekretované proteiny a peptidy bakterie <i>Paenibacillus larvae</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Danihlík Jiří, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Včela medonosná (*Apis mellifera*) se řadí mezi nedůležitější opylovatele, na kterých závisí celosvětové výnosy zemědělsky a ekonomicky důležitých plodin. Ačkoliv se problému včelí imunity a celosvětového trendu snižování počtů opylovatelů nevěnuje dostatečná mediální pozornost, vědecký zájem o tuto problematiku stále roste. Mimo studium samotné včelí imunity se lze také zaměřit přímo na studium patogenů a parazitů včel. Tato práce je zaměřena na bakteriálních onemocnění mor včelího plodu, jehož přímým původcem je bakterie *Paenibacillus larvae*.

V teoretické části práce byly specifikovány jednotlivé skupiny proteinů a peptidů s antimikrobiálními a toxickými vlastnostmi a dále byly také rozebrány mechanismy, jimiž tyto proteiny a peptidy narušují integritu fyzické obrany a imunity napadených organismů s konkrétním zaměřením na včelu medonosnou. V rámci současného stavu řešené problematiky byly popsány konkrétní doposud identifikované proteiny a peptidy, které bakterie *P. larvae* sekretuje do prostředí lumen střeva včelí larvy, případně do růstového média, s ohledem na dva nejrozšířenější genotypy této bakterie.

V praktické části byly optimalizovány parametry kultivace obou zkoumaných genotypů bakterie *P. larvae* s ohledem na sekreci proteinů a peptidů do růstových médií. Bylo zjištěno, že pro optimální růst obou genotypů *P. larvae* je nezbytné před kultivací upravit pH MYPGP média pomocí KOH na hodnotu 7,3. Dále byla pro srážení proteinů z růstového média ověřena a vybrána technika srážení čistým vymraženým methanolem. Proteiny izolované z růstových médií byly elektroforeticky separovány, přičemž byla stanovena jejich přibližná molekulová hmotnost a jako nejlepší technikou barvení bylo na 12% polyakrylamidovém vybráno barvení koloidním CBB G-250.

Porovnáním relativní mobility standardů a vzorků na gelech byly u obou genotypů bakterie *P. larvae* ERIC I a ERIC II identifikovány proteinové pásy o molekulových

hmotnostech 74, 56 a 42 kDa jejichž intenzita se v průběhu kultivace zvyšovala. Dále byl pozorován společný proteinový pás pro oba genotypy v oblasti 49 kDa. U genotypu ERIC I byl detekován proteinový pás s přibližnou molekulovou hmotností 110 kDa.

Klíčová slova	Extracelulárně sekretované proteiny, mor včelího plodu, <i>Paenibacillus larvae</i>
Počet stran	79
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname Aleš Kvasnička

Title Extracellularly secreted proteins and peptides by the bacterium *Paenibacillus larvae*

Type of thesis Bachelor

Department Department of biochemistry

Supervisor Mgr. Danihlák Jiří, Ph.D.

The year of presentation 2018

Abstract

The Honeybee (*Apis mellifera*) is one of the most important pollinators, on which depends the production of agriculturally and economically important crops worldwide. Even though the problems of bee immunity and the trend of declining number of bees are not stressed enough in the media, the scientific interest in this topic is steadily growing. The focus is not only aimed on the bee immunity, it can also be directed on the parasitic organisms e.g. viruses and bacteria. This thesis is primarily focused on the American foulbrood and its causative agent *Paenibacillus larvae*.

Individual groups of proteins and peptides with antimicrobial and toxic properties were specified in the theoretical part of this thesis and furthermore the mechanisms, that disrupt the integrity of the physical defence and immunity were researched. This thesis focused on specific proteins and peptides, which are secreted by the bacterium *P. larvae* into the environment of the lumen of a honeybee larvae or into the growth medium were described.

Parameters of cultivation were optimized for both genotypes of *P. larvae* (ERIC I and ERIC II) in the practical part of this thesis. It was discovered that the optimal growth of both studied genotypes of *P. larvae* is secured in the MYPGP medium with pH 7,3 adjusted by KOH. The optimal technique for protein precipitation from growth media was specified as the one using cold methanol. The isolated proteins were electrophoretically separated. As the visualisation technique of protein bands on 12% polyacrylamide gel was selected the colloid CBB G-250.

The approximate molecular weights of protein bands were determined by the comparison of relative mobility of standards and the studied proteins on gels. Proteins with molecular mass 74, 56, 49 and 42 kDa were detected in the secretion samples of

both genotypes ERIC I and ERIC II. Protein band corresponding to 110 kDa was found only in samples of genotype ERIC I.

Keywords	Extracellularly secreted proteins, american foulbrood, <i>Paenibacillus larvae</i>
Number of pages	79
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Bakteriální onemocnění včel	2
2.1.1	Mor včelího plodu	2
2.1.1.1	Klinické příznaky moru včelího plodu	2
2.1.1.2	Izolace a kultivace <i>P. larvae</i>	3
2.1.1.3	Identifikace <i>P. larvae</i>	4
2.1.1.4	Průběh onemocnění	5
2.1.2	Hniloba včelího plodu	6
2.2	Obranné mechanismy včel proti bakteriálním infekcím	8
2.2.1	Sociální imunita	8
2.2.1.1	Hygienické chování včel	8
2.2.2	Peritrofická membrána	9
2.2.3	Symbiotické organismy	10
2.3	Extracelulárně sekretované proteiny a peptidy bakterií se zaměřením na bakterii <i>Paenibacillus larvae</i>	10
2.3.1	Antibiotika	11
2.3.1.1	Neribosomální peptidové syntetasy	11
2.3.1.2	Klasifikace a někteří zástupci antibiotik	13
2.3.2	Antimikrobiální peptidy	14
2.3.2.1	Bakteriociny gram-negativních bakterií	14
2.3.2.1.1	Koliciny	14
2.3.2.1.2	Mikrociny	15
2.3.2.2	Bakteriociny gram-pozitivních bakterií	15
2.3.3	Extracelulárně produkováné enzymy	16
2.3.3.1	Enolasa	16
2.3.3.2	Proteasy	17
2.3.3.3	Chitin degradující enzymy	18
2.3.4	Proteiny a peptidy sekretované bakterií <i>P. larvae</i>	19
2.3.4.1	Peptidy neribosomálního původu	19
2.3.4.1.1	Bacillibactin	20
2.3.4.1.2	Paenilarviny	20
2.3.4.1.3	Sevadicin	21
2.3.4.2	Proteiny S-vrstvy	22
2.3.4.3	Cytotoxiny	22
2.3.4.4	Chitin degradující enzym (<i>PICBP49</i>)	24
2.4	Metody studia izolace, purifikace a identifikace proteinů a peptidů	27
2.4.1	Metody izolace proteinů	27
2.4.1.1	Srážení pomocí acetonitrilu a kyseliny trifluoroctové	27
2.4.1.2	Srážení pomocí methanolu	27
2.4.1.3	Srážení acetonem a kyselinou trichloroctovou	28
2.4.2	Metody purifikace proteinů	28
2.4.3	Metody identifikace a kvantifikace proteinů	29

2.4.3.1	Elektromigrační metody	29
2.4.3.2	Stanovení celkových proteinů	30
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
3.1	Materiál	32
3.1.1	Chemikálie	32
3.1.2	Biologický materiál	33
3.1.3	Použité roztoky a média	33
3.1.3.1	Kultivační média a roztoky	33
3.1.4	Přístrojové vybavení	34
3.2	Metody	35
3.2.1	Přechovávání a kultivace bakterie <i>P. larvae</i>	35
3.2.2	Stanovení růstové křivky	35
3.2.3	Kolorimetrické stanovení životnosti buněk	35
3.2.4	Izolace a purifikace proteinů z růstového média	36
3.2.4.1	Srážení methanolem	36
3.2.4.2	Srážení kyselinou trichloroctovou a acetonem	36
3.2.4.3	Srážení kyselinou trifluoroctovou s acetonitrem	36
3.2.5	Stanovení celkových proteinů	36
3.2.6	Elektroforetické dělení proteinů na polyakrylamidovém gelu	37
3.2.6.1	Příprava ústojných roztoků a gelů	37
3.2.6.2	Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu	38
3.2.6.3	Detekce proteinů na gelech po elektroforetické separaci	38
3.2.6.3.1	Roztoky použité pro detekci	38
3.2.6.3.2	Barvení Coomassie Brilliant Blue	39
3.2.6.3.3	Detekce stříbrem	40
3.2.7	Identifikace bakterie <i>Paenibacillus larvae</i> polymerázovou řetězovou reakcí	40
3.2.7.1	Roztoky využité při polymerázové řetězové reakci	40
3.2.7.2	Izolace DNA z bakterie <i>Paenibacillus larvae</i>	40
3.2.7.3	Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA	41
3.2.7.4	Příprava PCR směsi	41
3.2.7.5	Podmínky PCR reakce	41
3.2.7.6	Provedení a detekce PCR produktů agarosovou elektroforézou	42
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	43
4.1	Optimalizace parametrů kultivace bakterie <i>Paenibacillus larvae</i> se zaměřením na sekreční proteiny a peptidy	43
4.1.1	Stanovení růstových křivek bakterie <i>P. larvae</i>	43
4.1.2	Změna pH v médiích během kultivace	44
4.1.3	Kolorimetrické stanovení životnosti buněk <i>P. larvae</i> v průběhu kultivace	46
4.2	Sestrojení kalibrační přímky pro stanovení koncentrace celkových proteinů	48
4.3	Volba vhodné srážecí techniky pro izolaci proteinů z růstového média	48
4.3.1	Koncentrace celkových proteinů během kultivace	51
4.4	Separace proteinů pomocí SDS-PAGE a jejich vizualizace	52

4.4.1	Porovnání jednotlivých barvení pro vizualizaci separovaných proteinů	52
4.4.2	Porovnání sekrece proteinů obou genotypů <i>P. larve</i> do růstových médií	55
4.5	Identifikace bakterie <i>Paenibacillus larvae</i> metodou PCR	58
5	ZÁVĚR	60
6	LITERATURA	61
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	67

Cíle práce

- Zpracování literární rešerše o bakteriálních nákazách včel, zejména moru a hnilobě včelího plodu (AFB a EFB) a průběhu těchto onemocnění.
- Vypracování souhrnu poznatků o již izolovaných sekrečních proteinech a peptidech jednotlivých genotypů bakterie *Paenibacillus larvae*.
- Sepsání literární rešerše o metodách izolace, purifikace a identifikace proteinů a peptidů produkovaných mikroorganismy extracelulárně do růstových médií.
- Optimalizace kultivačních podmínek bakterie *P. larvae* pro produkci extracelulárních proteinů a peptidů do kultivačních médií.
- Optimalizace srážecích metod pro izolaci a purifikaci peptidů a proteinů z bakteriálních růstových médií.
- Zavedení metod separace extracelulárních proteinů a peptidů bakterie *P. larvae* pomocí elektromigračních metod s následnou vizualizací proteinových pásů.

1 Úvod

Přetrvávající tendence poklesu počtu opylovatelů ve světě a zejména v Evropě a Severní Americe je zapříčiněna mnoha faktory, které se skládají z několika zásadních vlivů, jako je ztráta přirozeného prostředí, změna klimatu, a především také působení patogenů, přičemž všechny zmíněné vlivy mezi sebou vykazují interakce (antagonistické či aditivní) (Potts *et al.*, 2010). Důležitost opylovatelů ať už z hlediska zemědělství, ekonomiky a potažmo také rozvoje lidského společenství je nezpochybnitelná. Včela medonosná (*Apis mellifera*) je jakožto jeden z nejdůležitějších opylovatelů podrobena velkému vědeckému zájmu s ohledem na výzkum zabývající se jejími patogeny a imunitou.

Studium včelích patogenů a pochopení mechanismu patogeneze je klíčem k řešení jednoho z problémů, jež způsobuje zvyšující se úmrtnost včel. Za několik posledních desetiletí je monitorována zvyšující se incidence bakteriálních onemocnění, a to především moru včelího plodu a hniloby včelího plodu (Belloy *et al.*, 2007; Budge *et al.*, 2014; Erban *et al.*, 2017). Tato bakteriální onemocnění postihují včelí larvy a mechanismus patogeneze probíhá na molekulární úrovni interakcemi proteinů, které bakterie sekretují do lumen střeva včelí larvy (Genersch, 2010; Ebeling *et al.*, 2016).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Bakteriální onemocnění včel

Již před více než stoletím White (1906) provedl komplexní studii částí včel (*Apis mellifera*), úlů a téměř všech včelích produktů se zaměřením na mikrobiální analýzu za účelem identifikace potenciálních patogenů. Největší důraz v této práci klade na onemocnění moru včelího plodu a hniloby včelího plodu. Do dnešní doby tak vlivem vědeckého zájmu o tuto problematiku došlo ke zdokonalení kultivačních a identifikačních metod, včetně objasnění taxonomické specifikace mikrobiálních původců zmíněných onemocnění.

2.1.1 Mor včelího plodu

Přímým původcem moru včelího plodu (anglicky American foulbrood, dále AFB) je gram-pozitivní, sporulující, pohyblivá bakterie *Paenibacillus larvae* (Genersch *et al.*, 2006). Z taxonomického hlediska bylo zařazení *P. larvae* postupné, přičemž byla patogenita původně přičítána bakterii *Bacillus larvae* (White, 1906). Až úplné objasnění přinesla Genersch (2006), jejíž práce prokázala mírné rozdíly kmenů *P. larvae* a sjednotila poddruhy *P. larvae subsp. larvae* a *P. larvae subsp. pulvifaciens* v jeden.

Právě ona sporulace bakterie *P. larvae* je kritickým faktorem AFB co se šíření a persistence onemocnění týče. Tyto spory jsou schopné odolat velmi nepříznivým podmínkám různých fyzikálně – chemických vlivů a dále vlivem změny prostředí během ročních období pronikají do porézních materiálů úlů a včelařských potřeb, což opět snižuje schopnost se této nemoci zbavit. Spory jsou schopny přežít ve včelích produktech (med, vosk, uhynulá larva) a v prostředí 3–10 let a dokonce až 30 let v degradované zaschlé larvální hmotě (příškvár), která může obsahovat až miliardu spor na příškvár z jedné larvy (Hasemann, 1961).

2.1.1.1 Klinické příznaky moru včelího plodu

Klinické příznaky způsobené onemocněním morem včelího plodu jsou variabilní z hlediska genotypu a také podle jednotlivých kmenů *P. larvae*. Existují ovšem určité společné znaky, podle kterých lze propuknutí nemoci identifikovat. Larvy mohou uhynout ještě před zavičkováním buňky, nebo až po jejím zavičkování, což se projeví propadnutím, změnou tvaru a zbarvením víčka (Obr. 1). Uvnitř takto defektních buněk se nachází rozkládající se larvální hmota charakteristického zápachu, která se po perforaci víčka dřevěnou tyčinkou táhne až několik centimetrů a postupně vysychá až na šupinkovitý příškvár (Hansen a Brodsgaard, 1999).



Obr. 1 Vzhled včelích buněk vykazujících klinické příznaky onemocnění morem včelího plodu: zřetelná mezerovitost, propadlá víčka a přítomnost příškvaru (uprostřed). (Použito se svolením autora: Mgr. Jiří Danihlík, Ph.D.)

2.1.1.2 Izolace a kultivace *P. larvae*

Kvalitativní důkaz o přítomnosti *P. larvae* ve vzorcích medu, vosku, měli, či uhynulých larev lze provést několika způsoby. Nejprve je nutné ze vzorků získat čistou kulturu *P. larvae*, což je provedeno tepelnou úpravou biologických vzorků při teplotě 95 °C po dobu 3–5 minut, čímž zaručíme, že ve vzorku budou přítomny především životaschopné spory *P. larvae* a ostatní mikroorganismy s potenciálně interferujícím vlivem při identifikaci budou eliminovány. Takto ošetřené vzorky jsou sterilní bakteriologickou kličkou přeneseny na živné médium a kultivovány po dobu nejméně 2 dnů, nebo do nárůstu viditelných kolonií (de Graaf *et al.*, 2013).

Vhodné živné médium pro kultivaci bakterie *P. larvae* musí obsahovat dostatek všech živin, které mohou být důležité pro růst této bakterie, a proto bylo první účinné médium připraveno z bujónu včelích larev (White, 1906). Vzhledem ke značné variabilitě složení a celkové časové náročnosti výroby takového média byla testována další média, která by mohla bujón z larev nahradit. Dingman a Stahly (1983) vyvinuli médium, skládající se z Mueller-Hintonova bujónu, kvasničného extraktu, pyruvátu sodného, K_2HPO_4 a glukosy, nesoucí souhrnný název MYPGP médium. Toto médium obsahuje všechny nezbytné živiny a zajišťuje sporulaci *P. larvae*, i když se spekuluje, že ne všechny kmeny na tomto médiu sporulují (Gende *et al.*, 2008; Dingman a Stahly, 1983). Mezi další

kultivační média, běžně užívaná ke studiu *P. larvae*, patří dále Brain-Heart infusion agar (BHI), Columbia blood agar (CSA) a také J agar (de Graaf *et al.*, 2013).

2.1.1.3 Identifikace *P. larvae*

Po úspěšné kultivaci lze provést katalasový test, který se v pozitivním případě projeví vývojem bublinek kyslíku, pokud přeneseme vzorek bakteriální kultury z pevného média a bakteriologickou kličkou jej vložíme do kapky přibližně 5% (v/v) H₂O₂, což svědčí o přítomnosti enzymu katalasy (EC 1.11.1.6). Katalasový test je pozitivní pro rody *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Corynebacterium*, *Neisseria*, *Moraxella* a negativní pro rody *Streptococcus*, *Arcanobacterium* a především také *Paenibacillus*. Výsledek katalasového testu je čistě orientační a slouží spíše k rychlé identifikaci potenciální kontaminace jiným mikroorganismem (de Graaf *et al.*, 2006).

Spolehlivou metodou pro definitivní určení přítomnosti *P. larvae* je polymerázová řetězová reakce (PCR), pomocí níž amplifikujeme sekvence v genomu, které jsou pro tuto bakterii specifické, a nejen že identifikujeme bakterii *P. larvae*, ale můžeme také odlišit její jednotlivé genotypy. Dobbelaere (2001) vyvinul velmi robustní techniku PCR identifikace *P. larvae*, která funguje na principu amplifikace specifické oblasti genu pro 16S rRNA pomocí oligonukleotidových primerů blíže specifikovaných v Tab. 1. Versalovic (1994) popsal výskyt některých rozptýlených repetitivních sekvencí v genomu prokaryotních organismů a navrhnul sekvence oligonukleotidů, podle kterých by se daly prokaryotní organismy genotypizovat. Z hlediska genotypizace pomocí repetitivních sekvencí ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus), blíže popsanych v Tab. 2, momentálně rozlišujeme *P. larvae* na čtyři genotypy ERIC I–IV, přičemž původnímu poddruhu *P. larvae subsp. larvae* odpovídá ERIC I a II a poddruhu *P. larvae subsp. pulvifaciens* odpovídá ERIC III a IV. Tyto jednotlivé genotypy se navzájem odlišují morfologií kolonií, rozšířením, dobou a způsobem virulence (Heyndrickx *et al.*, 1996).

Tab. 1 Sekvence oligonukleotidů využívaných k identifikaci *P. larvae* (převzato z de Graaf *et al.*, 2006)

Název	Sekvence	Velikost výsledného ampliconu (bp)
AFB-FW	5'-CTTGTGTTTCTTTCGGGAGACGCCA-3'	1106
AFB-RW	5'-TCTTAGAGTGCCACCTCTGCG-3'	

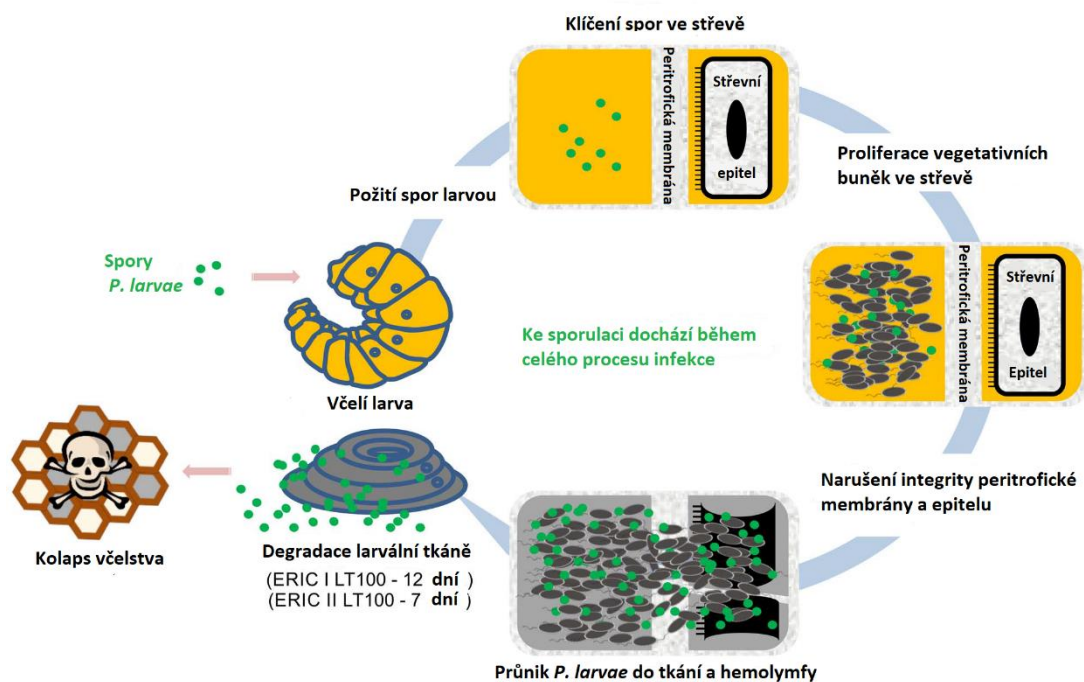
Tab. 2 Sekvence oligonukleotidů využívaných k rozlišení jednotlivých genotypů ERIC bakterie *P. larvae* (převzato z de Graaf et al., 2006)

Název	Sekvence	Velikost výsledného amplikonu (bp)
ERIC1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	více amplikonů
ERIC2	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	

2.1.1.4 Průběh onemocnění

Mor včelího plodu, jak již z názvu vypovídá, napadá včelí larvy a dospělci mají v tomto procesu nákazy čistě roli přenašeče a klinické příznaky se u nich neprojevují. Nejkritičtější je z hlediska nákazy období raného larválního stadia, tedy 12–36 hodin od vylíhnutí, kdy byl v *in vitro* experimentu počet spor nutných k úspěšnému započítání infekce stanoven na přibližně deset buněčných spor bakterie *P. larvae* (Brodsgaard *et al.*, 1998). Poté co je včelí larva vystavena sporám *P. larvae*, ať už jejich požitím v potravě, nebo po zavíčkování do již předem kontaminované buňky, dochází ve střevě k vyklíčení bakterie do vegetativního stavu, který doprovází velmi intenzivní množení buněk (Obr. 2). Po mohutné proliferaci dochází k průniku skrz peritrofickou membránu a epitelovou tkáň střeva, přičemž se patogenní bakterie dostanou do hemolymfy (Yue *et al.*, 2008). Následnou degradací larvy uvnitř včelí buňky dochází ke vzniku táhlé tmavé hmoty, po jejímž zaschnutí vzniká šupinovitá struktura – příškvár, obsahující velké množství spor (Gregorc a Bowen, 1998).

Doba mezi požitím spor larvou po její úhyn se výrazně liší v závislosti na genotypu *P. larvae*. Genotypy ERIC II–IV se vyznačují velmi rychlým průběhem onemocnění, které trvá přibližně sedm dní, konkrétně byl stanoven letální čas během kterého uhynulo 100 % jedinců kontrolní skupiny larviček (anglicky lethal time – LT a v tomto experimentu pro genotypy ERIC II-IV byl stanoven na $LT_{100} = 7$ dní) od nákazy po uhynutí larev, ale inkubační doba genotypu ERIC I je o poznání delší, jelikož infikované larvy jsou usmrceny až po přibližně dvanácti dnech ($LT_{100} = 12$ dní) (Genersch *et al.*, 2005).



Obr. 2 Modelové schéma průběhu infekce moru včelího plodu. (převzato a upraveno dle Djukic 2014)

2.1.2 Hniloba včelího plodu

Hniloba včelího plodu (anglicky European foulbrood, dále EFB) a mor včelího plodu byly původně považovány za totožné onemocnění způsobené bakterií *Bacillus alvei* (Chesire a Cheyne, 1885). Odlišení těchto chorob od sebe dokázal až White (1912), který předpokládal, že původcem hniloby včelího plodu je bakterie *Bacillus plutonius* jejíž izolace ale nedosáhnul. Bailey (1983) specifikoval jako přímého původce hniloby včelího plodu bakterii *Melissococcus plutonius* a vyvrátil tak domněnky o bakterii *Bacillus alvei*, které byla tato role původně přisuzována. Následně došlo k reklasifikaci této bakterie na nynější název *Paenibacillus alvei*, ale faktem zůstává, že je tato bakterie také často přítomna v larvách s onemocněním hniloby včelího plodu jako druhotný patogen. *M. plutonius* je gram-pozitivní, vícejednotkové koky formující, mikroaerofilní až anaerobní bakterie, která ke svému růstu vyžaduje oxid uhličitý (Chesire a Cheyne, 1885).

Hniloba včelího plodu se nejčastěji projevuje u nezavíčkovaných, 4–5 dní starých larev. Onemocnění doprovází morfologické změny, které lze na larvě pozorovat jako například pohyb a změna pozice larvy v buňce. Dále také pozorujeme změnu barvy (viz Obr. 3) z bílé přes žluté až žlutohnědé, a nakonec také tmavošedé zbarvení (Bailey, 1983). Poté co larva požije potravu kontaminovanou bakterií *M. plutonius*, dochází k mohutnému zmnožení a ke kolonizaci středního střeva, během kterého se bakterie živí larvální potravou.



Obr. 3 Klinické příznaky hniloby včelího plodu. Typicky pozorovatelné nestandardní pozice larev v buňce a změna jejich barvy. (převzato z Forsgren 2009)

Původní úvahy o čistě kompetičním charakteru choroby (Tarr, 1936), kdy bakterie soupeří s larvou o zisk živin dokud larva nevyhladoví, byly vyvráceny experimentem zabezpečujícím larvě dostatek potravy i během infekce, při níž nedošlo k výrazně snížené mortalitě (oproti infikovaným nutričně nezabezpečeným larvám) (McKee *et al.*, 2004). Mechanismus patogeneze je tedy komplexnější, ale doposud blíže nespecifikovaný, přičemž se uvažuje o několika faktorech, které se na usmrcení larvy podílejí jako: narušení peritrofické membrány a znemožnění příjmu živin (McKee *et al.*, 2004) či blíže nespecifikované interakce *M. plutonius* s dalšími intestinálními mikroorganismy (Gilliam, 1997).

Existuje několik mikroorganismů, které souvisejí s bakterií *M. plutonius* ať už ve smyslu jejich izolace během onemocnění hnilobou včelího plodu, nebo kvůli jejich předešlé záměně za původce tohoto onemocnění. Jedním z těchto mikroorganismů je saprofytická, sporulující, aerobní bakterie *Paenibacillus alvei*, která není schopná přežít v larválním lumen střev, ale lze ji identifikovat v částech infikované včelí larvy (Bailey, 1963). Další bakterie, které lze izolovat z larev infikovaných hnilobou včelího plodu jsou: *Achromobacter euridice*, *Enterococcus faecalis* a také *Brevibacillus laterosporus*.

Včelí dospělci z více než třetiny včelstev, nevykazujících klinické příznaky hniloby včelího plodu, pocházejících ze zdravých včelnic mohou být přenašeči bakterie

M. plutonius a v přítomnosti klinických příznaků ve včelnici tato pravděpodobnost roste (Belloy *et al.*, 2007). Vypuknutí onemocnění může souviset se stresovými podmínkami (výživovými a vlhkostními), počasím či genetickými faktory (Bailey, 1983). Těmito předešlými skutečnostmi se v posledních letech zabývají vědci mimo jiné z důvodů prudce rostoucí incidence propuknutí tohoto onemocnění ve Švýcarsku (Belloy *et al.*, 2007), Anglii (Budge *et al.*, 2010) a po více než 40 letech také v Česku (Erban *et al.*, 2017).

2.2 Obranné mechanismy včel proti bakteriálním infekcím

Komplexní systém zodpovědný za neustálé odolávání potenciálním patogenům by se dal shrnout do tří úrovní. Zaprvé se jedná o fyzikální bariéry, které zahrnují peritrofickou membránu, tracheje, stěnu střev a kutikulu, které slouží primárně jako zeď zabraňující vstupu mikroorganismů do tkání a vnitřních struktur organismu. Dalším obranným instrumentem je buněčná imunita, kterou zprostředkovávají koordinované odpovědi několika skupin hemocytů, pomocí receptorů na jejich povrchu. Poslední obranu úzce spjatou s buněčnou imunitou je přítomnost antimikrobiálních peptidů a proteinů v tkáních a hemolymfě včel, syntetizovaných v tukovém tělese, hemocytech a slinných žlázách, celkově nazývaných jako humorální imunita (Gillespie *et al.*, 1997).

2.2.1 Sociální imunita

Na včelu nelze pohlížet jako na jednotlivce, nýbrž jako na součást včelstva, které tvoří superorganismus, skládající se z tisíců jedinců, vzájemně kooperujících na společném bytí, se společným cílem zachování integrity, imunity a přežití včelstva. Včely provádějí řadu opatření, která zamezují vstupu patogenu do včelstva, či jeho šíření v něm. Mezi tato opatření patří dělba práce (snížení počtu jedinců v přímém kontaktu s patogenem), selekce jedinců při vstupu do úlu (znemožnění vstupu infikovaným jedincům) a především také hygienické chování včel (zahrnující sběr antimikrobiálních látek, použití vlastních sekrečních látek, úklid úlu, buněk a uhynulých těl) společně s procesem samočištění neboli grooming (Cremer *et al.*, 2007).

2.2.1.1 Hygienické chování včel

Důležitým obranným faktorem je hygienické chování včelstev jako celku. Nejmladší včelí dělnice se zaměřují na čištění buněk plástu, aby zde matka mohla opět naklást vajíčka. Detekce infikovaných či uhynulých larev v jednotlivých buňkách, jejich následné odvíčkování a úklid, je činnost významně snižující přenos patogenu mezi jednotlivci včelstva (Rothenbuhler, 1964). Včely vykazují hygienické chování po dosažení středního

věku (15-17 dní), ale k tomuto chování dochází přibližně pouze u pětiny včel v kolonii, přičemž ti jedinci, u kterých se hygienické chování projeví stráví přibližně 42 % času odvíčkováváním a úklidem buněk (Arathi *et al.*, 2000).

Vliv úklidu buněk infikovaných morem včelího plodu na šíření a průběh nemoci závisí na fázi nakažení. Čištění buněk od příškvary (konečný stav nákazy s velkým počtem spor) má účinek vysoce kontaminační, ale na druhou stranu úklid před dosažením sporulace mikroba snižuje šíření a zabraňuje průběhu nemoci. Z tohoto důvodu je důležité zmínit, že čím dříve dospěje onemocnění do stadia příškvary, potažmo čím dříve zabije patogen včelí larvu, tím dříve také dojde k jejímu rozpoznání včelí dělnicí, která následně provádí úklid buňky, a proto je úspěšnost rozpoznání infikovaných larev větší u onemocnění způsobeném genotypem ERIC II a méně úspěšné u genotypu ERIC I, který je tedy výrazně virulentnější (Rauch *et al.*, 2009).

2.2.2 Peritrofická membrána

Jednou z nejdůležitějších fyzikálních bariér, zamezujících potenciálně patogenním mikroorganismům proniknout přímo skrze buňky střevního epitelu do útrobu včelího organismu, je peritrofická membrána (dále PM). Tato první ochranná linie je jakousi funkční obdobou hlenu, který vylučují na povrch střevních epitelálních buněk obratlovci za stejným účelem jako je tomu u PM bezobratlých (Brandt *et al.*, 1978).

Rozlišujeme dva typy PM, kdy první typ PMI vzniká ve specializovaných buňkách střevního epitelu po celé ploše středního střeva a je specifická pro řády: blanokřídlí (*Hymenoptera*), brouci (*Coleoptera*) či jepice (*Ephemeroptera*). PM druhého typu (PMII), která vykazuje větší organizaci se skládá z více vrstev a je syntetizována specializovanou tkání (česlo) na rozhraní medného váčku a střeva, přičemž mezi řády s tímto typem PM řadíme: larvy dvoukřídlých (*Diptera*), či snovatky (*Embiodea*) (Hegedus *et al.*, 2009).

Chemické složení peritrofické membrány je variabilní (obsah specifických proteinů a glykoproteinů), ale nacházíme zde podobnosti jako přítomnost chitinových fibril, nerozpustných strukturních jednotek N-acetylglukosaminu propojených β -(1,4) glykosidickými vazbami, které tvoří základní funkční strukturu PM. Další důležitou strukturní a funkční složkou jsou s PM asociované proteiny, které se dělí do čtyř tříd na základě jejich možné separace od PM a to: zcela rozpustné v pufrách (I), extrahovatelné slabými detergenty (II), anebo silnými denaturačními činidly (III) a nakonec proteiny zcela neoddělitelné od PM (IV). Nehledě na typ PM je pro její funkci

důležitá přítomnost specifických integrálních proteinů, náležících do třetí třídy podle předešlého dělení, souhrnně nazývaných jako peritrofiny, které zastávají v PM důležitou strukturní funkci díky jejich schopnosti interagovat s chitinem a dalšími proteiny PM (Hegedus *et al.*, 2009; Tellam *et al.*, 1999).

2.2.3 Symbiotické organismy

Důležitým orgánem včely medonosné (*Apis mellifera*), jak z hlediska přínosu nektaru, medovice a vody, tak pro využití jako rezervoáru symbiotických laktobakterií, je medné volátka. Bakterie mléčného kvašení (anglicky Lactic Acid Bacteria, dále LAB) jsou nedílnou součástí včel a podílejí se nejen na fermentačních procesech při tvorbě včelích produktů, ale mají také přímou souvislost s imunitou včel. Jedná se především o rody *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, jejichž přítomnost byla potvrzena jak v medném volátku, tak v medu (Vasquez a Olofsson, 2009). Povrch medného volátka je pokryt biofilmem tvořeným LAB, které produkují antimikrobiální látky jako organické kyseliny, proteiny, enzymy a bakteriociny (Vasquez *et al.*, 2012). Přítomnost specifických LAB v medu má negativní vliv na růst *P. larvae* a podání potravy doplněné směsí LAB larvám působí přímé snížení počtu infikovaných larev. Pokud je larvě podána potrava s obsahem 5×10^3 spor/ml doplněná směsí LAB, tak se podíl uhynulých larev (po 14 dnech) k přeživším snižuje o jednu desetinu v porovnání se situací bez doplnění potravy o tyto LAB (Forsgren *et al.*, 2010). Je důležité zmínit, že se jednalo o směs LAB izolovanou z medného volátka, jelikož samostatné kmeny a referenční mikroorganismus *Lactobacillus kunkeei* vykazovaly nižší antimikrobiální aktivitu než ona směs, což svědčí o synergickém efektu těchto mikroorganismů (Forsgren *et al.*, 2010).

2.3 Extracelulárně sekretované proteiny a peptidy bakterií se zaměřením na bakterii *Paenibacillus larvae*

Bakterie během svého růstu extracelulárně produkují do svého prostředí peptidy, proteiny a různé metabolity. Sekreční systém a samotné sekretované proteiny a peptidy jsou nezbytné pro bakteriální růst, kompetici o prostor a přežití s cizorodými organismy, mezibuněčnou komunikaci, detoxifikaci prostředí a u patogenních bakterií plní kritickou funkci virulenních faktorů. Produkce těchto proteinů a peptidů může být zajištěna ribosomální biosyntézou, ale také neribosomální cestou pomocí neribosomálních peptidových syntetas (Finking a Marahiel, 2004).

2.3.1 Antibiotika

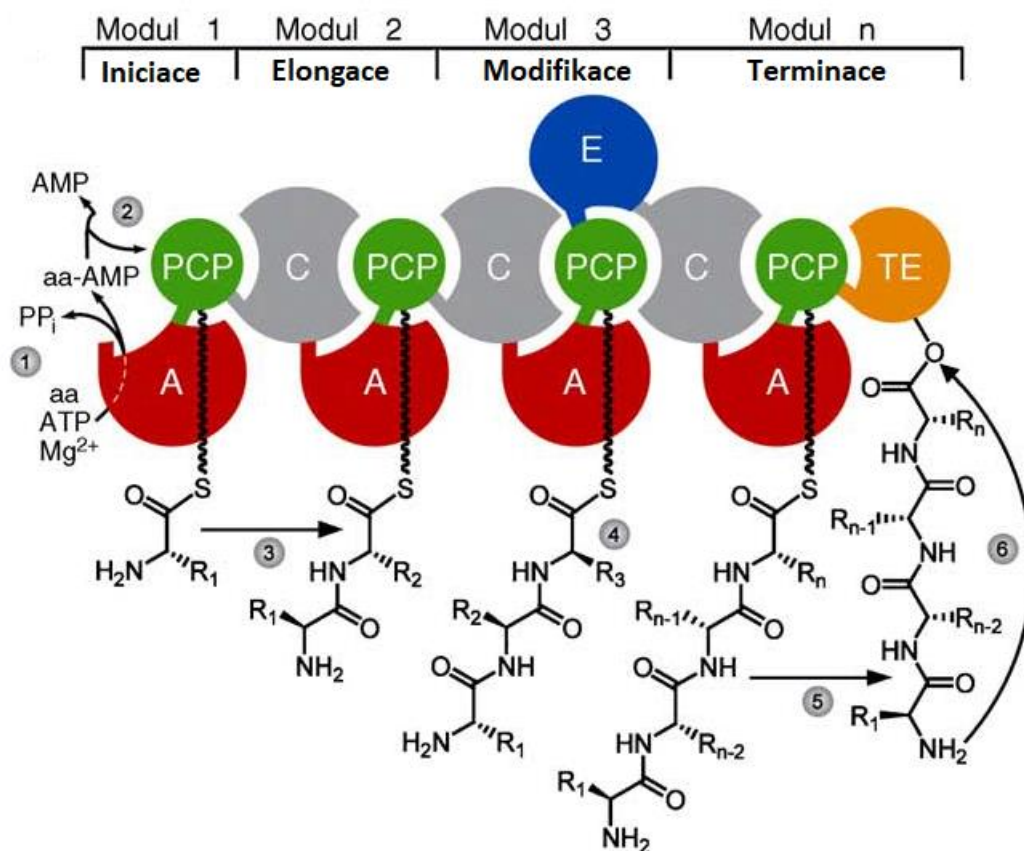
Antibiotika jsou látky původně mikrobiálního původu, jejichž historie využití se datuje již tisíce let před naším letopočtem, kdy byly využívány například obklady z plísní k zamezení šíření infekce (Bednář *et al.*, 1996). V širším pojetí lze chápat antibiotikum jako jakoukoliv látku sekundárního metabolismu produkovanou organismem (bakterie, houba) mající bakteriostatický (inhibující růst), či bakteriocidní (usmrcení mikroorganismu) účinek na jiný mikroorganismus. Taková definice by mohla být rozšířena také o antibiotika rostlinného původu jako je například allicin, což je látka obsažená v rostlinách česneku (*Allium*), která má účinky nejen antibakteriální (například proti rodům *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Bacillus*), antivirotické (proti lidskému cytomegaloviru), ale také působí antifungálně (Ankri a Mirelman, 1999).

Antibiotika produkovaná bakteriemi a houbami však vykazují určitá specifika, a to především velkou diversitu ve svém složení, ve kterém nalezneme neobvyklé neproteinogenní aminokyseliny, D-aminokyseliny, hydroxyaminokyseliny a také obvyklé modifikace N-methylací, či cyklizujícími reakcemi. To, jak mikroorganismy syntetizují tyto látky bylo zcela pochopeno až nedávno (Kleinkauf a Vondohren, 1990) a doposud je toto téma podrobno bedlivému výzkumu, přičemž byly identifikovány a popsány multienzymové komplexy, mající schopnost syntetizovat rozmanité struktury co do složení, to do biologické aktivity (Strieker *et al.*, 2010; Finking a Marahiel, 2004).

2.3.1.1 Neribosomální peptidové synthetasy

Tyto multienzymové komplexy, které dělíme na neribosomální peptidové synthetasy (NRPS), polyketidové synthasy (PKS) a kombinované neribosomální polyketidové peptidové synthetasy (NRPS-PKS), jsou schopny syntetizovat množství sekundárních metabolitů ve formě proteinů a peptidů s antibakteriálními, cytotoxickými a dalšími vlastnostmi (Djukic *et al.*, 2014; Strieker *et al.*, 2010). Na rozdíl od ribosomálně syntetizovaných proteinů, jejichž sekvence aminokyselin se odvíjí od templátu mRNA, jsou NRPS a PKS organizovány do modulů, které postupně aktivují a kondenzují specifické aminokyseliny do vznikajícího řetězce malého peptidu. Každý NRPS modul se skládá nejméně ze tří domén (Obr. 4), a to z adenylační A domény (zde dochází ke specifickému rozpoznání a aktivaci aminokyseliny za vzniku aminoacyladenylátu), thiolační PCP (někdy T) domény (fixace aktivované aminokyseliny přes thioesterovou vazbu), kondenzační C domény (katalýza kondenzační reakce vzniku peptidické vazby)

a poslední esenciální doménou je thioesterasová TE doména, zodpovědná za uvolnění finálního produktu z multienzymového komplexu (Strieker *et al.*, 2010).



Obr. 4 Obecné schéma neribosomální syntézy peptidu. (1) Aktivace aminokyseliny jako aminoacyl-AMP adenylační doménou A. (2) Přenos aktivované aminokyseliny na thiolační doménu PCP. (3) Kondenzace aminokyseliny a PCP-vázané aminokyseliny. (4) Modifikace vznikajícího peptidu (zde epimerizační doménou E). (5) Transesterifikace vznikajícího peptidového řetězce z terminální PCP domény na thioesterasovou doménu TE. (6) Uvolnění produktu z TE domény hydrolyzou nebo cyklizací. (převzato a upraveno podle Strieker 2010).

Pokud bychom uvažovali nad výhodami neribosomální syntézy sekundárních metabolitů nabízí se zmínit větší diversitu substrátů (popsány stovky látek) (Marahiel *et al.*, 1997), ze kterých je možné finální látky syntetizovat, zatímco ribozom má na výběr pouze z 20 proteinogenních aminokyselin (mimo selenocystein, pyrolysin a N-formylmethionin). Nepopíratelnou výhodou ribosomální syntézy je schopnost korektury chybně zařazených komponent v sekvenci, jelikož bezchybnost sekvence takového proteinu či peptidu je stěžejní v mechanismech primárního metabolismu (Finking a Marahiel, 2004).

2.3.1.2 Klasifikace a někteří zástupci antibiotik

Antibiotika je možné rozdělit na několik skupin na základě jejich struktury, způsobu účinku, nebo podle mikroorganismů na které jsou zacílena. Podle základního dělení vycházejícího ze struktury antibiotik lze tyto látky rozdělit na: β -laktamy, aminoglykosidy, tetracykliny, makrolidy, linkosamidy, glykopeptidy, lipopetidy, chinolony, antimykotika a sulfonamidy (Bednář *et al.*, 1996). Podle mechanismu účinku rozlišujeme antibiotika degradující, či inhibující syntézu buněčné stěny (například peniciliny, bacitracin a vancomycin), degradující či inhibující syntézu cytoplasmatické membrány (polymyxiny), inhibující proteosyntézu (tetracykliny, erythromycin, spectinomycin) a poslední skupinou jsou antibiotika modifikující energetický metabolismus (sulfonamidy, trimethoprim) (Neu, 1992).

Tetracykliny byly objeveny téměř před sto lety u zástupců rodu *streptomyces*, což jsou gram-pozitivní aerobní, tyčinkovité bakterie, které disponují mohutným sekundárním metabolismem a mimo produkci tetracyklinů jsou zodpovědné za syntézu dalších antibiotik jako neomycin, cypemycin, grisemycin, bottromycin a chloramphenikol (Chopra a Roberts, 2001). Obecný mechanismus účinku tetracyklinů spočívá v inhibici proteosyntézy znemožněním vazby aminoacyl-tRNA na akceptorové místo na ribosomu. Skrze vnější membránu gram-negativních bakterií se tetracykliny transportují ve formě komplexu tetracyklin- X^{2+} (obvykle platí, že $X = Mg$) přes porinové kanály OmpF a OmpC, přičemž po průniku do periplasmy tento komplex disociuje a volné antibiotikum, vykazující slabě lipofilní charakter, prochází vnitřní membránu do cytoplasmy napadené bakterie (u gram-pozitivních bakterií nemusí tetracyklin vnější membránou procházet) (Chopra *et al.*, 1992).

Vzhledem k velké nadprodukci a nadužívání syntetických antibiotik vzniká u bakterií a dalších mikroorganismů indukovaná rezistence vůči těmto látkám, což prakticky neguje jejich účinek proti danému onemocnění. Mnozí zástupci rodů *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonas* jsou proti dříve vyvinutým antibiotikům prakticky zcela rezistentní a v některých případech se hovoří až o krizi, která má několik potenciálních řešení (Neu, 1992). Především tato krize akcelerovala výzkum zaměřený na identifikaci nových potenciálních antibiotik, které by mohly rezistentní bakterie přemoci „ze zálohy“. Nedávné studie (Cochrane a Vederas, 2016) sekundárních metabolitů bakterií rodů *Bacillus* a *Paenibacillus* přinesly v této oblasti povzbudivé výsledky. Oba zmíněné rody produkují neribosomálně syntetizovaná lipopeptidová

antibiotika konkrétně charakterizovaná jako polymyxiny, octapeptiny, polypeptiny, ituriny a další. Lipopeptidy jsou lineární nebo cyklické peptidy obsahující lipofilní uhlíkatý řetězec lokalizovaný na N-konci. Účinky lipopeptidů jsou variabilní, ale obvykle zahrnují narušení integrity buněčné membrány a dále působí na reorganizaci vnitřních struktur a organel v buňce (Cochrane a Vederas, 2016; Stein, 2005)

2.3.2 Antimikrobiální peptidy

Geneticky kódované, ribosomálně syntetizované peptidy s antimikrobiální aktivitou nesou souhrnný název antimikrobiální peptidy (AmP). I přes to, že se jedná o skupinu peptidů různých primárních struktur, obvykle nesou podobné znaky v náboji (jsou převážně kationtového charakteru) a také v amfifilní povaze, což jim umožňuje interagovat s negativně nabitým povrchem bakteriální buněčné stěny a také tvořit v membráně póry, či ji také jinak narušovat (Boman, 1996).

Antimikrobiální peptidy jsou produkovány savci (*mammalia*), ptáky (*aves*), obojživelníky (*amphibia*), hmyzem (*insecta*) a rostlinami, kdy je u těchto zmíněných skupin živočichů produkce AmP obvykle spojena s imunitní odpovědí a spouštěcím stimulem jejich biosyntetických drah je přítomnost specifických molekul na povrchu cizorodých organismů, které nejsou hostitelskému organismu vlastní (Cammue *et al.*, 1994; Casteels *et al.*, 1989). Jednou z těchto molekul je peptidoglykan, který se nachází na povrchu gram-pozitivních a v periplasmě gram-negativních bakterií, u kterých jsou z hlediska imunitní odpovědi hostitele důležité lipopolysacharidy nacházející se na povrchu buněk (Hancock a Diamond, 2000). AmP však nejsou syntetizovány pouze výše zmíněnými skupinami živočichů, ale také samotnými bakteriemi (zde hovoříme o bakteriocinech) za účelem přežití a využití jejich biologických vlastností v kompetičních strategiích (NissenMeyer a Nes, 1997). Typ, struktura a funkce bakteriocinů se výrazně liší mezi zástupci gram-pozitivních a gram-negativních bakterií.

2.3.2.1 Bakteriociny gram-negativních bakterií

Mezi nejprostudovanější bakteriociny gram-negativních bakterií patří bezesporu koliciny produkované bakterií *Escherichia coli*. Další skupinou bakteriocinů jsou mikrociny produkované bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae*, odlišující se od kolicinů především nižší molekulovou hmotností (Papagianni, 2003).

2.3.2.1.1 Koliciny

Jedná se o proteiny o molekulové hmotnosti obvykle větší než 20 kDa, které inhibují růst příbuzných bakteriálních kmenů. Genové klastry uchovávající genetickou informaci

zprostředkovávající produkci a regulaci kolicinů jsou uloženy v plazmidech. Zde jsou také uloženy geny, kódující proteiny zajišťující specifickou imunitu proti produkovaným kolicinům a dále lytické proteiny s funkcí uvolnění kolicinů do vnějšího prostředí (Cascales *et al.*, 2007). Tento stresově indukovaný lytický protein umožňuje uvolnění kolicinu do extracelulárního prostoru se současným zánikem buňky produkující kolicin a také buněk přímo sousedících, rozpoznaných kolicinem (v závislosti na receptorové doméně daného kolicinu, vázající se na povrchový receptor cizí buňky) (Gordon a O'Brien, 2006).

2.3.2.1.2 Mikrociny

Mikrociny jsou bakteriociny o molekulové hmotnosti 5–10 kDa, jejichž zvýšenou produkci detekujeme při zhoršených výživových podmínkách, či při log fázi růstu na nutričně chudých médiích. Vykazují silnou antimikrobiální aktivitu vůči fylogeneticky příbuzným bakteriálním druhům (Duquesne *et al.*, 2007). Na rozdíl od kolicinů není produkce a sekrece mikrocínů spojena s buněčnou smrtí organismu produkujícího daný bakteriocin, což přináší bakterii kompetiční výhodu. Dalším významným rozdílem je posttranslační modifikace mikrocínů, ke které u kolicinů nedochází (Nolan *et al.*, 2007). Mikrociny můžeme z hlediska místa působení rozdělit do tří skupin, kdy mikrociny skupiny A inhibují enzymy metabolických drah, jiné jsou schopny inhibovat replikaci DNA (skupina B) a poslední skupinou jsou mikrociny skupiny C, které znemožňují napadeným mikroorganismům plnohodnotně získávat energii (NissenMeyer a Nes, 1997).

Jako příklad lze uvést mikrocín B17, což je posttranslačně modifikovaný peptid bohatý na glycin spadající do mikrocínů skupiny B. Mechanismus účinku tohoto mikrocínu spočívá v inhibici enzymu DNA gyrasy (EC 5.99.1.3), což je specifická topoisomerasa typu II, umožňující dvouvláknové DNA během replikace docílit správné prostorové orientace díky negativnímu nadšroubovicovému vinutí po jejím rozvolnění enzymem helikasou (EC 3.6.4.12). Zamezením regulace nadšroubovicového vinutí během replikace dochází k nestandardní konformaci a interakcím mezi jednotlivými vlákny DNA, což má za následek aktivaci SOS systémové odpovědi, degradaci takto defektní struktury a končí buněčnou smrtí (Liu, 1994).

2.3.2.2 Bakteriociny gram-pozitivních bakterií

Bakteriociny produkované gram-pozitivními bakteriemi jsou obvykle menší molekulové hmotnostní než 6 kDa, ale sdílejí řadu vlastností s bakteriociny gram-negativních bakterií

jako kationtovou a amfipatickou povahu, či schopnost permeabilizovat fosfolipidové membrány. Velká důležitost je přičítána bakteriocinům produkovaným bakteriím mléčného kvašení (LAB), které se dělí do čtyř tříd: posttransalčně modifikované, či také lantibiotika (třída I), teplotně stabilní bez modifikací (třída II), teplotně labilní s větší molekulovou hmotností (třída III) a komplexní bakteriociny nesoucí lipidové a další uhlovodíkové součásti (třída IV) (Papagianni, 2003). Velký význam mají bakteriociny produkované gram-pozitivními bakteriemi využívanými při produkci potravin, vzhledem k jejich konzervačním účinkům (Klaenhammer, 1993).

Lantibiotika jsou důležitou skupinou bakteriocinů gram-pozitivních bakterií a ač může být název zavádějící, doopravdy se jedná o ribosomálně syntetizované látky (ne o skupinu antibiotik, které jsou syntetizovány neribosomálně). Název je odvozen od skutečnosti, že tyto látky obsahují neproteinogenní aminokyseliny jako lanthionin, β -methyllanthionin a někdy také D-alanin (Ryan *et al.*, 1999). Lantibiotika dělíme na dvě podskupiny, a to na lineární (skupina A) a globulární (skupina B) peptidy (NissenMeyer a Nes, 1997). Lantibiotika skupiny A jsou charakteristická lineárními, helikálními a flexibilními molekulami s kladným nábojem, díky němuž mohou interagovat s membránou napadeného mikroorganismu.

Velmi dobře prostudovaným lantibiotikem skupiny A je nisin, který byl identifikován jen několik let po nález penicilinu z bakterie *Lactococcus lactis* a brzy nato se začal využívat jako konzervant potravin (Klaenhammer, 1993; Mattick a Hirsch, 1947). Nisin je syntetizován jako prepeptid, který prochází několika posttranslačními modifikacemi jako: dehydratace serinových a threoninových residuí, vznik můstků mezi lanthioninovými residui a odštěpení vedoucí N-koncové peptidové sekvence (Nagao *et al.*, 2006). Mechanismus bakteriocidního účinku nisinu spočívá v interakci s lipidem II (prekurzor peptidoglykanu a důležitý intermediát biosyntézy buněčné bakteriální stěny), přičemž dochází ke vzniku pórů v cytoplasmatické membráně, inhibici syntézy buněčné stěny a k difúzi malých molekul (volné aminokyseliny, ATP) z buňky ven skrze póry (Breukink *et al.*, 1999; Wiedemann *et al.*, 2001).

2.3.3 Extracelulárně produkované enzymy

2.3.3.1 Enolasa

Nález enolasy (EC 4.2.1.11) v extracelulárním prostředí především gram-pozitivních bakterií byl překvapujícím objevem, jelikož tento enzym je zejména cytosolický, účastní se glykolýzy, katalyzující přeměnu 3-fosfoglycerátu na fosfoenolpyruvát.

Bergmann (2001) poukázal na dvojí funkci tohoto enzymu, který je přítomný jak na povrchu buněk některých bakterií, tak sekretovaný s jeho potenciální rolí důležitého virulenciho faktoru. Mimo svou esenciální roli v metabolických pochodech v cytoplasmě může být enolasa také zodpovědná za aktivaci plasminogenu, což je fibrolytický proenzym degradující fibrin, fibronektin a laminin (Plow *et al.*, 1995). Aktivace plasminogenu má přímý vliv na aktivaci dalších proteolytických enzymů, které mohou štěpit kolagen, elastin a proteoglykany, což využívají mnohé grampozitivní bakterie jako *Streptococcus pneumoniae* (Bergmann *et al.*, 2001), *Lactobacillus crispatus* (Hurmalainen *et al.*, 2007) a především také *Paenibacillus larvae* (Antunez *et al.*, 2011a).

Enolasa produkovaná *P. larvae* má přímý vliv na mortalitu včelích larev, kdy LC₅₀ (letální koncentrace, jež usmrtí 50 % organismů z testované skupiny) odpovídá 4 ng·μl⁻¹ enolasy v potravě. Její přítomnost v larvě vyvolává imunitní odpověď, kdy dochází ke zvýšené expresi abaecinu (AmP). Sekrece enolasy vegetativními buňkami *P. larvae* a její přítomnost na povrchu spor byla dokázána imunofluorescenční mikroskopií (Antunez *et al.*, 2011a).

2.3.3.2 Proteasy

Mikrobiálně produkované proteasy tvoří velkou a rozmanitou skupinu enzymů a jejich komerční využití tvoří až 40% podíl v celosvětovém obchodu s enzymy zejména proto, že disponují požadovanými vlastnostmi a proces biotechnologické produkce je ekonomicky výhodnější než jejich zisk z rostlinných a živočišných zdrojů (Arbige a Pitcher, 1989). Mikroorganismy využívají proteasy v nespočetném množství buněčných pochodů jako například v metabolickém obratu bílkovin, procesu sporulace a následnému návratu k vegetativnímu stavu, nebo k modifikaci enzymů ze zymogenních prekurzorů do jejich aktivních forem a jejich následné degradaci. Funkce proteas sekretovaných bakteriemi do prostředí je spjatá především s proteolytickým štěpením větších polypeptidů za účelem zisku menších oligopeptidů a aminokyselin, které je bakteriální buňka schopna jednoduše transportovat a intracelulárně využít (Rao *et al.*, 1998).

V genomu *P. larvae* bylo identifikováno více než sto funkčních a téměř kompletních genů kódujících proteasy patřící do tříd serinových proteas a metaloproteas (Djukic *et al.*, 2014). Proteasy mohou být bakterií využity hned v několika strategiích, přičemž vzhledem k patogenitě *P. larvae* je jejich funkce spjatá s narušením integrity PM, destrukcí antimikrobiálních peptidů produkovaných včelí larvou a také aktivitou v saprofytickém období infekce. Oba genotypy *P. larve* (ERIC I a ERIC II) disponují

potenciálně funkčním genem pro metaloendopeptidasu podobnou enhancinu. Enhancin je protein původně identifikovaný u granulovirů, kde je inkorporovaný do proteinového obalu (okluzní matrice) a po uvolnění napomáhá narušení integrity PM proteolýzou strukturních peritrofinů (proteiny v PM, zajišťující soudržnost chitinových fibril) a tím také zvyšuje celkovou permeabilitu PM (Toprak *et al.*, 2012).

Další ze zmíněných funkcí sekrečních proteas *P. larvae* je kompletní degradace larvální tkáně v poslední fázi onemocnění, kdy bakterie saprofytický získává živiny v podobě peptidů získaných rozštěpením větších proteinových struktur (Dancer a Chantawannakul, 1997). Hrabák a Martínek (2007) pomocí zymografické analýzy blíže specifikovali proteasy sekretované *P. larvae* při kultivaci v MYPGP, přičemž detekovali želatinu degradující metaloproteasy o molekulové hmotnosti 74 a 42 kDa u dvoudenních kultur a 87, 74, 42 a 40 kDa u pětidenních kultur. Antúnez (2011b) ověřila gen *P. larvae* kódující jednu metaloproteasu pomocí klonování a implementace tohoto genu do plasmidu, který byl po přijetí bakterií *Escherichia coli* exprimován, izolován a purifikován a dále dokázala sekreci metaloproteasy v průběhu onemocnění moru včelího plodu. Jednalo se o enzym thermolysin (rodina M4) o hmotnosti 59 kDa, který byl již dříve identifikován (*Bacillus megaterium*, *Brevibacillus brevis*) a rozdíl v sekvenci aminokyselin vykazoval pouze v signální sekvenci. Signální sekvence je rozpoznávací identifikátor, podle kterého buňka translokuje tento preproenzym do příslušné organely či do extracelulárního prostoru (Adekoya a Sylte, 2009).

Proteasy patogenních bakterií často vykazují schopnost štěpit antimikrobiální peptidy (AmP), čímž inhibují část humorální složky imunitního systému. Včelí larvy disponují humorální imunitou a AmP, ale vlivem proteas, které sekretuje *P. larvae* je jejich antimikrobiální účinek intenzivně potlačován (Casteels *et al.*, 1989). *P. larvae* genotyp ERIC II (u genotypu ERIC I je gen znefunkčnen intronovou sekvencí) disponuje genem kódujícím metaloproteasu spadající do skupiny M6 peptidas, která vyazuje sekvenci shodu (41 %) s prekurzorem imunitního inhibitoru A (InhA), což je enzym štěpící specifické AmP hostitele, dříve identifikovaný u *Bacillus thuringiensis* (Djukic *et al.*, 2014).

2.3.3.3 Chitin degradující enzymy

Enzymy zprostředkující přeměnu a odbourávání chitinu jsou důležité pro organismy obsahující chitin, buď pro organismy využívající jeho enzymatickou degradaci za účelem zisku živin, nebo je penetrace chitinové vrstvy klíčová pro jejich životní strategii

(Rinaudo, 2006). Chitin je odolný strukturní biopolymer, jehož funkce byla blíže popsána například v kapitole o peritrofické membráně. Mimo peritrofickou membránu je chitin součástí buněčných stěn hub a je z něj také složen exoskelet bezobratlých (*Invertebrate*).

Většina chitinas spadá do skupiny glykosylhydrolas (GH), které se dále dělí podle sekvenční a funkční podobnosti na 14 skupin. Z této klasifikace se nyní oddělily enzymy původně spadající do skupin glykosidhydrolas 61 (GH61) a chitin vázajících modulů 33 (CBM33) a došlo k reklasifikaci do vlastní třídy enzymů lytických polysacharidových monooxygenas (LPMO - EC 1.14.99.53) podle databáze enzymů degradujících, tvořících či modifikujících glykosidické vazby (Carbohydrate Active Enzymes – CAZy – database) (Cantarel *et al.*, 2009).

2.3.4 Proteiny a peptidy sekretované bakterií *P. larvae*

Jedním z mechanismů penetrace a průniku bakterie až do hemolymfy napadené larvy může být využití proteinů a peptidů s různou biologickou aktivitou, které *P. larvae* extracelulárně produkuje. Antúnez (2009) provedla rozsáhlou identifikaci a charakterizaci proteinů a peptidů sekretovaných bakterií *P. larvae*, přičemž bylo nalezeno deset proteinů o molekulových hmotnostech 35–136 kDa, jejichž směs měla přímé toxické účinky na včelí larvy a jejich mortalita se zvyšovala s rostoucí dobou inkubace a koncentrací těchto proteinů.

2.3.4.1 Peptidy neribosomálního původu

Rozsáhlé sekvencování celého genomu *P. larvae* významně napomohlo k pochopení mechanismu patogenity jednotlivých genotypů této bakterie a odhalilo množství oblastí genomu kódujících NRPS a také hybridní NRPS-PKS. Djukic *et. al* (2014) našli v genomu obou zkoumaných genotypů (ERIC I a ERIC II) *P. larvae* dva hybridní NRPS/PKS genové klastry a oblasti kódující dvě NRPS, přičemž tyto čtyři multienzymové komplexy vykazovaly strukturní a funkční variabilitu mezi jednotlivými genotypy *P. larvae*. Neribosomálně syntetizované peptidy (případně lipopeptidy) a další struktury produkované NRPS, PKS či hybridními NRPS-PKS slouží bakteriím například k eliminaci cizorodých mikrobiálních konkurentů v lumen střeva včelí larvy (antibiotika: paenilarvin a paenilamicin), případně se jedná o látky se zatím zcela nevysvětlenou rolí v mechanismech patogenity, či antimikrobiální aktivity (bacillibactin) (Ebeling *et al.*, 2016).

2.3.4.1.1 Bacillibactin

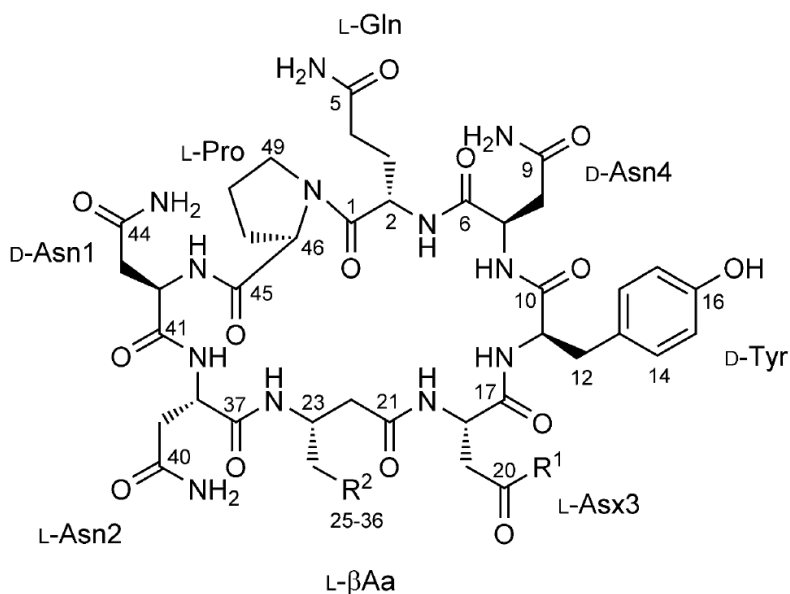
Jedna z NRPS přítomná u obou genotypů *P. larvae* je zodpovědná za syntézu bacillibactinu, což je nízkomolekulární katecholický siderofor (bakteriemi produkovaná látka vázající Fe^{3+}) vyskytující se u bakterií rodu *Bacillus* a s identickou strukturou také u *P. larvae*, mající důležitou roli při deficienci iontů železa v prostředí, což může být limitujícím faktorem pro jeho růst. Vzhledem ke specifickému účinku této látky a její sekrecí bakterií *P. larvae* do růstových médií právě s onou deficiencí železitých iontů se předpokládá, že je důležitá v pozdějších stádiích infekce, kdy je prostředí a nutriční složení rozkládající se larvální hmoty obdobné (viz Obr. 6) (Hertlein *et al.*, 2014; Winkelmann, 2002).

2.3.4.1.2 Paenilarviny

Jedna z hybridních NRPS-PKS specifická pro genotyp ERIC II produkuje lipopeptidové antibiotikum z rodiny iturinů o několika strukturních modifikacích nesoucích souhrnný název paenilarviny (rozlišujeme struktury A–C viz Obr. 5). Při testování toxicity paenilarvinů A a B na včelí (čtyřdenní) larvy vykazovala obě antibiotika vliv na mortalitu včelích larev při dávce 5 μg přečištěného antibiotika na jednu včelí larvu (u obou testovaných paenilarvinů došlo po aplikaci ke zvýšení mortality o 25–35 %) (Sood *et al.*, 2014).

Trochu rozporuplně se však jeví experiment srovnávající mortalitu včelích larev po podání spor mutantního kmenu *P. larvae* (genotyp ERIC II), kterému byla znemožněna syntéza NRPS-PKS zodpovědné za produkci paenilarvinů (knock out genu), přičemž oproti běžnému kmenu *P. larvae* (genotyp ERIC II, wild type) nevykazoval mutantní kmen snížený vliv na mortalitu včelích larev, jelikož u obou skupin infikovaných larev byl stanoven letální čas na osm dní ($\text{LT}_{100} = 8$ dní) a mortalita se pohybovala okolo 84 % (bez statisticky významných rozdílů mezi skupinami) (Hertlein *et al.*, 2016). Hertlein *et al.* (2016) dále poukazují na skutečnost, že při testování toxicity paenilarvinů A/B podáním 1,95 μg (dávka pro jednu včelí larvu) přečištěného antibiotika s potravou čtyřdenním včelím larvám nedošlo ke statisticky významnému rozdílu hodnot mortality mezi kontrolní skupinou a skupinou, které bylo antibiotikum podáváno. Vzhledem k rozporuplným výsledkům Hertlein (2016) zdůrazňuje, že již dávka 1,95 μg antibiotik, kterou v experimentu larvám podávali, překračuje reálné hodnoty (vzhledem k možnostem a množství *P. larvae* v jednotlivých fázích infekce) přibližně čtyřicetkrát (a dávka 5 μg tedy až stokrát) a je nutné tento fakt zahrnout do případných hypotéz.

Potvrzenou vlastností paenilarvinů je jejich inhibiční vliv na růst testovaných kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia membranifaciens*) a buněčných hub (*Mucor hiemalis*, *Aspergillus clavatus*), ale při experimentech nevykazovaly paenilarviny A/B inhibiční aktivitu proti testovaným bakteriím. Dále byla navrhována hypotéza o potenciální dvojí funkci tohoto antibiotika, které by mohlo mít také cytotoxickou funkci (potvrzenou na myších buňkách fibroblastů) na epiteliální buňky střeva larvy (Sood *et al.*, 2014). Jelikož však nové poznatky v oblasti toxicity a vlivu paenilarvinů na mortalitu včelích larev přinesly výsledky rozdílné, zpochybňující roli těchto látek jako virulenčních faktorů, je nutné přičíst této skupině antibiotik pouze jedinou vlastnost zvýhodňující *P. larvae* (genotyp ERIC II) a to účinně inhibovat růst potenciálních kompetitivních organismů (kvasinek a buněčných hub zmíněných v předešlém výčtu) zajišťující patogenní bakterii prostředí kompetice prosté (viz Obr. 6).



Paenilarvin A (**1**): $R^1 = \text{NH}_2$, $R^2 = (\text{CH}_2)_9\text{CHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3$

Paenilarvin B (**2**): $R^1 = \text{OH}$, $R^2 = (\text{CH}_2)_9\text{CHCH}_3\text{CH}_2\text{CH}_3$

Paenilarvin C (**3**): $R^1 = \text{NH}_2$, $R^2 = (\text{CH}_2)_8\text{CH}(\text{CH}_3)_2$

Obr. 5 Chemická struktura paenilarvinů. (převzato ze Sood 2014)

2.3.4.1.3 Sevadicin

Sevadicin je lineární neribosomálně syntetizovaný tripeptid o vlastní sekvenci D-Phe-D-Ala-Trp, identifikovaný u obou genotypů *P. larvae* (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014a). V genomu obou genotypů *P. larvae* byl objeven (*in silico*) genový klastř (v databázi NCBI – National Center for Biotechnology Information – dohledatelný pod identifikátorem KF318360), který odpovídá dvou genům (*sevA* a *sevB*) kódujícím

třimodulární NRPS, u níž se předpokládá schopnost syntézy sevadycinu (Chan *et al.*, 2011). Přítomnost této NRPS byla dále dokázána amplifikací sekvence obou genů pomocí PCR a stejnou technikou byla ověřena absence funkčních genů u knockout mutantů (postrádajících funkční gen *sevA* a *sevB*) obou genotypů *P. larvae*. Identifikace samotného tripeptidu byla provedena pomocí vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem (HR-ESI-MS), kterou byl nalezen signál odpovídající hodnotě *m/z* pro sevadicin. Tripeptid byl dále testován na antibakteriální aktivitu difuzními testy, přičemž účinně inhiboval růst bakterií obvykle asociovaných s včelami a včelími larvami (*Paenibacillus alvei*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus subtilis*, *Paenibacillus apiarus*). Mechanismus účinku tohoto antibiotika či případný vliv na včelí larvy nebyl doposud popsán, a pro lepší pochopení jeho funkce a účinku jej bude nutné dále zkoumat (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014a).

2.3.4.2 Proteiny S-vrstvy

Povrch buněk některých bakterií a archeí je tvořen monomolekulárními proteinovými či glykoproteinovými strukturami souhrnně nazývanými jako S-vrstva. Proteiny S-vrstvy mohou sloužit jako druhotná ochrana proti vnějším nežádoucím vlivům, virům, ale mají také význam při mezibuněčných povrchových interakcích, souvisejících s patogenitou dané bakterie (Sara a Sleytr, 2000). Poppinga (2012) analyzovala a popsala SplA protein S-vrstvy, který byl exprimován pouze u *P. larvae* genotypu ERIC II. Přítomnost SplA měla vliv na zvýšenou adhezi mezi povrchem bakterie a buňkami střevního epitelu včelí larvy (viz Obr. 6). Snížená adheze se projevila u buněk genotypu ERIC I, kterým chybí gen pro syntézu SplA, a také u mutantního ERIC II, u kterého byl proveden knockout genu exprimujícího SplA inzercí intronu do jeho původně funkčního čtecího rámce. Porovnáním virulence *P. larvae* ERIC II a SplA-knockout mutantu *P. larvae* ERIC II, byla zjištěna přibližně poloviční hodnota mortality včelích larev po podání spor mutantního *P. larvae*, neschopného exprimovat SplA, a proto lze považovat SplA protein S-vrstvy za důležitý faktor virulence, podílející se na celkové patogenitě *P. larvae* genotypu ERIC II.

2.3.4.3 Cytotoxiny

V genomu *P. larvae* byla nalezena místa se specifickými geny kódujícími proteinové cytotoxiny, avšak celistvý funkční gen je přítomen pouze u genotypu ERIC I (Djukic *et al.*, 2014). Jedná se o dva toxiny Plx1 a Plx2 spadající do třídy AB toxinů (Ebeling *et al.*, 2016; Funfhaus *et al.*, 2013). AB toxiny jsou často se vyskytující látky produkované

různými bakteriálními patogeny (*Clostridium*, *Bacillus*) za účelem rozrušení integrity buněk či inhibice buněčných pochodů napadeného organismu. Z hlediska struktury rozlišujeme enzymově aktivní A podjednotku a dále podjednotku B, která je zodpovědná za vazbu na receptor (doména R) na buněčném povrchu a také za translokaci (doména T) podjednotky A do cytoplasmy napadené buňky (Barth *et al.*, 2004).

Plx1 není zcela unikátním toxinem, jelikož jeho aminokyselinová sekvence koreluje s dalšími toxiny, které byly identifikovány především tedy u třídy *Insecta*. Lze uvést například toxin MTX1 produkovaný bakterií *Lysinibacillus sphaericus*, či cytotoxin ze skupiny pierisinů, které byly izolovány z larev motýlů (*Lepidoptera*) čeledi běláskovitých (*Pieridae*) a celkově lze funkční podjednotku těchto toxinů zařadit do skupiny ADP-ribosyltransferas (Carpusca *et al.*, 2004; Carpusca *et al.*, 2006). Předpokládá se, že Plx1 účinkuje následovně: podjednotka B zprostředkovává vazbu na receptor na povrchu buňky a indukují translokaci podjednotky A do intracelulárního prostoru, kde tato enzymaticky aktivní součást toxinu narušuje buněčné pochody, což vede ke změně morfologie buněk (viz Obr. 6) destrukci cytoskeletu (konkrétně aktinových polymerů) (Funfhaus *et al.*, 2013; Yue *et al.*, 2008).

Plx2 se řadí k AB toxinům, ale vzhledem k jeho aminokyselinové sekvenci vykazuje podobnost se skupinou Rho-ADP-ribosylačních exoenzymů skupiny C3, které se vyznačují schopností inaktivovat malé GTPasy rodiny Rho, čímž dojde k přerušení důležitých signalizačních drah v buňce. Tímto typem signalizace je podmíněna také syntéza a regulace aktinového cytoskeletu buňky a při jejím přerušení tedy dochází ke změnám v cytoskeletu buňky, potažmo také ke změně morfologie (Funfhaus *et al.*, 2013; Holbourn *et al.*, 2006).

Funfhaus (2013) poukazuje na problematiku izolace a exprese těchto cytotoxinů jak *in vivo* tak *in vitro*, a pro nedostatek experimentálních a strukturních analýz je tedy nutné brát porovnávání sekvencí s již identifikovanými homology spíše s rezervou. Co však experimentálně porovnat lze je rozdílný vliv geneticky modifikovaných kmenů *P. larvae* genotypu ERIC I, postrádajících schopnost syntetizovat Plx1 či Plx2, a kmenů nepozměněných (wild type) na mortalitu včelích larev. Utlumením genu, jenž nese informaci pro expresi Plx1 či Plx2, dojde po aplikaci mutantní bakterie do larvální výživy ke snížení mortality z 80 % (kontrolní skupina infikovaná kmenem wild type) na přibližně 40 %, přičemž je zřejmé že ztráta jednoho toxinu je částečně kompenzována toxinem druhým a lze tedy považovat tyto toxiny za důležité faktory virulence (Funfhaus *et al.*, 2013).

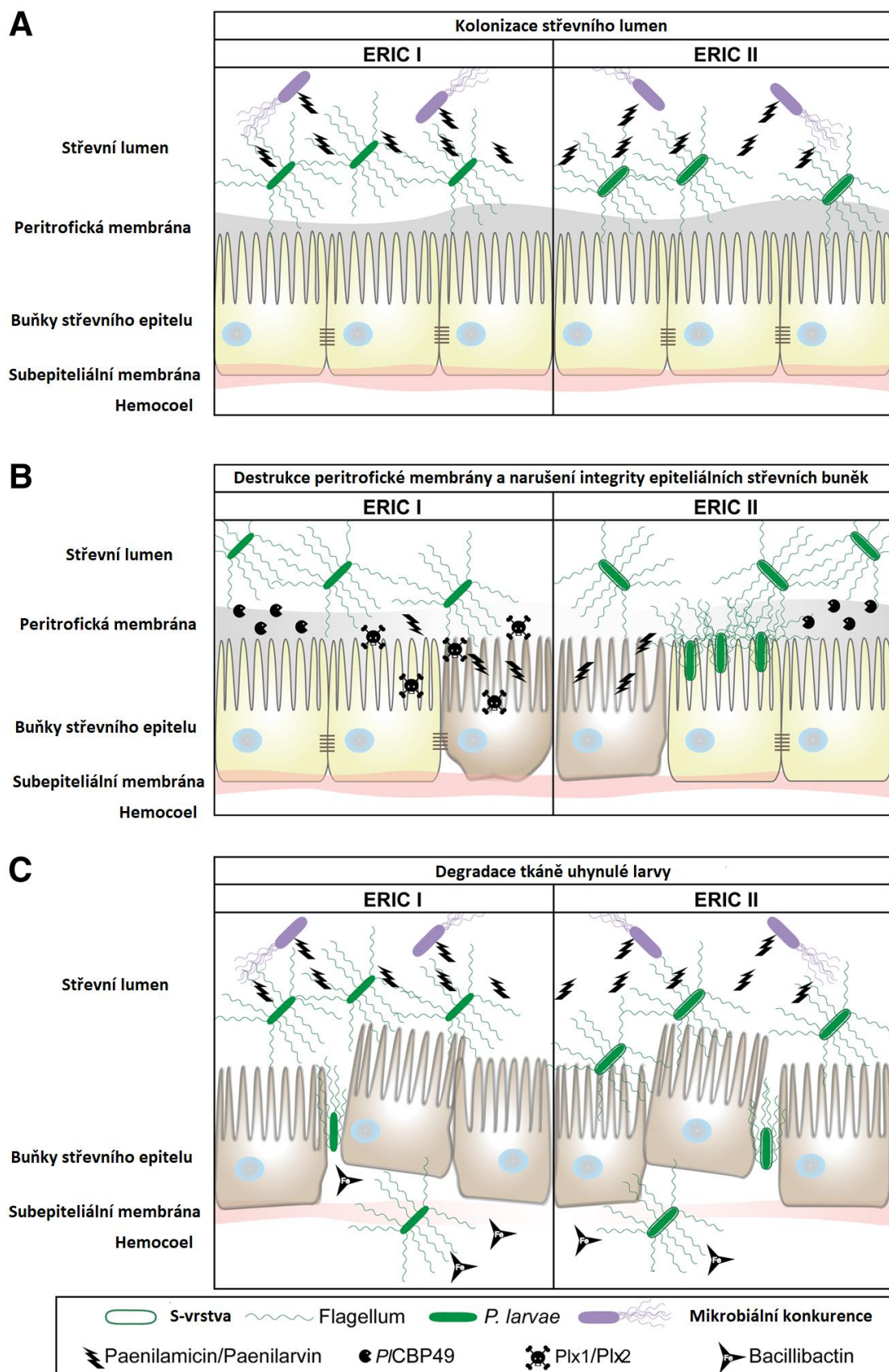
2.3.4.4 Chitin degradující enzym (*PICBP49*)

Garcia-Gonzales et al. (2013) poukazují na klíčovou roli chitin degradujícího enzymu v mechanismu patogeneze moru včelího plodu. Narušení integrity peritrofické membrány, jakožto jediné fyzické bariéry oddělující lumen trávicího traktu od střevních epiteliálních buněk, je kritickým faktorem infekce způsobené *P. larvae*. V genomu obou genotypů *P. larvae* byly nalezeny geny kódující proteiny schopné interagovat s chitinem a dále byla dokázána přítomnost několika fragmentů otevřených čtecích rámců kódujících několik chitinas, avšak ne zcela s kompletním funkčním nepřerušným genem (Djukic *et al.*, 2014). Histologickou analýzou larvální PM (u čtyřdenních infikovaných včelích larev), za využití fluorescenčního chitin detekujícího barviva Calcofluor White (CW), byla dokázána postupná degradace PM oběma genotypy *P. larvae* od stádia postupného rozrušování až po kompletní absenci PM a následné nabourání epiteliálních buněk (Garcia-Gonzalez a Genersch, 2013).

Komplexní studie zaměřená na identifikaci chitin degradujícího enzymu produkovaného *P. larvae* specifikovala enzym *PICBP49* ze skupiny nově objevených LPMO, přičemž gen kódující *PICBP49* byl nalezen u obou genotypů *P. larvae* a chitinasová aktivita enzymu byla dokázána zymograficky (za využití koloidního chitinu). Schopnost enzymu rozrušit PM byla dále testována pomocí testu permeability PM izolované z Blýskavky kukuřičné (*Spodoptera frugiperda*), kdy utlumení genu kódujícího *PICBP49* způsobilo u mutantních kmenů signifikantně sníženou schopnost PM permeabilizovat, na rozdíl od geneticky nemodifikovaného kmenu (wild type). Dále byla dokázána kritická role *PICBP49* ve virulenci obou genotypů *P. larvae*, jelikož u včelích larev infikovaných mutantními kmeny (s utlumeným genem) došlo k velmi výraznému snížení mortality těchto larev oproti kmenům bez modifikace (wild type) (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014b).

PICBP49, spadající do skupiny LPMO, je enzym tvořený 443 aminokyselinami obsahující modul CBM33 a také další domény vázající chitin. Mechanismus oxidativní degradace chitinu, respektive jednotek N-acetylglukosaminu propojených β -(1,4) glykosidickými vazbami, je závislý na přítomnosti Cu^{2+} v aktivním místě (Aachmann *et al.*, 2012). Dále se předpokládá, že sekrece *PICBP49* má nejen funkci důležitého virulenčního faktoru (viz Obr. 6), ale je zásadní také z hlediska nutričních možností *P. larvae*, jelikož je takto bakterie schopna chitin metabolicky využít (Garcia-Gonzalez a Genersch, 2013). Degradací chitinu dochází k uvolňování dalších strukturních

fragmentů PM a pro bakterii především nutričně využitelných proteinů a glykoproteinů (Wang a Granados, 2000).



Obr. 6 Obrazné znázornění synergie sekrečních proteinů jednotlivých genotypů *P. larvae* v příslušných fázích infekce: kolonizace střevního lumen (A), destrukce peritrofičké membrány (B) a degradace larvální tkáně (C). (převzato a upraveno dle Ebeling 2016)

2.4 Metody studia izolace, purifikace a identifikace proteinů a peptidů

2.4.1 Metody izolace proteinů

Metody izolace proteinů se odvíjí od typu materiálu, ze kterého se snažíme tyto proteiny izolovat. Izolaci proteinů intracelulárních obvykle předchází lýze buněk (pomocí ultrazvuku, technikou frenchpress, či teplotním šokem) a následná homogenizace, zatímco u proteinů extracelulárních, které byly zkoumaným organismem produkovány do prostředí, je jakékoliv porušení buněk nežádoucí z hlediska interference způsobené cytoplasmatickými proteiny. Pomocí detergentů je možné zvýšit rozpustnost proteinů v roztoku pufru, což je důležité například u proteinů membránových, či z jiného důvodu špatně rozpustných, ale je třeba vzít v potaz potenciální změnu vlastností, či denaturaci v závislosti na použitém činidlo (Lee, 2017). Vzhledem k zaměření této práce bude větší pozornost věnována metodám izolace proteinů z kultivačních médií.

Extracelulárně sekretované proteiny bakterií jsou v živném médiu v nízké koncentraci, a pro jejich následné využití je nutné docílit jejich precipitace. Obvyklé postupy fungují na principu zvýšení koncentrace solí v roztoku, které se rozpouštějí lépe než proteiny (například $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) a postupným zvyšováním této koncentrace lze dosáhnout precipitace různých proteinů na základě jejich rozpustnosti. Pokud není nutné získat protein v jeho funkční podobě lze použít metodu termickou, kdy se zahříváním protein denaturuje, mění svou strukturu a precipituje. Obecně se tedy snažíme upravit prostředí rozpouštědla tak, aby v něm došlo ke srážení proteinu.

2.4.1.1 Srážení pomocí acetonitrilu a kyseliny trifluoroctové

Chertov et al. (2004) popisují techniku srážení proteinů z krysího a lidského séra, která využívá roztoku acetonitrilu s 0,1% obsahem kyseliny trifluoroctové. Precipitační činidlo o teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$ se míchá se v vzorkem v poměru 2:1 (činidlo:vzorek). Autoři článku touto technikou docílili precipitace proteinů o vyšší molekulové hmotnosti (nad 50 kDa) jako například albuminu, přičemž peptidy o molekulové hmotnosti do 10 kDa v roztoku rozpuštěné byly podrobeny další analýze na hmotnostním spektrometru.

2.4.1.2 Srážení pomocí methanolu

Technika využívající ke srážení prostředí methanolu o teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$ byla využita k extrakci proteinů ze vzorků lidských buněk, tělních tekutin, tumorů a ze vzorků tkání

uchovávaných ve formaldehydu (Yuan *et al.*, 2012). Jedná se tedy o techniku s velkou variabilitou využití a je možné ji aplikovat také pro získání proteinů z kultivačních médií. Provedení spočívá ve smíchání vychlazeného na -80 °C tak, aby byla docílena finální koncentrace methanolu 80 % (v/v). Po oddělení precipitovaných proteinů je směs centrifugována.

2.4.1.3 Srážení acetonem a kyselinou trichloroctovou

Technika srážení acetonem spočívá ve smíchání acetonu o teplotě -20 °C se vzorkem v poměru 2:1 (aceton:vzorek). Po jednodenním uchování v mrazáku při -20 °C dojde k precipitaci proteinů (Tantipaiboonwong *et al.*, 2005).

Tuto techniku lze dále zdokonalit obohacením acetonu kyselinou trichloroctovou (TCA) o výsledné koncentraci 20 %. Po jednodenní inkubaci vzorku s acetonem s 20% TCA (v poměru 1:2) při -20 °C se vysrážený proteinový precipitát přečistí roztokem acetonu s 20 mM obsahem β -merkaptoethanolu a poté ještě čistým acetonem. Takto získaný přečištěný proteinový pelet se následně rozpustí v příslušném pufru a je podroben další analýze (Fic *et al.*, 2010; Tantipaiboonwong *et al.*, 2005).

2.4.2 Metody purifikace proteinů

Purifikační metody využívané v proteomicky zaměřených experimentech obvykle slouží k odstranění interferenčních vlivů přídatných nežádoucích látek, které jsou obvykle ve vysráženém vzorku proteinů přítomny jako cukry, soli a další látky které byly z roztoku nespecificky precipitovány. Někdy jsou předčišťovací kroky součástí precipitačního protokolu (Kojima *et al.*, 1999) a jindy je purifikace vzorku prováděna zvlášť v závislosti na požadované čistotě proteinu pro následné analýzy (Tantipaiboonwong *et al.*, 2005). Purifikační postupy mohou být také aplikovány za účelem izolace specifického proteinu z komplexní proteinové směsi (Harder *et al.*, 2001). K takovým technikám lze zařadit chromatografii gelovou (separující proteiny na základě jejich velikosti) či afinitní (separace na základě specifických interakcí s imobilizovanými ligandy). K takové separaci specifické frakce z proteinové směsi na základě jejich velikosti a pohyblivosti v elektrickém poli lze využít elektroforetické techniky. Po rozdělení proteinů na polyakrylamidovém gelu lze příslušný proteinový pás vyříznout, rozpustit, purifikovat separovaný protein a ten podrobit další analýze. K identifikaci příslušného proteinového pásu po elektroforetickém rozdělení lze použít metody imunodetekční za předpokladu, že je známa a vlastníme příslušnou protilátku k studovanému proteinu. V případě, že vlastníme protilátku specificky vázající námi studovaný protein, a pokud je produktem

této reakce komplex precipitující ve vhodných podmínkách, můžeme využít této imunoprecipitační techniky nejen k izolaci proteinu, ale také k jeho následné identifikaci a kvantifikaci (Lee, 2017).

V poslední době se rozšiřují purifikační techniky využívající aptamery, což jsou látky specificky vázající a interagující s proteiny obdobně jako protilátky. Aptamery mohou být nukleové kyseliny, anebo se jedná o látky proteinové a nukleoproteinové povahy. Oproti protilátkám jsou aptamery snadno syntetizovatelné *in vitro* podmínkách, jednoduše modifikovatelné, netoxické a stabilní. Citlivost a vazebná specifita aptamerů je stále studována mimo jiné za účelem jejich aplikace v medicíně jako účinných biosenzorů (Ozalp *et al.*, 2015).

2.4.3 Metody identifikace a kvantifikace proteinů

2.4.3.1 Elektromigrační metody

Metody elektromigrační využívají toho, že počet a zastoupení jednotlivých residuí v proteinu ovlivňuje jeho náboj v roztocích o různém pH. Izoelektrický bod (*pI*) je hodnota pH, při které vykazuje protein elektroneutrální vlastnosti a v elektrickém poli se tedy nepohybuje. Pokud necháme směs proteinů putovat gelem o určitém gradientu pH, pak se protein zastaví tehdy doputuje-li do oblasti pH, ve které je jeho náboj nulový. Technika využívající tyto proteinové vlastnosti k jejich separaci se nazývá izoelektrická fokusace. Na izoelektrickou fokusaci lze navázat dalším elektroforetickým dělením v se směru kolmém k prvotnímu dělení za základě *pI*. Druhé dělení probíhá na základě molekulové hmotnosti proteinů, přičemž vliv náboje je odstraněn přidávkem detergentních činidel unifikujících náboj, měnících strukturu a denaturujících studované proteiny. Získaný elektroferogram je vyhodnocen výpočetním programem a data slouží k bližšímu popisu proteinů v původní směsi (Cleveland *et al.*, 1977; Klose, 1975).

Jak již bylo zmíněno, dělení proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti je možné až po unifikaci jejich náboje pomocí detergentu. Nejběžnějšími detergentními činidly jsou soli kyseliny dodecylsulfonové obvykle lithné (LiDS) či sodné (SDS). SDS interaguje s proteiny, denaturuje a mění jejich tvar do válcovité podoby a díky negativnímu náboji detergentu udává každému proteinu shodný poměr náboje k hmotnosti, na základě čehož je poté možné separovat takto upravené proteiny pouze podle jejich hmotnosti. Sítem, kterým musí proteiny během separace projít je obvykle gel, který je nejčastěji složen z polymerizovaného akrylamidu. Polyakrylamid je látka, kterou je možné získat polymerizací monomerů akrylamidu a jednotlivá polymerní

vlákna jsou dále propojena N,N'-methylenbisakrylamidem (BIS). Výhody polyakrylamidového gelu spočívají především v jeho vodivosti, stabilitě, inertních vlastnostech a také v jednoduché modifikaci pórovitosti gelu na základě poměrů ve směsi monomeru akrylamidu a BIS. Laemmli (1970) postupy elektroforézy na polyakrylamidovém gelu za využití SDS (SDS-PAGE) zdokonalil a uvedl v praxi techniku diskontinuální elektroforézy, při které procházejí proteiny gely o různé pórovitosti a různém pH. Nejprve prochází, v pufru rozpuštěný, detergentem ošetřený protein gelem zaostřovacím, který je obvykle méně zesíťován a vykazuje pH o dvě jednotky nižší než gel dělicí. V zaostřovacím gelu je nejrychleji se pohybující složkou chloridový iont (složka Tris-HCl pufru), následuje proteinová frakce s unifikovaným nábojem a poslední složkou je glycin přítomný v elektrodovém pufru. V dělicím gelu se vlivem vyššího pH a nižší pórovitosti stává druhým nejpohyblivějším iontem glycin a proteinová frakce se začíná dělit na základě molekulové hmotnosti v prostředí gelu o nižší pórovitosti (vyšší míra zasíťování).

Po elektroforetickém dělení je nutné jednotlivé proteinové pásy vizualizovat. Vizualizační techniky spočívají v barvení proteinů barvivy, která se afinitně vážou na bílkoviny, kdy se nejběžněji využívá barvivo Coomasie Brilliant Blue (CBB). CBB existuje ve dvou modifikacích a to CBB-R250 a CBB-G250, jejichž použití se liší v různých barvicích technikách a protokolech. Jednotlivé barvicí roztoky využívající CBB se liší složením, použitím různých alkoholických rozpouštědel, kyselin či solí, které mají efekt na výsledné zbarvení (Dyballa a Metzger, 2009). Další metodou vizualizace, vykazující asi o jeden řád vyšší citlivost je detekce proteinů stříbrem. Detekce stříbrem vychází ze skutečnosti, že aminokyselinová residua jsou schopné redukovat stříbrné ionty v alkalickém prostředí a stříbro tak vytváří komplexy s karboxylovými skupinami residuí aspartátu a glutamátu, s thiolovými skupinami cysteinu, nebo s imidazolem. Gely jsou po elektroforéze umístěny do roztoků 0,005% thiosíranu sodného (senzitivizace), poté do roztoku 0,1% dusičnanu stříbrného a nakonec jsou proteinové pásy vizualizovány roztokem 0,0036% formaldehydu s 2 % Na₂CO₃ a vyvolání zbarvení je při vhodné intenzitě pásů zastaveno roztokem kyseliny ethylendiamintetraoctové o koncentraci 50 mmol/l (Schagger, 2006).

2.4.3.2 Stanovení celkových proteinů

Metody stanovení celkových proteinů v dnešní době spočívají především ve spektrálních technikách měřících absorbanci vzorků proteinů při různých vlnových délkách. Bez

použití jakéhokoliv barviva je možné využít spektrofotometrické stanovení ve vlnových délkách 275–280 nm, což je oblast s absorpčním maximem aminokyselinových chromoforů tyrosinu a tryptofanu, přičemž je však nutné tuto metodu brát s rezervou vzhledem k závislosti na aminokyselinovém složení proteinů, její nízké citlivosti a také k interferencím způsobeným nukleovými kyselinami. Dále je možné měřit absorpci ve vlnové délce odpovídající absorpčnímu maximu peptidové vazby, tedy 192 nm. Měří se absorbance v daleké ultrafialové (UV) oblasti při vlnové délce 205 nm za využití křemenných kyvet. Stanovení je ovlivněno koloidními opaleskujícími částicemi, složením pufru a dalšími interferencemi (Peterson, 1983). Bradford (1976) vyvinul techniku stanovení celkových proteinů za využití afinitního barviva CBB-G250, které se kvantitativně váže na proteiny v kyselém prostředí, přičemž vzniklý komplex protein-barvivo vykazuje absorpční maximum při vlnové délce 595 nm. Tato technika vykazuje velkou reprodukovatelnost, citlivost (přibližně 1 µg/ml–1,5 mg/ml) a není ovlivněna přítomností redukujících látek, ale zato není funkční, pokud je ve vzorku přítomný detergent (například SDS) a také je závislá na pH. Jednoduchou modifikací v protokolu lze zvýšit citlivost této metody až desetkrát, a to pouhým přidáním proměření absorbance v oblasti 450 nm, což je absorpční maximum volného barviva a podílem absorbancí vzorků při zmíněných vlnových délkách (A_{595}/A_{450}) získáme hodnoty, ze kterých lze následně sestavit kalibrační přímkou pro kvantifikaci celkových proteinů (Zor a Seliger, 1996).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Chemikálie

2-Log DNA Ladder (0,1–10,0 kb) (NEB, USA)

Aceton (Lach-Ner, Česká republika)

Agar (Carl Roth, Německo)

Akrylamid (Sigma-Aldrich, USA)

Al₂(SO₄)₃ (Lach-ner, Česká republika)

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

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

Dodecylsírán sodný (SDS) (Applichem, Německo)

GelRed (Biotium, Česká republika)

Glukosa (Sigma-Aldrich, USA)

Glycerol (Lach-Ner, Česká republika)

GoTag Green Master Mix, 2x (Promega, USA)

Hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich, Německo)

Hydroxid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Chlorid sodný (Carl Roth, Německo)

InstaGene Matrix (BioRad, USA)

Isopropanol 70% (Lach-Ner, Česká republika)

K₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, Německo)

Kvasničný extrakt (Carl Roth, Německo)

Kyselina ethylendiamintetraoctová (Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina fosforečná (85%) (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

Kyselina nalidixová (Sigma-Aldrich, Itálie)

Kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina trifluorocetová (Fluka, Švýcarsko)

Kyselina trichlorocetová (Lach-Ner, Česká republika)

LB médium (Sigma-Aldrich, Německo)

LE agarosa (Lonza, Česká republika)

Merkaptoethanol (Sigma-Aldrich, Japonsko)

Methanol (Lach-Ner, Česká republika)

Mueller Hinton broth (Carl Roth, Německo)

N,N'-methylenbisakrylamid (MP Biomedicals, USA)
n-Butanol (Sigma-Aldrich, Německo)
PCR voda (Sigma-Aldrich, USA)
Peroxid vodíku 30% (Lach-Ner, Česká republika)
Persíran amonný (Sigma-Aldrich, Německo)
Proteinové standardy na SDS-PAGE – Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Bio-Rad, USA)
Pyruvát sodný (Sigma-Adrich, Japonsko)
SeaKem LE Agarosa (Lonza, USA)
Sodná sůl rezazurinu (Sigma-Aldrich, USA)
TEMED (Sigma-Aldrich, Čína)
Tetracyklin-hydrochlorid (Fluka, Čína)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma-Aldrich, Německo)
Trypton (Carl Roth, Německo)
Uhličitan sodný (bezvodý) (Lach-Ner, Česká republika)
Voda pro molekulární biologii (Sigma-Aldrich, USA)

3.1.2 Biologický materiál

Bakteriální kmeny obou genotypů bakterie *Paenibacillus larvae* použité pro experimentální činnost byly poskytnuty vedoucím práce Mgr. Jiřím Danihlíkem, PhD.

3.1.3 Použité roztoky a média

3.1.3.1 Kultivační média a roztoky

- Fyziologický roztok: 1% glukosa a 0,9% NaCl
- Kyselina nalidixová (o hmotnostní koncentraci 1 mg·ml⁻¹) – 0,1 g kyseliny nalidixové byl rozpuštěn v 2 ml NaOH o koncentraci 1 mol/l a roztok byl následně doplněn do objemu 100 ml destilovanou vodou.
- MYPGP agar – 10 g Mueller-Hinton broth, 15 g kvasničný extrakt, 3 g K₂HPO₄, 1 g pyruvát sodný, 20 g agar (lze vynechat při použití jako kultivačního tekutého média), doplněno destilovanou vodou do 1 l, sterilizováno autoklávováním.
- J agar – 5 g trypton, 3 g K₂HPO₄, 15 g kvasničný extrakt, 20 g agar (lze vynechat při použití jako kultivačního tekutého média), doplněno destilovanou vodou do 1 l, sterilizováno autoklávováním.

- LB médium – 20 g práškového LB média bylo doplněno na objem 1 l destilovanou vodou, sterilizováno autoklávováním.

Do sterilizovaných roztoků médií bylo před jejich využitím napipetováno 20 ml 10% roztoku glukosy (sterilizované zvlášť autoklávováním) a 20 ml roztoku kyseliny nalidixové (o hmotnostní koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) a to i v případě médií s přídavkem agaru, využitých k nalévání Petriho misek, přičemž se tato aditiva mohou přidat k médiím až po jejich vychladnutí na teplotu přibližně $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (vzhledem k stabilitě kyseliny nalidixové).

3.1.4 Přístrojové vybavení

Analytické váhy (Denver Instrument, Německo)

Autokláv 2540 EKA (Tuttnauer, Německo)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Digitální pH metr MV-87 (Practitronic, Německo)

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

Elektromagnetická Míchačka Intelli Stirrer (BioSan, Lotyšsko)

Flowbox Bioban (Steril, Itálie)

Gel Doc EZ Imager systém (Bio-Rad, USA)

Chlazená centrifuga Rotanta 460R s úhlovým rotorem 5615 (Hettich, Německo)

Inkubátor Q-CELL (Verkon, Česká republika)

Mikrovlnná trouba Micro action MW-M750 (Tescoma, Česká republika)

Minicentrifuga MCF 2360 (Vitrum, Česká republika)

Multifunkční reader Synergy H1 (BioTek, USA)

PCR T100 termocykler (Bio-Rad, USA)

Spektrofotometr Lightwave II (Biochrom, VB)

Termostat CH-100 (BioSan, Lotyšsko)

Třepačka PSU-10i (BioSan, Lotyšsko)

Třepačka Vortex V-1 (BioSan, Lotyšsko)

Ultrazvuková lázeň K5 (Kraintek, Česká republika)

Vakuová odparka Concentrator plus (Eppendorf, Německo)

3.2 Metody

3.2.1 Přechovávání a kultivace bakterie *P. larvae*

Příslušné bakteriální kultury obou genotypů *P. larvae* byly přechovávány na Petriho miskách s MYPGP médiem. Po přenesení viditelných kolonií bakterie *P. larvae* na novou misku s médiem sterilní bakteriologickou kličkou, došlo po dvou až třech dnech k nárůstu viditelných kolonií. Takto přechovávané čerstvé kultury obou genotypů *P. larvae* byly následně použity ke kultivaci v tekutých médiích.

Viditelné kolonie příslušného genotypu *P. larvae* byly sterilní bakteriologickou kličkou přeneseny do fyziologického roztoku, tak aby výsledná optická hustota (optical density – OD) měřená při 600 nm vykazovala hodnotu 0,1 (tedy $OD_{600} = 0,1$). Následně byl takto naočkovaný fyziologický roztok rozpipetován do plastových zkumavek o objemu 50 ml obsahujících 30 ml živného média (MYPGP, J či LB médium). Objem inokula (bakteriální kultury rozsuspendované ve fyziologickém roztoku o příslušné optické hustotě) činil 300 μ l. Kultivace probíhala při 37 °C v inkubátoru případně na třepačce.

3.2.2 Stanovení růstové křivky

Růst obou genotypů *P. larvae* ERIC I a ERIC II v MYPGP a J médiu s úpravou a bez úpravy pH byl sledován měřením absorbance při 600 nm. Do jamek na mikrodestičce bylo napipetováno 150 μ l bakteriální kultury a absorbance byla kontinuálně měřena na multifunkčním readeru Synergy H1. Změna absorbance byla vynesena do grafu, který představoval růstové křivky jednotlivých genotypů *P. larvae* za určitých podmínek. Na počátku a na konci kultivace bylo měřeno pH pomocí digitálního pH metru MV-87 (Practitronic, Německo).

3.2.3 Kolorimetrické stanovení životnosti buněk

Vzorky bakteriálních kultur, u nichž byly stanoveny růstové křivky, byly následně podrobeny stanovení životnosti buněk přidávkem 10 μ l 0,3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ roztoku resazurinu. Následně byla mikrodestička inkubována po dobu 30 minut při 37 °C. Po uplynutí doby bylo vizuálně zhodnoceno zbarvení jamek. Změna barvy z modrofialové (resazurin) na růžový resorufin indikuje přítomnost živých buněk (Katawera *et al.*, 2014).

3.2.4 Izolace a purifikace proteinů z růstového média

Po kultivaci byly vzorky centrifugovány při $4\,000 \times g$ po dobu 30 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugaci byl supernatant injekčně odebrán a po 10ml alikvotech přefiltrován přes diskový mikrofiltr o pórovitosti $0,22\text{ }\mu\text{m}$ do nových plastových zkumavek.

3.2.4.1 Srážení methanolem

K alikvotům živného média s obsahem proteinů byl přidán methanol, jenž byl den před srážením vymražen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, v poměru 1:4 (vzorek:methanol) a směs byla uchována přes noc v mrazáku při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Alternativně lze použít methanol s obsahem β -merkaptoethanolu o celkové koncentraci 20 mmol/l . Druhý den po inkubaci při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly vzorky centrifugovány při $4\,000 \times g$ po dobu 40 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl po centrifugaci odstraněn a proteinový precipitát byl lyofilizován, případně rovnou rozpuštěn v $500\text{ }\mu\text{l}$ roztoku Tris-HCl o látkové koncentraci $0,2\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ o pH 8,3.

3.2.4.2 Srážení kyselinou trichloroctovou a acetonem

K alikvotům živného média s obsahem proteinů byl přidán 20% roztok kyseliny trichloroctové (TCA) v acetonu vymražený na teplotu $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a to v poměru 1:2 (vzorek:20% TCA v acetonu) a směs byla inkubována do druhého dne při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Druhý den byly vzorky centrifugovány při $10\,000 \times g$ po dobu 15 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugaci byl odlit supernatant a precipitát byl promyt nejprve acetonem vychlazeným na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ s obsahem $20\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ β -merkaptoethanolu a následně čistým acetonem vychlazeným na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Mezi jednotlivými přečišťovacími kroky byly vzorky centrifugovány podle parametrů uvedených výše. Supernatant byl po centrifugaci odstraněn a proteinový precipitát byl vakuově odpařen na vakuové odparce při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 15 minut, případně rovnou rozpuštěn v $500\text{ }\mu\text{l}$ $0,2\text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku Tris-HCl o pH 8,3.

3.2.4.3 Srážení kyselinou trifluoroctovou s acetonitrilem

K alikvotům živného média s obsahem proteinů byl přidán 0,1% roztok kyseliny trifluoroctové v acetonu o teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a to v poměru 1:2. Směs byla promíchána na třepačce a centrifugována při $4\,000 \times g$ po dobu 10 minut při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a precipitát byl uchován pro další použití.

3.2.5 Stanovení celkových proteinů

Stanovení obsahu celkových proteinů ve vzorcích bylo provedeno dle M. M. Bradforda (1976). Stanovení bylo provedeno v mikrodestičkách, kdy se do jednotlivých jamek napipetovalo $45\text{ }\mu\text{l}$ destilované vody, $5\text{ }\mu\text{l}$ vzorku a následně také

200 µl pracovního roztoku Bradfordova činidla. Toto činidlo bylo získáno naředěním zásobního roztoku (v poměru 1:4) skládajícího se z 50 mg CBB-G250, 25 ml methanolu a 50 ml 85% H₃PO₄ a následně doplněného do objemu 100 ml destilovanou vodou. Před stanovením celkových proteinů ve vlastních vzorcích byla připravena kalibrační řada hovězího sérového albuminu o koncentracích 0,1–1 mg·ml⁻¹. Po přidání všech komponent do jamky v daném pořadí je nutné vyčkat alespoň 5 minut, během kterých se barvivo váže na proteiny a maximálně je takto možné vzorek změřit po 30 minutách. Vzorky byly proměřeny při 595 nm a současně také při 450 nm pro dosažení výsledné linearizované kalibrační přímky (Zor a Seliger, 1996).

3.2.6 Elektroforetické dělení proteinů na polyakrylamidovém gelu

Vzorky proteinů rozpuštěné ve vzorkovacím pufru, či v roztoku 0,2 mol·l⁻¹ Tris-HCl o pH 8,3 byly separovány na polyakrylamidovém gelu za účelem vizualizace proteinů zastoupených ve vzorku a k určení jejich přibližné molekulové hmotnosti.

3.2.6.1 Příprava ústočných roztoků a gelů

- Akrylamid/N,N'-metylenbisakrylamid (AA/BIS) (30% T, 2,67% C) – 73 g akrylamidu a 2 g N,N'-metylenbisakrylamidu bylo doplněno na celkový objem 250 ml destilovanou vodou, promícháno na elektromagnetické míchače a následně umístěno do ultrazvukové lázně k dokonalému rozpuštění všech složek.
- Tris-HCl (1,5 mol·l⁻¹; pH 8,8) – k 27,23 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu (dále Tris) bylo přidáno 80 ml destilované vody a pomocí HCl (o látkové koncentraci 3 mol·l⁻¹) bylo upraveno pH na hodnotu 8,8 a následně byl roztok doplněn destilovanou vodou na objem 150 ml. Obdobným způsobem byly připraveny roztoky Tris-HCl o hmotnostních koncentracích 0,5 a 0,2 mol·l⁻¹ o pH 6,8 a 8,3.
- 10× Elektrodotový pufr o pH 8,3 – 30,3 g Tris a 144,1 g glycinu bylo doplněno destilovanou vodou do objemu 1 l.
- Roztok 12% dělicího gelu – 3,4 ml deionizované vody, 4 ml roztoku AA/BIS (30% T, 2,67% C); 2,5 ml roztoku 1,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 8,8; 100 µl 10% roztoku dodecylsírany sodného (SDS), 5 µ tetramethylethyldiaminu (TEMED) bylo smícháno a polymerizace byla zahájena přidávkem 50 µl 10% roztoku persíranu amonného (APS). Tento objem roztoku 12% dělicího gelu vystačil na naplnění jednoho elektroforetického skla o tloušťce 1,5 mm.

- Roztok 4% zaostřovacího gelu – 6,1 ml deionizované vody; 1,3 ml roztoku AA/BIS (30% T, 2,67% C); 2,5 ml roztoku 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 6,8, 100 µl 10% SDS, 5 µl TEMED bylo smícháno a polymerizace byla zahájena přidavkem 50 µl 10% roztoku APS. Tento objem roztoku 4% zaostřovacího gelu stačil k doplnění horní části (přibližně 2 cm) elektroforetického skla o tloušťce 1,5 mm předem naplněného 12% dělicím gelem.
- Příprava vzorkovacího (redukujícího pufru) – tento pufr byl připraven smísením 5,5 ml deionizované vody; 1,25 ml roztoku 0,5 mol·l⁻¹ Tris-HCl pH 6,8, 3 ml glycerolu a 0,2 ml 0,5% (w/v) roztoku bromfenolové modři. Redukující pufr byl rozdělen na alikvoty po 200 µl a před jeho použitím bylo k takovému alikvotu přidáno 20 µl β-merkptoethanolu. Alternativně byl také použit komerční vzorkovací pufr 2× Laemmli Sample Buffer (Bio Rad kat. číslo 161-0737).

3.2.6.2 Elektroforéza na polyakrylamidovém gelu

Vzorky proteinů rozpuštěné v roztoku 0,2 mol·l⁻¹ Tris-HCl o pH 8,3, případně ve vzorkovacím pufru, byly smíseny se vzorkovacím pufrům v poměru 3:1 (vzorek:pufr) a tato směs byla zhomogenizována na třepačce a následně zahřáta na teplotu 95 °C po dobu 10 minut. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány po dobu 30 sekund při 4 000 × g a ihned nanášeny na gel. Do jamek 1,5 mm gelu o 10 jamkách bylo nanášeno 10–30 µl vzorku a 3 µl proteinového standardu (Biorad – Precision Plus Protein™ Dual Color Standard). Pro průchod vzorků zaostřovacím gelem bylo použito konstantního napětí 100 V, a jakmile vzorky doputovaly do dělicího gelu bylo napětí zvýšeno na 150 V. Elektroforetická separace byla ukončena právě tehdy, když bylo dosaženo difúze modré barvy (bromfenolová modř) ze spodní části dělicího gelu do elektrodového pufru. Gely byly po ukončené elektroforetické separaci vyjmuty ze skel, byla označena jejich orientace oddělením levého dolního rohu gelu a následně byly gely fixovány roztokem obsahujícím 50 % methanolu a 10 % kyseliny octové po dobu alespoň 15 minut. Poté byly gely promyty deionizovanou vodou celem třikrát po dobu 15 minut, přičemž byla deionizovaná voda mezi promýváním vždy obměněna.

3.2.6.3 Detekce proteinů na gelech po elektroforetické separaci

3.2.6.3.1 Roztoky použité pro detekci

- Fixační roztok – 50 % methanol, 10 % CH₃COOH

- Barvicí roztok kolidní Coomasie brilliant blue (CBB) G-250 – 100 g $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ bylo rozpuštěno v minimálním objemu destilované vody, následně bylo přidáno 200 ml 96% ethanolu (v/v) a 0,4 g CBB G-250 a po dokonalém rozpuštění všech komponent bylo k roztoku přidáno 47 ml 85% H_3PO_4 (w/w). Po dokonalém promíchání dojde v roztoku k vytvoření koloidních částic a následně byl roztok doplněn destilovanou vodou do objemu 2 l.
- Odbarvovací roztok A: 200 ml ethanolu (w = 96 %) a 47 ml H_3PO_4 (w = 85 %) bylo smíšeno a doplněno destilovanou vodou do objemu 2 l.
- Barvicí roztok CBB R-250 – 2 g CBB R-250, 900 ml methanolu a 300 ml kyseliny octové byly smíšeny a doplněny destilovanou vodou do celkového objemu 2 l.
- Odbarvovací roztok B: 200 ml kyseliny octové a 800 ml methanolu bylo smíšeno a doplněno destilovanou vodou do objemu 2 l.

Roztoky použité pro barvení stříbrem:

- Fixační roztok: 100 ml methanolu, 24 ml kyseliny octové a 100 μl formaldehydu bylo smíšeno a doplněno destilovanou vodou do objemu 200 ml.
- Senzitizační roztok: 20 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ bylo rozpuštěno destilovanou vodou a doplněno do objemu 100 ml.
- Barvicí roztok: 200 mg AgNO_3 a 75 μl formaldehydu bylo smíšeno a doplněno destilovanou vodou do objemu 100 ml.
- Vyvíjecí roztok: 6 g Na_2CO_3 ; 2,5 ml senzitizačního roztoku a 50 μl formaldehydu bylo smíšeno a doplněno destilovanou vodou do objemu 100 ml.
- Roztok zastavující vyvíjení: 24 ml kyseliny octové a 100 ml methanolu bylo smíšeno a doplněno destilovanou vodou do objemu 200 ml. Alternativně lze k zastavení vývoje zbravení použít roztok EDTA o koncentraci $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

3.2.6.3.2 Barvení Coomassie Brilliant Blue

Gely byly barveny dvěma technikami využívající na proteiny se vážající barvivo Coomassie Brilliant Blue. Po elektroforetické separaci byly gely vyjmuty z aparatury a po označení jejich orientace byly ihned umístěny do fixačního roztoku po dobu 15-30 minut a následně byly gely promyty deionizovanou vodou celkem třikrát po dobu 15 minut. Gely byly umístěny do barvicího roztoku CBB-R250 po dobu 30–60 minut v závislosti na požadované intenzitě pásů a po inkubaci v barvicím roztoku byly gely přemístěny do odbarvovacího roztoku B, dokud nebyla vymyta barva pozadí gelu o požadovaném kontrastu v porovnání s vizualizovanými pásy. Barvení roztokem koloidní

CBB-G250 probíhalo obdobně jako barvení pomocí CBB-R250 s tím rozdílem, že byly gely umístěny do barvicího roztoku přes noc a druhý den byly odbarvovány odbarvovacím roztokem A. V případě nedostatečného odbarvení pozadí gelu byla prodloužena doba inkubace v odbarvovacím roztoku, a dále byla zvýšena frekvence obměny roztoku za čistý odbarvovací roztok A. Dokumentace gelů byla provedena pomocí skenovacího přístroje Gel Doc EZ Imager a získané elektroferogramy byly dále vyhodnoceny v programu Image Lab.

3.2.6.3.3 Detekce stříbrem

Gely byly po separaci fixovány a promyty obdobně jako u předchozích barvicích technik. Takto připravené gely byly následně umístěny do senzitivačního roztoku po dobu 5 minut. Po krátkém promytí v deionizované vodě byly gely přemístěny do barvicího roztoku po dobu 20 minut za stálého míchání ve tmě. Dále následovalo promytí v destilované vodě a umístění gelů do vyvíjecího roztoku do té doby, než bylo docíleno požadované intenzity obarvených proteinových pásů, což trvalo přibližně 1–2 minuty. Zastavení zbarvení bylo provedeno umístěním gelů do roztoku zastavujícího vyvíjení. Vizualizované pásy proteinů byly skenovány a vyhodnocovány obdobně jako u předešlých barvicích technik.

3.2.7 Identifikace bakterie *Paenibacillus larvae* polymerázovou řetězovou reakcí

K identifikaci *P. larvae* byla použita polymerázová řetězová reakce, pomocí níž byla amplifikována specifická oblast v genomu této bakterie. Celkový postup této konkrétní identifikace a sekvence oligonukleotidů použitých pro ohraničení výsledného amplikonu byl převzat od Dobbelaere (2001).

3.2.7.1 Roztoky využité při polymerázové řetězové reakci

- 50× TAE pufr – 121 g Tris-HCl; 28,55 ml ledová kyselina octová; 7,306 g EDTA; doplněno destilovanou vodou do 500 ml a sterilizováno autoklávováním.
- 0,8% (w/v) agarosový gel – 0,8 g agarosa; 100 ml TAE pufr, 3 µl barvivo GelRed

3.2.7.2 Izolace DNA z bakterie *Paenibacillus larvae*

Bakteriální kolonie jednodenních čerstvých kultur na miskách byly bakteriologickou kličkou přeneseny do 100 µl sterilní deionizované vody. Následně byly vzorky zahřáty na 100 °C za neustálého promíchávání po dobu 10 minut. Po uplynutí doby inkubace byla směs centrifugována po dobu 2 minut při 11 000 × g. Po centrifugaci byl odebrán supernatant, který byl následně přenesen do čisté sterilní mikrozkuhavky.

3.2.7.3 Spektrofotometrické stanovení koncentrace DNA

Ke spektrofotometrickému stanovení koncentrace DNA ve vzorcích izolátů byla použita destička Take-3 a multifunkční reader Synergy H1. Na destičku byl nejprve v duplikátu nanesen slepý vzorek (blank) v objemu 2 μl , který obsahoval pouze sterilní deionizovanou vodu. Vzorky byly následně také naneseny vždy v duplikátu ve stejném objemu jako blank. Byla měřena absorbance vzorku při vlnových délkách 260 nm a 280 nm a poměrem A_{260}/A_{280} byla stanovena čistota DNA, a dále software určil koncentraci DNA ve vzorku.

3.2.7.4 Příprava PCR směsi

Komponenty pro PCR směs byly smíchány (viz Tab. 4) a v objemu 12,5 μl dávkovány do mikrozkušavek v pásu (strip). Vzorky DNA byly zředěny PCR vodou tak, aby se výsledná koncentrace DNA pohybovala v okolí 100 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Jako negativní kontrola byla použita PCR voda v objemu přidávané DNA, tedy 1 μl a pozitivní kontrola byla získána vyizolováním DNA z referenčních kmenů *P. larvae* genotypů ERIC I a ERIC II. Sekvence použitých nukleotidů je specifikována v Tab. 3.

Tab. 3 Sekvence oligonukleotidů využívaných k identifikaci *P. larvae* (de Graaf et al., 2006)

Název	Sekvence	Velikost výsledného amplikonu (bp)
AFB-FW	5'-CTTGTGTTTCTTTCGGGAGACGCCA-3'	1106
AFB-RW	5'-TCTTAGAGTGCCACCTCTGCG-3'	

Tab. 4 Složení reakční směsi pro PCR identifikaci *P. larvae*

Složka	Objem na jednu reakci (μl)
PCR voda	4,25
Primer AFB-FW	0,50
Primer AFB-RW	0,50
GoTaq polymerase premix	6,25
DNA (100 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	1,00

3.2.7.5 Podmínky PCR reakce

Směs obsahující všechny příslušné složky PCR reakce se promíchala na třepače a následně zcentrifugovala po dobu 30 sekund při $4\,000 \times g$. Strip byl následně umístěn do termocykléru a po nastavení programu (Tab. 5) pro identifikaci *P. larvae* byl proces spuštěn (de Graaf et al., 2013).

3.2.7.6 Provedení a detekce PCR produktů agarosovou elektroforézou

Nejprve byl připraven agarosový gel podle instrukcí (kapitola 3.2.7.1) a po zahřátí v mikrovlnné troubě byl nalit do elektroforetické vany a do gelu byl ponořen hřebínek. Po ztuhnutí gelu byla vana přenesena do elektroforetické komory a po vyndání hřebínku byl prostor vyplněn 1× TAE pufrém. Do jamek umístěných dále od anody byl aplikován celý objem PCR produktů (přibližně 11 µl) a také marker (3 µl) o rozsahu 0,1–10,0 kb. Elektroforetické dělení probíhalo za konstantního napětí 80 V po dobu přibližně 45 minut. Po elektroforetické separaci byl gel vyjmut z aparatury, přenesen na tmavou podložní desku určenou k UV detekci a pásy byly vizualizovány a vyhodnoceny pomocí přístroje Gel Doc EZ Imager.

Tab. 5 Jednotlivé korky, časy a teploty procesu PCR identifikace *P. larvae*

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)
První denaturace	95	2
Denaturace	93	1
Hybridizace	55	0,5
Elongace	72	1
Poslední cyklus	72	5
Ochlazení	4	do ukončení programu

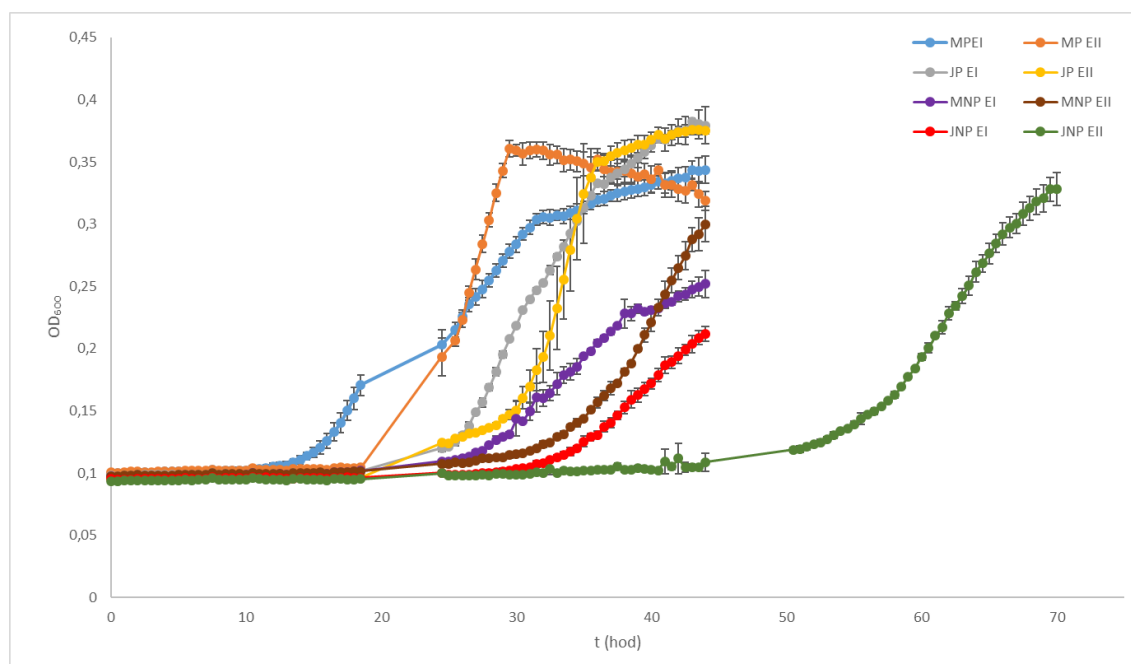
4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace parametrů kultivace bakterie *Paenibacillus larvae* se zaměřením na sekreční proteiny a peptidy

Pro kultivaci byla vybrána média MYPGP a J, která se pro studium a kultivaci bakterie *P. larvae* standardně používají (de Graaf *et al.*, 2013). Byly sledovány čtyři parametry, kterými je možné charakterizovat růst mikroorganismu v médiu a to: růstová křivka v médiích, obsah celkových proteinů v médiu a změna pH během kultivace a dále byla stanovena životnost buněk v narostlých kulturách.

4.1.1 Stanovení růstových křivek bakterie *P. larvae*

Růstové křivky byly stanoveny pro oba genotypy *P. larvae* ERIC I a ERIC II v médiu MYPGP a J. Byl porovnán vliv pH média na růst bakterií, a především tedy doba, během které dosáhne růst stacionární fáze. Experiment byl realizován v čistých médiích a poté v médiích ve kterých bylo pH upraveno (pomocí KOH) na hodnotu 7,3. Optimální podmínky růstu bakterie jsou takové, ve kterých dojde k přechodu z lag fáze do logaritmické fáze nejdříve a následně dochází k ustálení růstu ve stacionární fázi.



Obr. 7 Růstové křivky bakterie *P. larve* genotypu ERIC I (EI) a ERIC II (EII) v MYPGP médiu (M) a v J médiu (J) s upraveným pH (P) a neupraveným pH (NP).

Na Obr. 7 je zobrazen graf růstových křivek, ze kterých vyplývá, že nejrychlejšího nástupu logaritmické fáze růstu dosáhla bakterie *P. larvae* genotypu ERIC I kultivovaná v MYPGP médiu s upraveným pH, a to již po 15 hodinách kultivace, přičemž přechod do stacionární fáze nastal po 31 hodinách od kultivace. Obdobný závěr lze vyvodit také

v případě genotypu ERIC II (v MYPGP médiu s upraveným pH), jehož počátek logaritmické fáze nebyl zachycen vlivem prodlevy v měření, ale přibližná doba se pohybuje mezi 20-25 hodinou od kultivace a doba přechodu do stacionární fáze byla přibližně po 29 hodinách od kultivace.

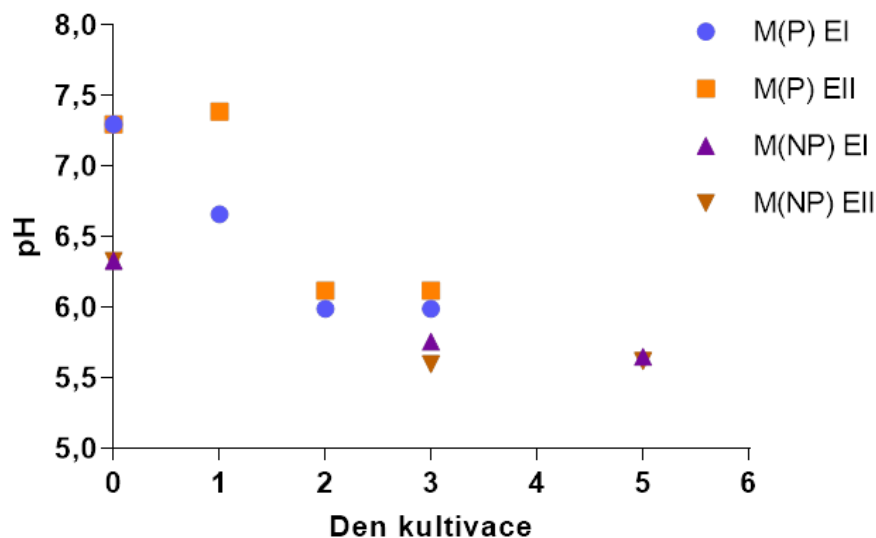
V poslední stacionární fázi dochází ke zvyšování koncentrace metabolitů v růstovém médiu a vlivem kumulace toxických metabolitů dochází k buněčné smrti a lýzi bakteriální kultury (Hahn-Hagerdal *et al.*, 2005). Překročením doby kultivace by tedy výsledek mohl být zkreslen o intracelulární proteiny, které by se při lýzy buněk dostávaly do média.

V případě kultivace v J médiu s upraveným pH byla situace obdobná, jelikož jako první dosáhl přechodu do logaritmického růstu genotyp ERIC I (přibližně 25 hodin od počátku kultivace) a vzápětí následoval genotyp ERIC II (přibližně 30 hodin od počátku kultivace) a stacionární fáze bylo u obou genotypů dosaženo přibližně po 40 hodinách od kultivace. Během kultivace v MYPGP a J médiu bez úpravy pH byl růst opožděn, a to nejvíce v případě genotypu ERIC II, jenž byl kultivován v J médiu s přechodem k logaritmické fázi po 55 hodinách od kultivace a ke stacionární fázi až po 70 hodinách od kultivace.

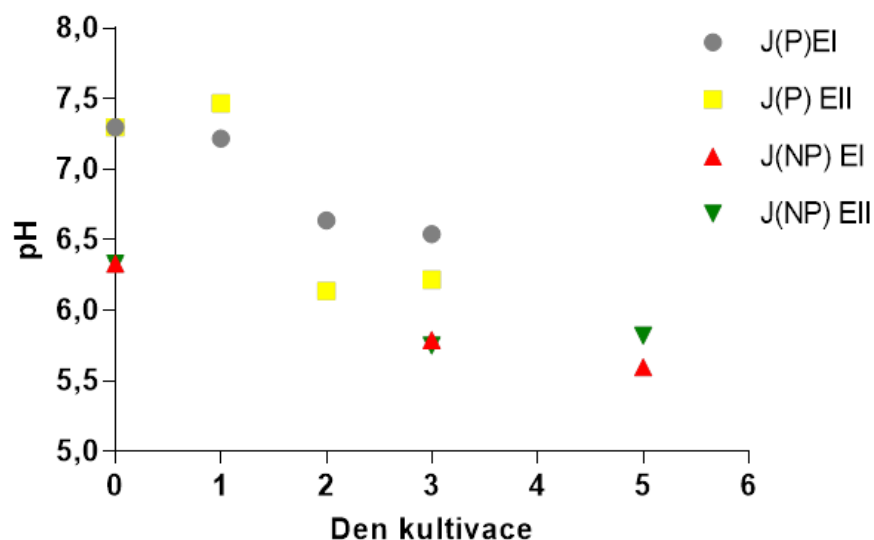
Z naměřených dat tedy vyplývá, že optimálních podmínek růstu pro oba studované genotypy bakterie *P. larvae* je dosaženo v MYPGP médiu s upraveným pH a tato skutečnost souhlasí s poznatky dosaženými v jiných pracích (Hrabák, 2007).

4.1.2 Změna pH v médiích během kultivace

Jelikož je pH důležitým růstovým a stresovým faktorem, byla hodnota pH médií měřena v průběhu kultivace. Média bez úpravy pH vykazovala hodnotu pH v okolí 6,3 a u jedné sady médií bylo pH navýšeno pomocí KOH na hodnotu 7,3. Vzhledem k tomu, že nebylo instrumentálně možné pH kontinuálně měřit, byla jeho hodnota změřena vždy na počátku experimentu, poté po přechodu do logaritmické fáze růstu, a nakonec během stacionární fáze růstu (případně až po pěti dnech od kultivace). Velká změna pH kopíruje růstové křivky a dokládá průběh logaritmické fáze růst bakterie za daných podmínek.



Obr. 8 Změna pH v průběhu kultivace bakterie *P. larvae* genotyp ERIC I (EI) a ERIC II (EII) v MYPGP médiu (M) s upraveným pH (P) a neupraveným pH (NP).



Obr. 9 Změna pH v průběhu kultivace bakterie *P. larvae* genotyp ERIC I (EI) a ERIC II (EII) v J médiu (J) s upraveným pH (P) a neupraveným pH (NP).

Na Obr. 8 a 9 je bodový graf průběhu změny pH během kultivace obou genotypů *P. larvae* v médiích MYPGP (Obr. 8) a J (Obr. 9) s upraveným pH a s pH bez úpravy. Průběh změny pH je nejzřetelnější u genotypu ERIC I kultivovaném v MYPGP médiu s upraveným pH (znak modrého kolečka), kdy je původní hodnota pH 7,3 po jednodenní kultivaci snížena na pH 6,6 a následně po dosažení druhého dne kultivace se pH ustálilo na hodnotě 6. Tento výsledek souhlasí s růstovou křivkou (Obr. 7), jelikož prudká změna pH odpovídá průběhu logaritmické fáze a ustálení pH odpovídá době stacionární fáze, ve které se již signifikantní změna pH neočekává. Obdobný trend je možné pozorovat u

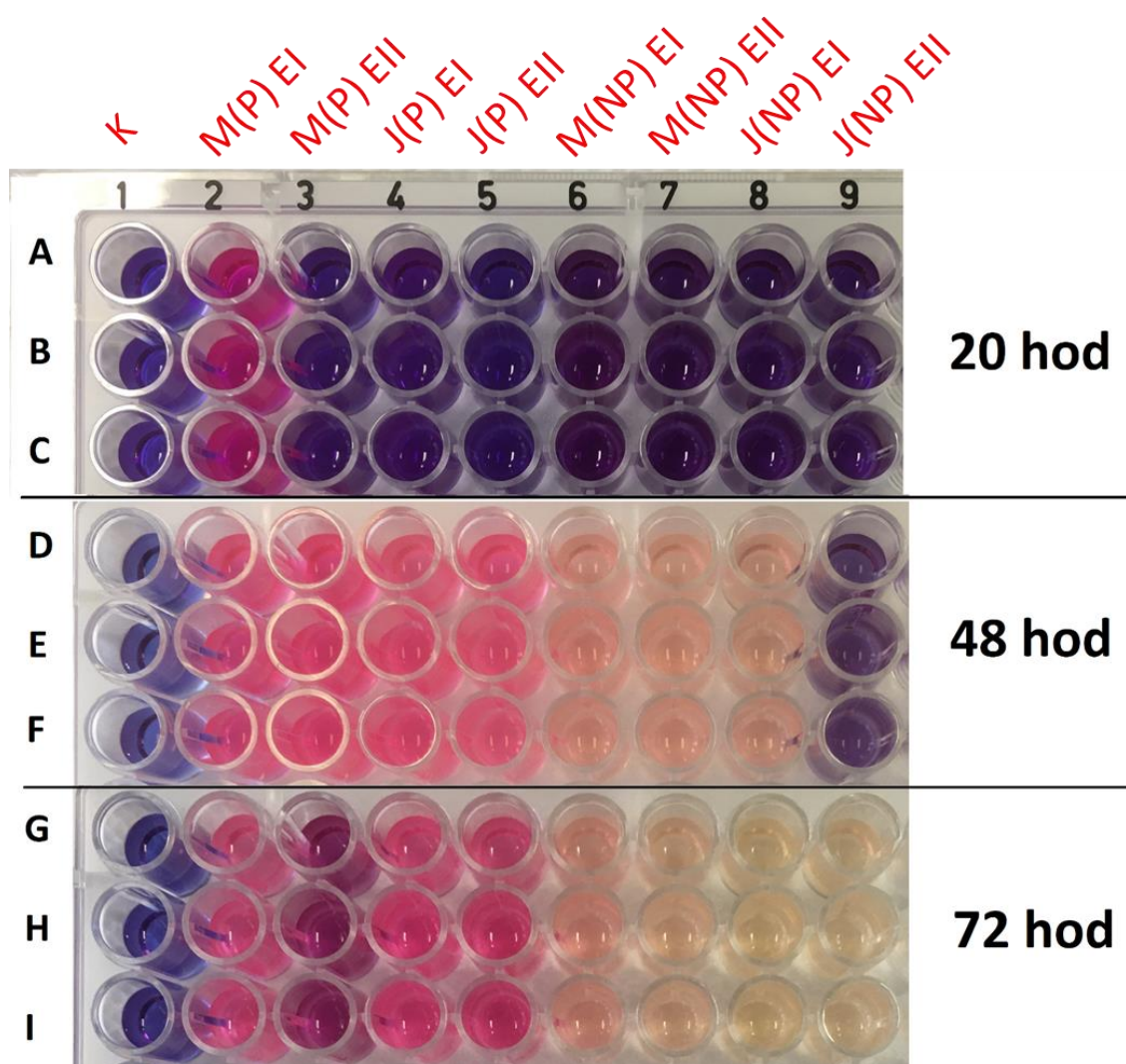
genotypu ERIC I kultivovaného v J médiu s upraveným pH, nicméně v tomto případě nebyla zachycena prudká změna pH. V případě genotypu ERIC II byla v obou případech (v MYPGP a J s upraveným pH) pozorována po jednodenní kultivaci mírná změna pH do bazické oblasti (7,4) od původního pH, ale ve druhém dni kultivace již pH dosahovalo stabilní hodnoty v okolí pH 6,1. Co se týče situace změny pH v médiích bez úpravy pH došlo mezi dobou na začátku kultivace a tři dny od započetí kultivace ke změně pH z hodnoty 6,3 na hodnotu přibližně 5,6. Nejedná se tedy o tak signifikantní rozdíl jako je tomu v případě médií s upraveným pH.

Z hlediska optimálního pH pro růst se *P. larvae* řadí mezi neutrofilní bakterie (Bulla *et al.*, 1970). Tato skutečnost byla potvrzena, jelikož v médiích s upraveným pH, blíže oblasti neutrálního pH, byl prokázán rychlejší růst obou genotypů *P. larvae* viz růstové křivky (kapitola 4.1.1, Obr. 7) a pH bylo po dosažení stacionární fáze růstu ustáleno na hodnotě kolem pH 6. Podle poznatků dle Hrabák (2007) je zřejmé, že *P. larvae* není schopen růstu při pH nižším než 6 a v takto kyselém prostředí dochází k lýzy buněk. Nízké pH působí jako stresový faktor, který může iniciovat přechod aktivních buněk do stadia spor (Hasemann, 1961; Bulla *et al.*, 1970), působit jejich lýzy (Dingman a Stahly, 1983), anebo indukovat temperovaného fága (Hrabák, 2007). V této práci nebyla přítomnost temperovaného fága studována. Podle grafu (Obr. 8 a 9) lze vidět, že *P. larvae* je schopen růst i v kyselém pH, které ve třetím dni kultivace dosahuje hodnoty 5,6 a bakteriální buňky za těchto podmínek stále vykazují životaschopnost (viz kapitola 4.1.3).

4.1.3 Kolorimetrické stanovení životnosti buněk *P. larvae* v průběhu kultivace

Měření optické hustoty (při 600 nm) bakteriální kultury neumožňuje stanovit úbytek živých buněk. Buňky mohou v nepříznivých podmínkách (snižování pH, kumulace toxinů) lyzovat, sporulovat, anebo může dojít k jejich buněčné smrti, avšak pouze stanovením optické density (případně měřením absorbance při 600 nm) nejsme schopni tyto stavy, a především poměr živých ku mrtvým buňkám zachytit. Životnost buněk byla v této práci verifikována kolorimetrickým stanovením pomocí resazurinu (Katawera *et al.*, 2014). Během kultivace byly odebírány vzorky pro stanovení životnosti, a to v časech 20, 48 a 72 hodin od počátku kultivace. Pokud byly ve vzorku přítomny živé buňky, došlo k přeměně modrého resazurinu na růžový resorufin. V jamkách (viz Obr. 10) s označením 2 je dostatečné množství životaschopných buněk již po 20 hodinách kultivace, což koreluje s růstovou křivkou odpovídající genotypu ERIC I kultivovaném v MYPGP

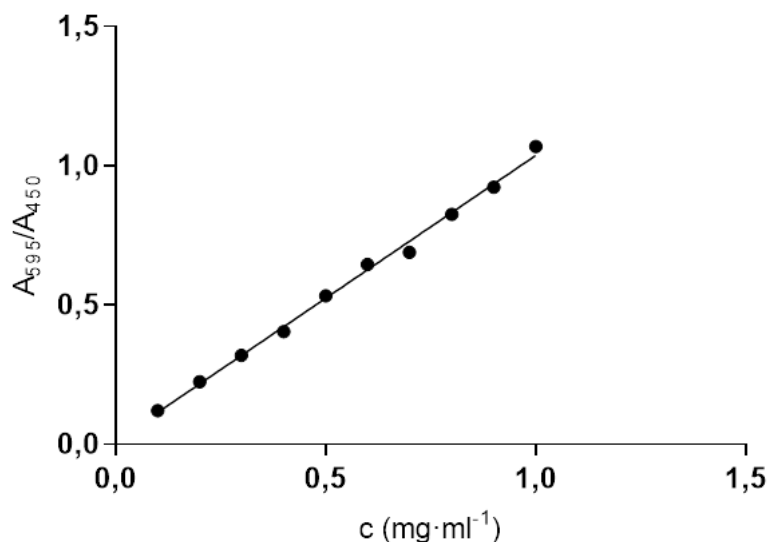
médiu s upraveným pH, u něhož došlo po 20 hodinách k přechodu do logaritmické fáze. Po 48 hodinách kultivace je zřetelná změna zbarvení u všech jamek mimo sloupec 9 (Obr. 10), která odpovídá genotypu ERIC II kultivovanému v J médiu bez úpravy pH, u něhož byla logaritmická fáze dosažena až přibližně po 55 hodinách od počátku kultivace, a proto nebyla koncentrace živých buněk dostatečná pro přeměnu barviva za stanovený inkubační čas 30 minut. Rozdílná intenzita zbarvení (od růžové po světle béžovou) může být způsobena rozdílným pH, jelikož resazurin je pH indikátor, anebo také rozdílnou hodnotou KTJ (kolonii tvořící jednotka) v testovaných médiích během kultivace. Stanovením životnosti buněk pomocí resazurinu nezjistíme poměr živých a mrtvých buněk, a také není definována minimální koncentrace živých buněk, jež stačí pro změnu barvy za určitou dobu kultivace.



Obr. 10 Kolorimetrické stanovení životnosti v čase kultivace (20,48 a 72 hodin) *P. larvae* genotyp ERIC I (EI) a ERIC II (EII) v MYPGP (M) a J médiu (J) s úpravou pH (P) a bez úpravy pH (NP). Kontrola čistého média A1-I1, M(P) EI A2-I2, M(P) EII A3-I3, J(P) EI A4-I4, J(P) EII A5-I5, M(NP) EI A6-I6, M(NP) EII A7-I7, J(NP) EI A8-I8, J(NP) EII A9-I9.

4.2 Sestrojení kalibrační přímky pro stanovení koncentrace celkových proteinů

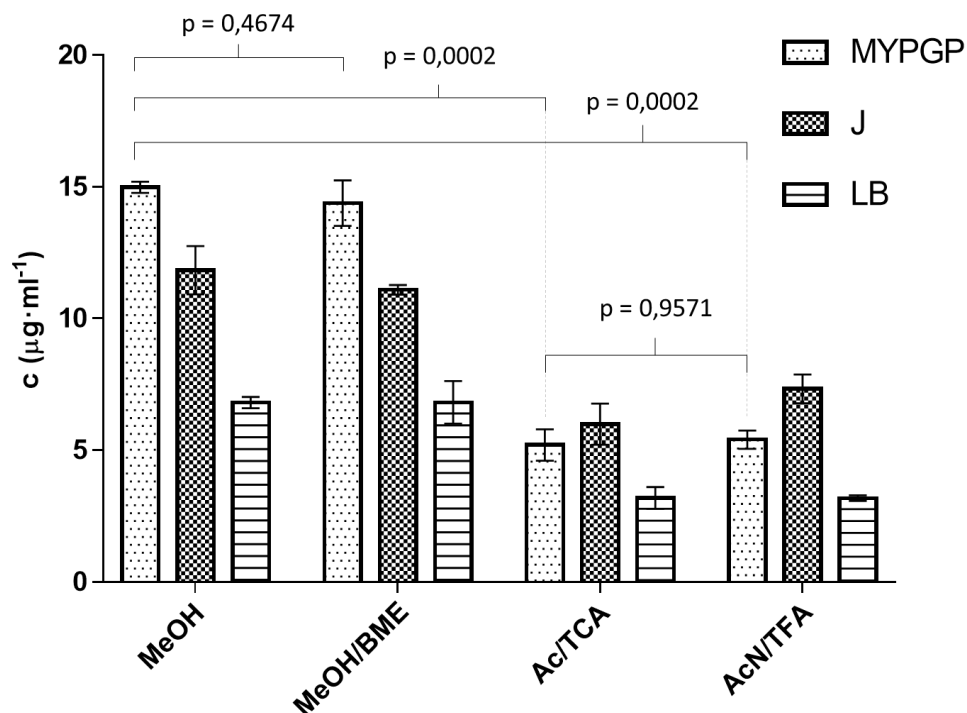
Byly připraveny proteinové standardy o vzrůstající koncentraci hovězího sérového albuminu (BSA) o koncentračním rozsahu 100–1000 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Vzorčky standardu byly proměřeny ve čtyřech technických opakováních při dvou vlnových délkách a to 450 nm a 595 m podle protokolu vycházejícího z upravené metody stanovení celkových proteinů dle Bradforda (1976). Výhodou této metody je lineární závislost koncentrace celkových proteinů na poměru absorbancí při dříve zmíněných vlnových délkách, a to jak v pracovní oblasti ($0,1 - 1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) tak při přechodu do nižších či vyšších hodnot koncentrace (Zor a Seliger, 1996). Byla sestrojena kalibrační přímka (Obr. 11) s rovnicí $y = 1,026x + 0,01136$ a hodnotou $R^2 = 0,9958$.



Obr. 11 Kalibrační přímka BSA pro přepočet koncentrací proteinů v rozmezí $0,1-1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Rovnice přímky je $y = 1,026x + 0,01136$ a hodnota $R^2 = 0,9958$.

4.3 Volba vhodné srážecí techniky pro izolaci proteinů z růstového média

Bylo otestováno celkem 4 techniky srážení proteinů ze tří kultivačních médií a dále bylo také porovnáno srážení proteinů z růstového média MYPGP, do kterého byl přidán roztok BSA pro stanovení návratnosti srážení různými technikami. Statistické rozdíly byly stanoveny jednocestnou analýzou rozptylu (one-way ANOVA) pomocí programu Statistica 13.

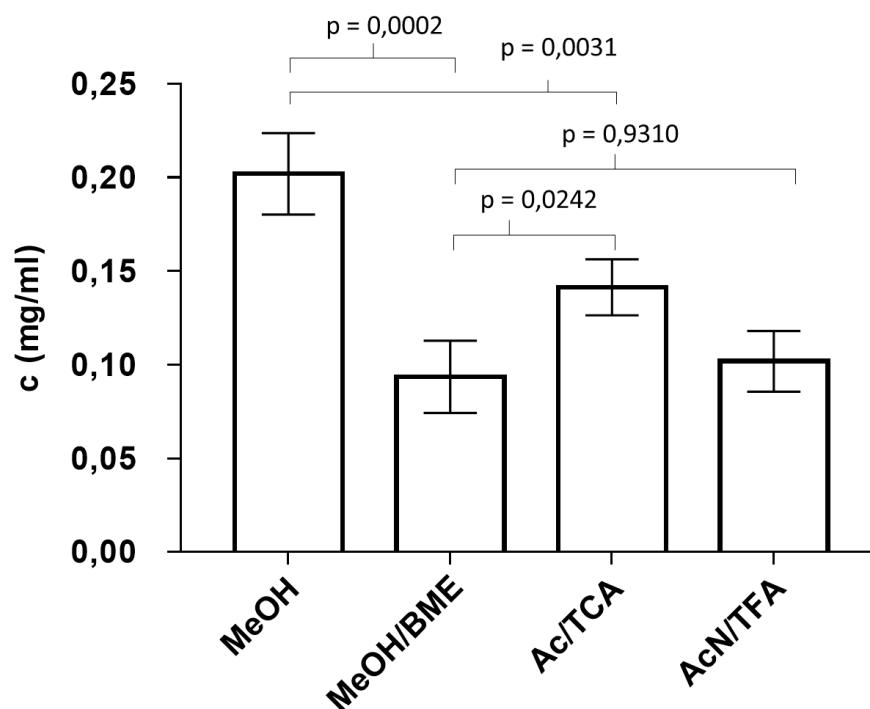


Obr. 12 Koncentrace celkových proteinů v médiích MYPGP, J a LB, srážených pomocí methanolu (MeOH), methanolu s přidavkem β -merkптоethanolu (MeOH/BME), acetonu s kyselinou trichloroctovou (Ac/TCA) a pomocí acetonitrilu s kyselinou trifluoroctovou (AcN/TCA), $n = 4$.

Technika srážení proteinů pomocí acetonitrilu a kyseliny trifluoroctové (AcN/TFA) je výhodná především malou časovou náročností (není nutná inkubace přes noc) a je vhodná pro srážení proteinů nad 50 kDa, přičemž peptidy o molekulové hmotnosti pod 10 kDa zůstávají rozpuštěny v supernatantu (Chertov *et al.*, 2004). Technika srážení pomocí AcN/TFA se však příliš neosvědčila, jelikož bylo z médií vysráženo méně proteinů než pomocí techniky využívající ke srážení methanol, případně methanol s přidavkem β -merkптоethanolu (MeOH/BME), což je patrné ze statisticky významných rozdílů mezi průměrnými hodnotami ($p < 0,05$). Téměř stejných výsledků jako při využití techniky AcN/TFA bylo dosaženo srážením pomocí acetonu s kyselinou trichlorocotovou (Aceton/TCA) jelikož průměrné hodnoty koncentrací nevykazovaly statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$). Fic *et al.* (2010) využívají v protokolu ke srážení pomocí Ac/TCA také přidavek dithiotreitolu (DTT). Bylo otestováno, jaký vliv bude mít přidavek obdobného redukčního činidla tedy BME na množství vysrážených proteinů z růstového média. Technika srážení pomocí methanolu a methanolu s koncentrací $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ BME se ukázala být pro srážení proteinů z růstového média nejvhodnější, jelikož bylo dosaženo precipitace největšího množství proteinů (viz Obr. 12) a mezi průměrnými hodnotami

koncentrací proteinů, které byly těmito technikami dosaženy, nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$).

Dále bylo ověřeno, jaké množství BSA přidaného do média je možné jednotlivými technikami vysrážet z MYPGP média. Do MYPGP média bylo přidáno takové množství BSA, aby jeho celková koncentrace v médiu činila $0,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Na Obr. 13 je graf, na němž je porovnávána koncentrace proteinů, již bylo dosaženo precipitací proteinů z média o daném přídatku BSA.



Obr. 13 Porovnání výtěžku srážení proteinů z MYPGP média s koncentrací $0,3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ albuminu ve formě koncentrace celkových proteinů mezi jednotlivými srážecími technikami: pomocí methanolu (MeOH), methanolu s přídatkem β -merkaptioethanolu (MeOH/BME), acetonu s kyselinou trichloroctovou (Ac/TCA) a pomocí acetonitrilu s kyselinou trifluoroctovou (AcN/TCA), $n = 5$.

Měřítkem efektivity srážení BSA z MYPGP byla hodnota návratnosti (recovery), která byla stanovena poměrem vysráženého množství proteinů ku známému množství BSA přidaného do média (viz Tab. 6). Technika srážení methanolem (MeOH) je efektivnější než alternativní srážení MeOH/BME a také než srážení Ac/TCA, jelikož mezi průměry hodnot koncentrace je statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Srážení technikou MeOH/BME a AcN/TFA má stejnou efektivitu, jelikož průměry hodnot neposkytují statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$). Vzhledem k těmto výsledkům byla pro další srážení vzorků médií s extracelulárně sekretovanými proteiny využita technika využívající ke srážení čistý methanol.

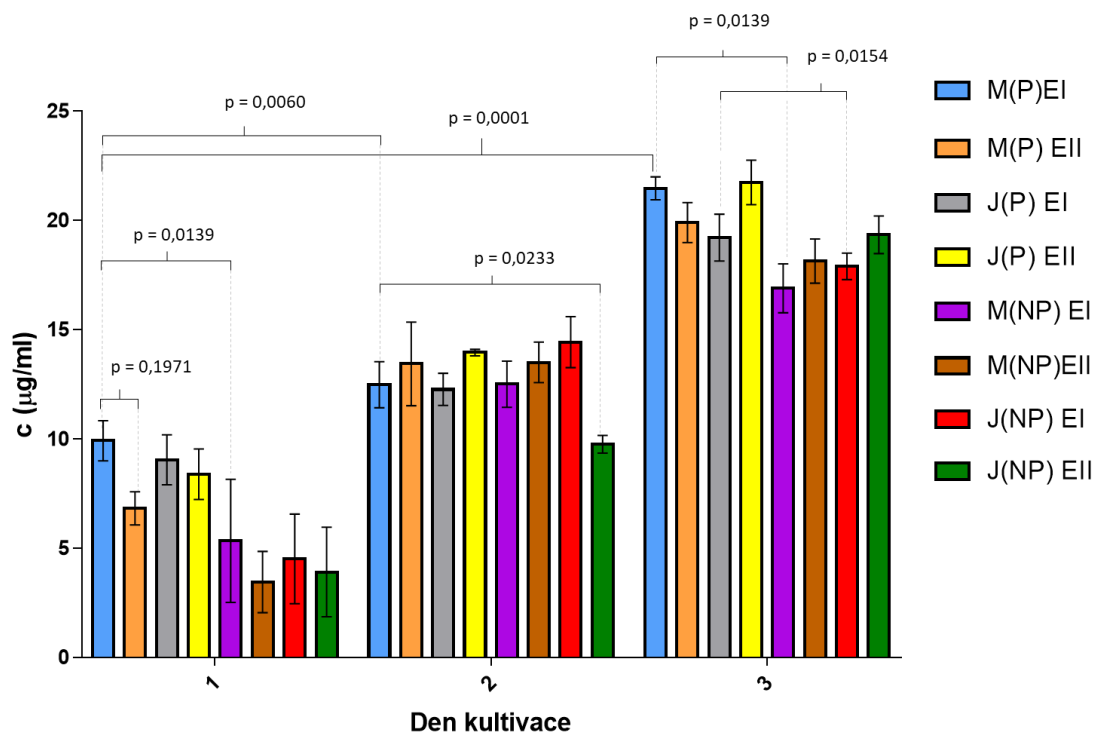
Tab. 6 Hodnoty návratnosti (průměr ± směrodatná odchylka, n = 5) pro jednotlivé techniky srážení albuminu z MYPGP média.

Technika srážení	Návratnost (%)
MeOH	67,32 ± 7,26
MeOH/BME	31,17 ± 6,40
Ac/TCA	47,10 ± 4,97
AcN/TFA	33,93 ± 5,43

4.3.1 Koncentrace celkových proteinů během kultivace

Z grafu (Obr. 14) je patrné, že během jednotlivých dní kultivace dochází ke kontinuálnímu navyšování koncentrace proteinů sekretovaných bakterií do média, jelikož byly spočteny signifikantní statistické rozdíly mezi průměry hodnot koncentrace proteinů ($p < 0,05$), které jsou v grafu demonstrovány v případě genotypu ERIC I v MYPGP médiu s úpravou pH. Dále byla naměřena větší koncentrace proteinů v prvním dni kultivace u obou genotypů bakterie *P. larvae* v médiích s upraveným pH než u těch, které byly kultivovány v médiích bez úpravy pH, což je opět doloženo statisticky významným rozdílem průměrných hodnot koncentrace u genotypu ERIC I v MYPGP médiu ($p < 0,05$). V prvním dni kultivace nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly v koncentraci mezi jednotlivými médii, ale ani mezi genotypy ($p > 0,05$). Produkci proteinů bylo tedy možno ve všech případech pozorovat již po prvním dni kultivace nehledě na původní hodnotu pH média. Ve druhém dni kultivace byl pozorován statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) pouze mezi koncentrací, jež byla stanovena u genotypu ERIC II v J médiu bez úpravy pH a koncentracemi ostatních skupin, ale mezi ostatními skupinami mezi sebou byl rozdíl statisticky nevýznamný ($p > 0,05$). Ve třetím dni kultivace byla pozorována vyšší koncentrace proteinů v médiích s úpravou pH u genotypu ERIC I v J i MYPGP médiu oproti médiím bez úpravy pH, jelikož hodnoty koncentrace byly statisticky významně odlišné ($p < 0,05$), ale mezi jednotlivými médii J a MYPGP s upraveným pH nebyla pro genotyp ERIC I statisticky významná odlišnost hodnot pozorována ($p > 0,05$). Kontinuální zvyšování koncentrace proteinů v médiích může znamenat, že bakterie sekretuje do média proteiny a peptidy i v průběhu stacionární fáze (Johnston *et al.*, 2015), anebo se může jednat o stav, kdy začínají bakteriální buňky lyzovat a v médiu se tedy zvyšuje koncentrace proteinů intracelulárních (Hrabák, 2007), jež však nebyly předmětem zájmu této práce. Podle Hrabák (2007) dochází během

kultivace bakterie *P. larvae* (nespecifikovaného genotypu) v médiích s upraveným pH ke stagnaci změn v koncentraci proteinů, přibližně po jednom dni kultivace. V případě médií bez úpravy pH dochází v případě jeho experimentu ke skokovému zvýšení koncentrace proteinů mezi 40 a 60 hodinou od kultivace, přičemž je tato skutečnost zdůvodňována právě lýzí bakteriálních buněk (Hrabák, 2007).



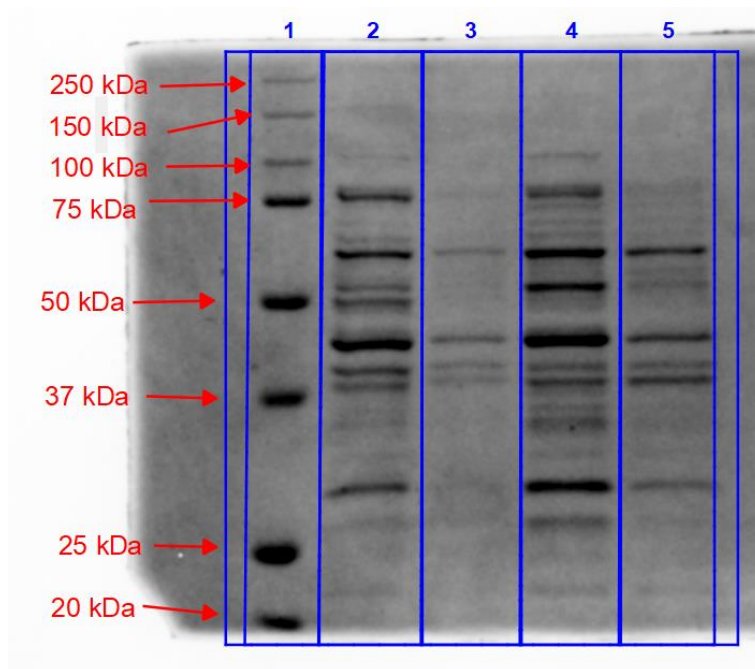
Obr. 14 Koncentrace sekretovaných proteinů v médiích během kultivace *P. larvae*. genotyp ERIC I (EI) a ERIC II (EII) v MYPGP (M) a J médiu (J) s upraveným pH (P) a neupraveným pH (NP), n = 3.

4.4 Separace proteinů pomocí SDS-PAGE a jejich vizualizace

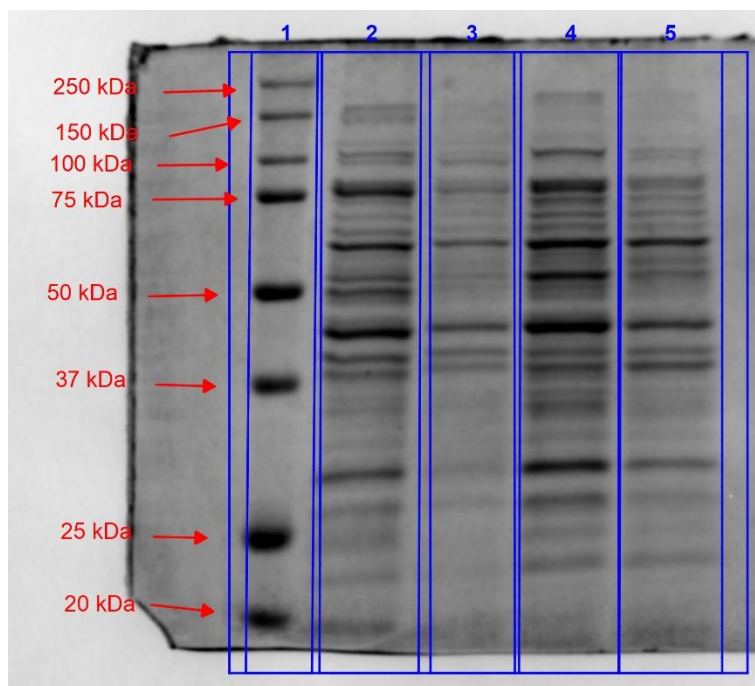
4.4.1 Porovnání jednotlivých barvení pro vizualizaci separovaných proteinů

Proteiny izolované z růstových médií byly lyofilizovány a následně rozpuštěny v 500 µl 0,2 mol·l⁻¹ Tris-HCl (pH 8,2), anebo případně přímo ve 200 µl vzorkovacího pufru. Takto zpracované vzorky byly nanášeny do jamek polyakrylamidového gelu a po elektroforetické separaci byly porovnány tři techniky vizualizace separovaných proteinových pásů na gelech. Standardní protokol barvení pomocí CBB R-250 vycházející z protokolu dle Schägger (2006) se ukázal jako dostatečný, jelikož byly vizualizovány jednotlivé pásy proteinů (viz Obr. 15). Barvení pomocí koloidního barvení CBB G-250 (viz Obr. 16) vedlo k obarvení většího množství proteinů, než při barvení

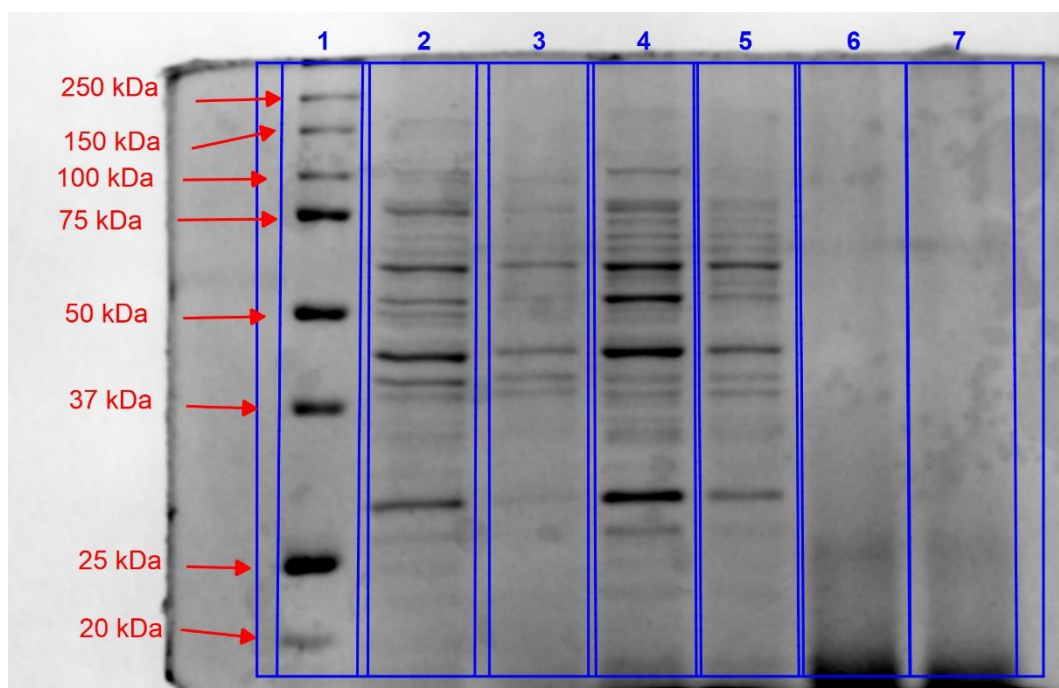
CBB R-250. Poslední porovnávanou technikou bylo barvení stříbrem (Obr. 17), které by mělo dosahovat nejvyšší citlivosti, která však závisí na obsahu redukujících aminokyselin v proteinech (Schagger, 2006). Vzhledem k množství vizualizovaných proteinových pásů a také s přihlédnutím k časové náročnosti postupu byla pro následnou vizualizaci vzorků zvolena technika barvení koloidním CBB G-250, kterou bylo možno identifikovat největší množství proteinových pásů. Jako reprezentativní vzorky pro porovnání barvicích technik byly vybrány vzorky proteinů izolované ze třídních kultur obou genotypů *P. larvae*, kultivovaných v MYPGP a J médiu s upraveným pH (Obr. 15–17).



Obr. 15 Barvení CBB-R250. Vzorky proteinů z třídních kultur v médiích s upraveným pH: genotyp ERIC I v MYPGP médiu (2), genotyp ERIC I v J médiu (3), genotyp ERIC II v MYPGP médiu (4) genotyp ERICII v J médiu (5).



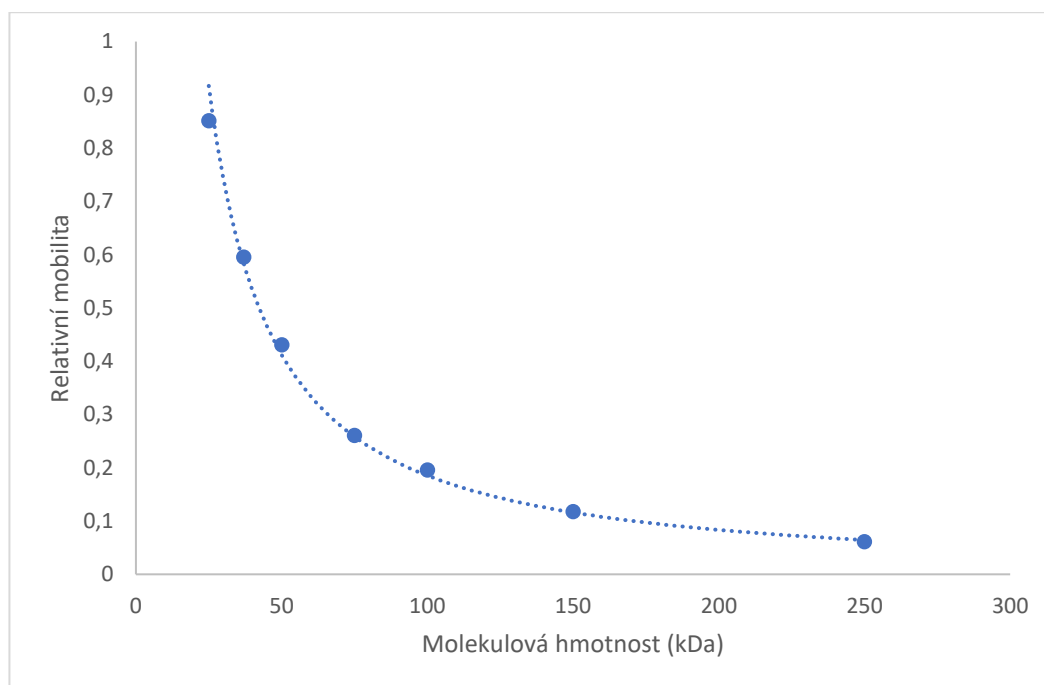
Obr. 16 Barvení koloidním CBB. Vzorky proteinů z třídenních kultur v médiích s upraveným pH: genotyp ERIC I v MYPGP médiu (2), genotyp ERIC I v J médiu (3), genotyp ERIC II v MYPGP médiu (4) genotyp ERIC II v J médiu (5).



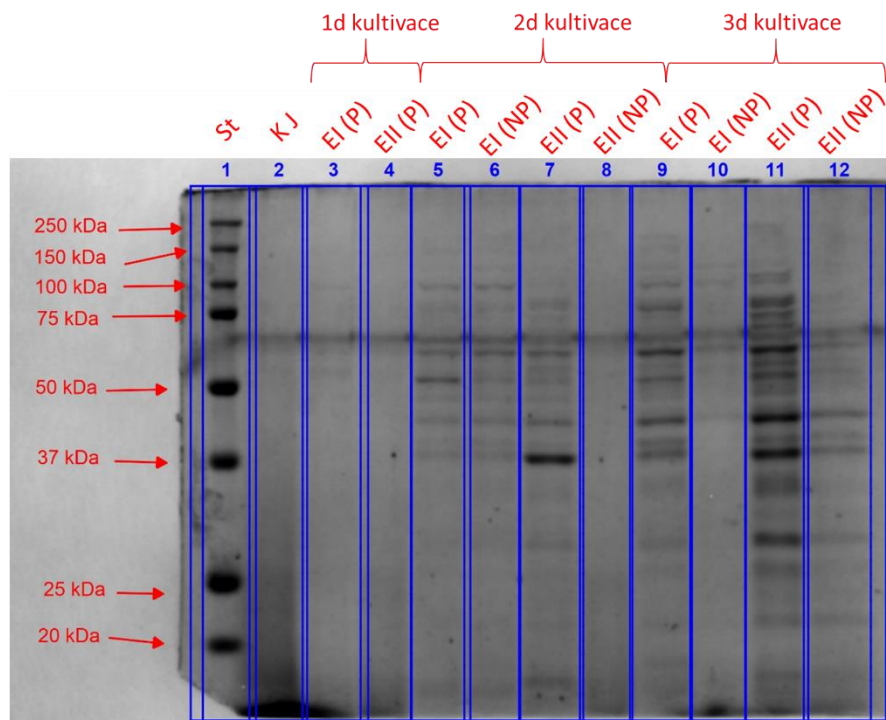
Obr. 17 Barvení stříbrem. Vzorky proteinů z třídenních kultur v médiích s upraveným pH: genotyp ERIC I v MYPGP médiu (2), genotyp ERIC I v J médiu (3), genotyp ERIC II v MYPGP médiu (4) genotyp ERIC II v J médiu (5). Izolované proteiny z čistého MYPGP média (6) a J média (7).

4.4.2 Porovnání sekrece proteinů obou genotypů *P. larve* do růstových médií

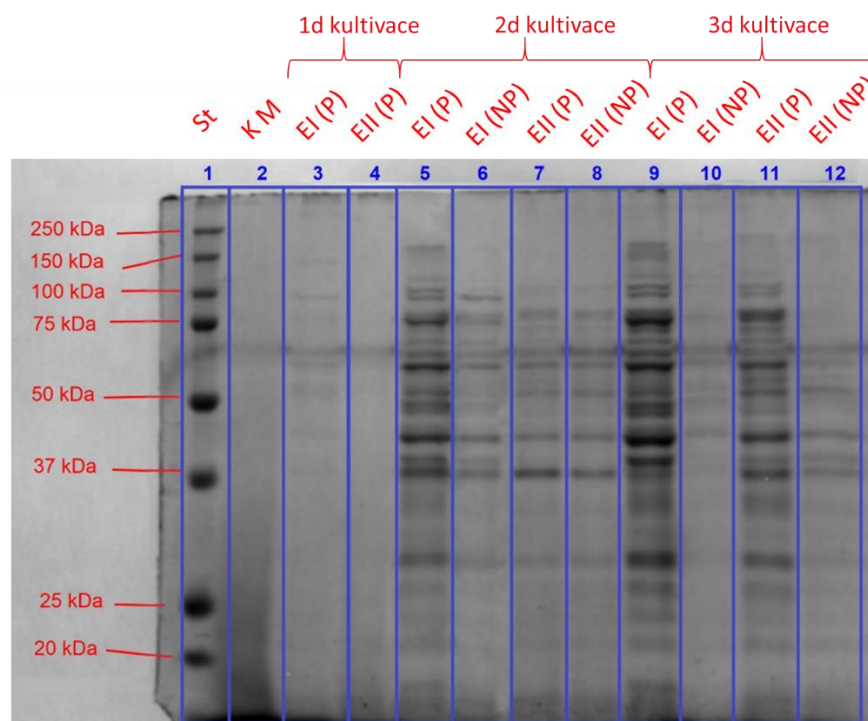
Porovnání sekrece proteinů oběma genotypy *P. larvae* do MYPGP a J média s upraveným či neupraveným pH spočívalo ve srovnání počtu a intenzity jednotlivých vizualizovaných proteinových pásů, ale také ve sledování, v jakém čase kultivace je možné je detekovat. Na následujících elektroferogramech je vidět porovnání proteinů izolovaných v prvním, druhém a třetím dni kultivace z média J (Obr. 19) a MYPGP (Obr. 20). Z těchto dvou elektroferogramů jasně vyplývá, že větší množství proteinových pásů (a také o vyšší intenzitě) lze identifikovat na médiích s upraveným pH a to jak u MYPGP tak u J média. Z tohoto důvodu byl podrobnější popis proteinových pásů proveden na shrnujícím elektroferogramu (Obr. 21), na němž byly vizualizovány proteiny izolované z médií s upraveným pH. Přibližná molekulová hmotnost byla určena vyhodnocením relativní mobility proteinových pásů standardu a vzorků programem Image Lab 6 a byla vynesena závislost (Obr. 18) relativní mobility na molekulové hmotnosti, která byla spočtena pomocí rovnice křivky $y = 37,505x^{-1,153}$ a $R^2 = 0,9972$. Tato křivka odpovídá podmínkám pro jeden elektroferogram (Obr. 21) a z důvodů rozdílných podmínek separace je nutné tuto kalibrační křivku stanovit pro každý gel zvlášť.



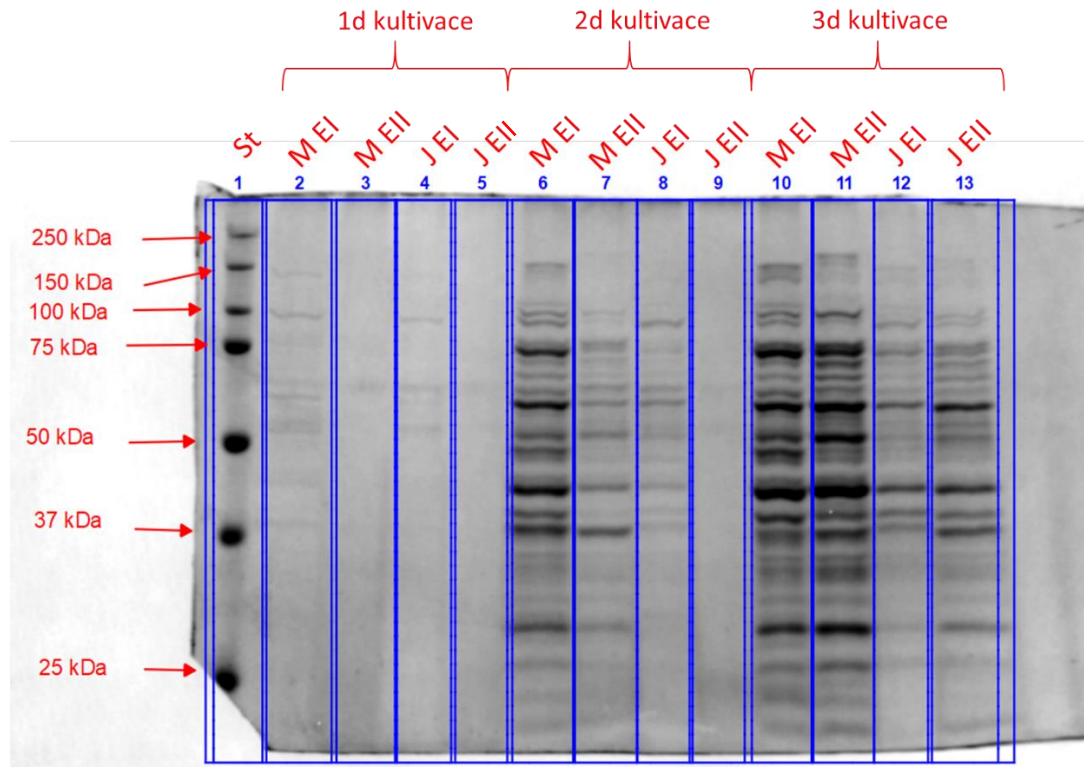
Obr. 18 Kalibrační křivka závislosti relativní mobility proteinů na molekulové hmotnosti. Rovnice přímky $y = 37,505x^{-1,153}$ a $R^2 = 0,9972$. Vyhodnocení pro elektroferogram na Obr. 21.



Obr. 19 Elektroferogram s proteiny sekretovanými *P. larvae* genotypy ERIC I (EI) a ERIC II (EII) izolovanými z J média s upraveným pH (P) a neupraveným pH (NP): standard (1); kontrola J médium (2); jednodenní kultivace genotypu EI (3) a EII (4); dvoudenní kultivace EI-P (5), EI-NP (6), EII-P (7) a EII-NP (8); třídenní kultivace EI-P (9), EI-NP (10), EII-P (11) a EII-NP (12).



Obr. 20 Elektroferogram s proteiny sekretovanými *P. larvae* genotypy ERIC I (EI) a ERIC II (EII) izolovanými z MYPGP média s upraveným pH (P) a neupraveným pH (NP): standard (1); kontrola MYPGP médium (2); jednodenní kultivace genotypu EI (3) a EII (4); dvoudenní kultivace EI-P (5), EI-NP (6), EII-P (7) a EII-NP (8); třídenní kultivace EI-P (9), EI-NP (10), EII-P (11) a EII-NP (12).



Obr. 21 Elektroferogram s proteiny sekretovanými *P. larvae* genotypy ERIC I (EI) a ERIC II (EII) izolovanými z MYPGP (M) a J média (J) s upraveným pH v průběhu kultivace: standard (1), jednodenní kultivace v MYPGP EI (2), EII (3) a v J EI (4) a EII (5); dvoudenní kultivace v MYPGP EI (6), EII (7) a v J EI (8) a EII (9); třídenní kultivace v MYPGP EI (10), EII (11) a v J EI (12) a EII (13).

Z elektroferogramu (Obr. 21) vyplývá, že první proteinové pásy lze identifikovat již po jednom dni kultivace, a to v pouze v případě genotypu ERIC I. V MYPGP médiu se jedná o proteinový pás s přibližnou molekulovou hmotností 132 kDa a dále intenzivnější pás s přibližnou molekulovou hmotností 92 kDa (a dále pak několik pásů v oblasti 75–50 kDa). V J médiu lze také pozorovat u genotypu EI viditelné proteinové pásy již při jednodenní kultivace, ale o nižší intenzitě, případně některé zcela chybí. U druhého dne kultivace se intenzita a počet proteinových pásů zvyšuje v případě obou kultivačních médií a u genotypu ERIC II v MYPGP médiu lze detekovat prvních 14 proteinových pásů. Lze pozorovat rozdíly mezi genotypy EI a EII, například intenzita pásů s přibližnou molekulovou hmotností 74, 56 a 41 kDa je výrazně vyšší u genotypu ERIC I než u ERIC II a ještě s menší intenzitou lze tyto pásy najít i u genotypu ERIC I v J médiu. Hrabák (2007) našel pomocí zymografické analýzy sekrečních produktů *P. larvae* na gelu proteiny s proteasovou aktivitou (hydrolyza želatiny) o zmíněných molekulových hmotnostech, přičemž také pozoroval zvyšující se intenzitu těchto pásů v průběhu kultivace. Dále byl identifikován proteinový pás s přibližnou molekulovou hmotností

49 kDa detekovaný u genotypu ERIC I i ERIC II, který by mohl obsahovat chitin degradující protein *PlCBP49*, jenž byl popsán a identifikován v okolí 49 kDa (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014b). Podle znalosti sekvence genu (Djukic *et al.*, 2014; Garcia-Gonzalez *et al.*, 2014b), jenž kóduje cytotoxin *Plx1* u genotypu ERIC I, byla určena hodnota molekulové hmotnosti (pomocí online překladače genů: https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html) na 111 kDa. Genem kódujícím tento cytotoxin disponuje pouze genotyp ERIC I (Djukic *et al.*, 2014) a proteinový pás v okolí 110 kDa byl detekován pouze u genotypu ERIC I v MYPGP médiu od druhého dne kultivace.

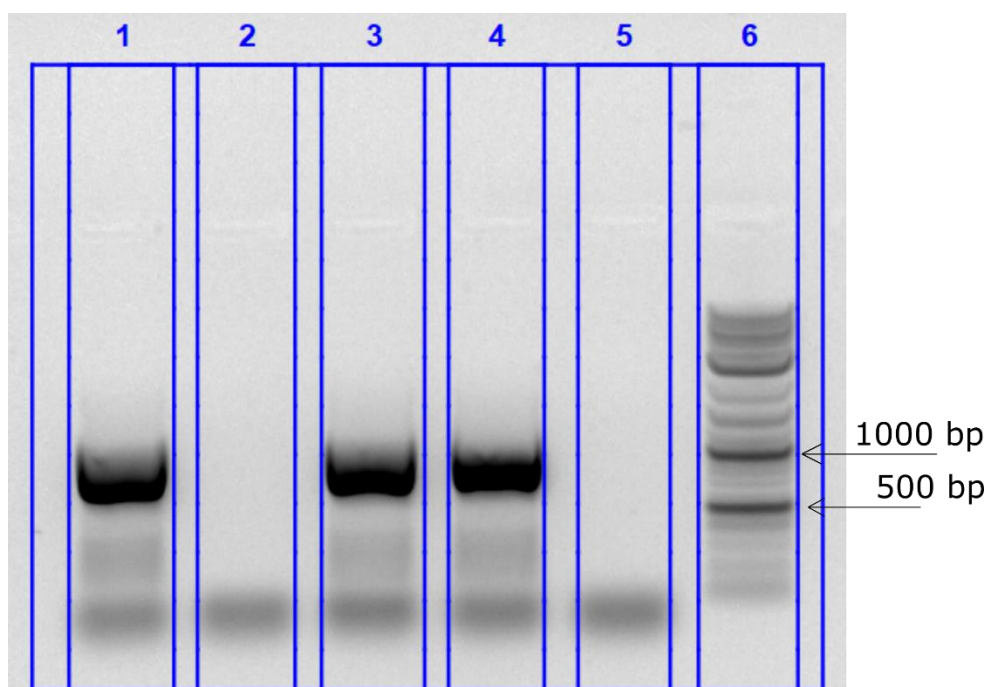
Vzhledem k tomu, že nebyla lýze buněk během kultivace ověřena, nelze přičítat proteinům vizualizovaným na gelech pouze extracelulární charakter. Nicméně zde je korelace mezi proteiny identifikovanými v této práci a v dalších vědeckých publikacích ve smyslu molekulové hmotnosti (jenž je vzhledem k metodě jejího určení pouze přibližná) a také s ohledem na produkci různých proteinů oběma genotypy *P. larvae*. Pro verifikaci konkrétního proteinu na gelu by bylo nutné provést detekci s příslušnou protilátkou, případně ověřit aktivitu těchto proteinů (proteolytická či chitin degradující) pomocí zymografické analýzy, nebo proteiny identifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie.

Vzhledem ke koncentraci celkových proteinů v médiích (viz kapitola 4.3.1) by se zdálo, že by měla být intenzita proteinových pásů v případě proteinů izolovaných z médií s upraveným a neupraveným pH podobná, jelikož se v nich koncentrace proteinů příliš neliší. Avšak již na první pohled je mezi nimi velký rozdíl a více proteinových pásů o větší intenzitě lze detekovat vždy výhradně v případě médií s úpravou pH. Nabízí se tedy vysvětlení v podobě zvýšené aktivity proteas, jejichž pH optimum leží v kyselé oblasti (Dancer a Chantawannakul, 1997), která přísluší právě médiím bez úpravy pH a po proteolytické aktivitě (Dancer a Chantawannakul, 1997; Rao *et al.*, 1998) nejsou našťipané proteiny a peptidy zachycené na gelu, zatímco metodou Bradforda je jejich koncentrace spektrofotometricky stanovitelná (Congdon *et al.*, 1993).

4.5 Identifikace bakterie *Paenibacillus larvae* metodou PCR

Na identifikaci bakterie *P. larvae* pomocí PCR byla použita metodika podle (Dobbelaere *et al.*, 2001). Identifikace byla prováděna za účelem verifikace přítomnosti bakterie *P. larvae* na kultivačních miskách v průběhu přechovávání této bakterie, ale také během kultivace. Podezření na potenciální kontaminaci souviselo obvykle s rozdílným vzhledem

kolonií přechovávané bakterie, absencí specifického zápachu, který je pro růst bakterie *P. larvae* typický (Bailey, 1963; Hansen a Brodsgaard, 1999; de Graaf *et al.*, 2006), ale také byla identifikace prováděna jako rutinní ověření přítomnosti bakterie *P. larvae*. Dobbelaere (2001) specifikuje výsledný produkt PCR reakce jako amplikon o velikosti 1106 bp. Vzorky DNA byly před smísením s reakční směsí naředěny z původní koncentrace na koncentraci 100 ng·ml⁻¹. Ze záznamu z agarosové elektroforézy (Obr. 22) je patrné, že je výsledný amplikon totožný u kontroly (referenční DNA bakterie *P. larvae* genotypu ERIC II) a u vzorků 3 (kultura *P. larvae* ERIC I) a 4 (kultura *P. larvae* ERIC II), které pocházely z kultivačních misek. Vzorek 2 obsahoval DNA neznámé bakterie, k jejímuž růstu došlo na miskách, které byly kultivovány déle než 5 dní, a proto zde bylo zvýšené riziko kontaminace, přičemž z obr. vyplývá, že nešlo o bakterii *P. larvae*, z důvodů absence specifického amplikonu (1106 bp). Kultivační média i misky obsahovaly kyselinu nalidixovou v koncentraci 20 µg·ml⁻¹, kterou je médium obohaceno právě z důvodů potlačení potenciální mikrobiální kontaminace (de Graaf *et al.*, 2013). Kyselina nalidixová je účinná především proti gram-negativním bakteriím, zatímco růst bakterií gram-pozitivních je potlačován méně či vůbec, a proto mohla být kontaminace právě tohoto původu (Emmerson a Jones, 2003).



Obr. 22 Elektroferogram s amplikony jednotlivých PCR reakcí. Pozitivní kontrola jako referenční vzorek *P. larvae* genotyp ERIC II (1), neznámá bakterie (2), *P. larvae* ERIC I z kultivační misky (3), *P. larvae* ERIC II z kultivační misky (4), negativní kontrola (5), DNA marker (6).

5 ZÁVĚR

V této bakalářské práci zaměřené na studium extracelulárně sekretovaných proteinů a peptidů bakterie *P. larvae* bylo dosaženo následujících výsledků:

- V teoretické části práce byla vypracována rešerše se zaměřením na bakteriální onemocnění včely medonosné (*Apis mellifera*). Hlavním předmětem zájmu byla bakterie *P. larvae*, která je přímým původcem onemocnění moru včelího plodu. Sekreční proteiny a peptidy příslušných genotypů bakterie *P. larvae* byly blíže popsány, byla specifikována jejich role v mechanismu patogeneze a dále byly shrnuty metody studia proteinů.
- V praktické části byly optimalizovány parametry kultivace obou studovaných genotypů (ERIC I a ERIC II) *P. larvae* se zaměřením na sekreční proteiny, přičemž se jako ideální jeví kultivace této bakterie v MYPGP médiu s upraveným pH na hodnotu 7,3 pomocí KOH. Za těchto podmínek bylo nejdříve dosaženo logaritmické a stacionární fáze bakteriálního růstu.
- Byly porovnány různé techniky srážení proteinů z růstových médií a na základě zjištěných hodnot návratnosti byla jako optimální vybrána technika srážení čistým vymraženým methanolem.
- Sekreční proteiny bylo možné nejlépe vizualizovat na 12% polyakrylamidovém gelu koloidním barvením CBB G-250 již po jednom dni od počátku kultivace. Porovnáním relativní mobility standardů a vzorků na gelech byly u obou genotypů bakterie *P. larvae* identifikovány proteinové pásy o molekulových hmotnostech 74, 56 a 42 kDa odpovídající molekulovým hmotnostem proteas dříve identifikovaných u *P. larvae*. Společný proteinový pás pro oba genotypy v oblasti 49 kDa odpovídá chitin degradujícímu enzymu *PlcBP49*. Dále byl, pouze u genotypu ERIC I, identifikován proteinový pás s přibližnou molekulovou hmotností 110 kDa, který odpovídá cytotoxinu *Plx1* specifickému právě pro tento genotyp.

Molekulové hmotnosti proteinových pásů identifikované v této práci byly s molekulovými hmotnostmi dříve popsaných proteinů sekretovaných bakterií *P. larvae* pouze porovnány a pro přesnější ověření výsledků je v budoucnu možné identifikovat bakteriální proteiny pomocí hmotnostní spektrometrie.

6 LITERATURA

- Aachmann F. L., Sorlie M., Skjak-Braek G., Eijsink V. G. H., Vaaje-Kolstad G. (2012): Nmr structure of a lytic polysaccharide monooxygenase provides insight into copper binding, protein dynamics, and substrate interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 18779-18784.
- Adekoya O. A., Sylte I. (2009): The thermolysin family (m4) of enzymes: Therapeutic and biotechnological potential. *Chemical Biology & Drug Design* **73**, 7-16.
- Ankri S., Mirelman D. (1999): Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection* **1**, 125-129.
- Antunez K., Anido M., Arredondo D., Evans J. D., Zunino P. (2011a): *Paenibacillus larvae* enolase as a virulence factor in honeybee larvae infection. *Veterinary Microbiology* **147**, 83-89.
- Antunez K., Arredondo D., Anido M., Zunino P. (2011b): Metalloprotease production by *paenibacillus larvae* during the infection of honeybee larvae. *Microbiology-Sgm* **157**, 1474-1480.
- Antunez K., Martin-Hernandez R., Prieto L., Meana A., Zunino P., Higes M. (2009): Immune suppression in the honey bee (*apis mellifera*) following infection by *nosema ceranae* (microsporidia). *Environmental Microbiology* **11**, 2284-2290.
- Arathi H. S., Burns I., Spivak M. (2000): Ethology of hygienic behaviour in the honey bee *apis mellifera* l-(hymenoptera : Apidae): Behavioural repertoire of hygienic bees. *Ethology* **106**, 365-379.
- Arbige M. V., Pitcher W. H. (1989): Industrial enzymology - a look towards the future. *Trends in Biotechnology* **7**, 330-335.
- Bailey L. (1963): Pathogenicity for honey-bee larvae of microorganisms associated with european foulbrood. *Journal of Insect Pathology* **5**, 198.
- Bailey L. (1983): *Melissococcus-pluton*, the cause of european foulbrood of honey bees (*apis* spp). *Journal of Applied Bacteriology* **55**, 65-69.
- Barth H., Aktories K., Popoff M. R., Stiles B. G. (2004): Binary bacterial toxins: Biochemistry, biology, and applications of common clostridium and bacillus proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 373.
- Bednář M., Fraňková V., Schindler J., Souček A., Vávra J. (1996): *Lékařská mikrobiologie*, Triton, Praha, 560.
- Belloy L., Imdorf A., Fries I., Forsgren E., Berthoud H., Kuhn R., Charriere J. D. (2007): Spatial distribution of *melissococcus plutonius* in adult honey bees collected from apiaries and colonies with and without symptoms of european foulbrood. *Apidologie* **38**, 136-140.
- Bergmann S., Rohde M., Chhatwal G. S., Hammerschmidt S. (2001): Alpha-enolase of *streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular Microbiology* **40**, 1273-1287.
- Boman H. G. (1996): Peptide antibiotics: Holy or heretic grails of innate immunity? *Scandinavian Journal of Immunology* **43**, 475-482.
- Bradford M. M. (1976): Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- Brandt C. R., Adang M. J., Spence K. D. (1978): Peritrophic membrane - ultrastructural analysis and function as a mechanical barrier to microbial infection in *orgyia-pseudotsugata*. *Journal of Invertebrate Pathology* **32**, 12-24.
- Breukink E., Wiedemann I., Van Kraaij C., Kuipers O. P., Sahl H. G., De Kruijff B. (1999): Use of the cell wall precursor lipid ii by a pore-forming peptide antibiotic. *Science* **286**, 2361-2364.
- Brodsgaard C. J., Ritter W., Hansen H. (1998): Response of in vitro reared honey bee larvae to various doses of *paenibacillus larvae* larvae spores. *Apidologie* **29**, 569-578.
- Budge G. E., Barrett B., Jones B., Pietravalle S., Marris G., Chantawannakul P., Thwaites R., Hall J., Cuthbertson A. G. S., Brown M. A. (2010): The occurrence of *melissococcus plutonius* in healthy colonies of *apis mellifera* and the efficacy of european foulbrood control measures. *Journal of Invertebrate Pathology* **105**, 164-170.

- Budge G. E., Shirley M. D. F., Jones B., Quill E., Tomkies V., Feil E. J., Brown M. A., Haynes E. G. (2014): Molecular epidemiology and population structure of the honey bee brood pathogen *melissococcus plutonius*. *Isme Journal* **8**, 1588-1597.
- Bulla L. A., Bennett G. A., Shotwell O. L. (1970): Physiology of sporeforming bacteria associated with insects .2. Lipids of vegetative cells. *Journal of Bacteriology* **104**, 1246.
- Cammue B. P. A., Debolle M. F. C., Schoofs H. M. E., Terras F. R. G., Thevissen K., Osborn R. W., Rees S. B., Broekaert W. F. (1994): Gene-encoded antimicrobial peptides from plants. *Antimicrobial Peptides* **186**, 91-101.
- Cantarel B. L., Coutinho P. M., Rancurel C., Bernard T., Lombard V., Henrissat B. (2009): The carbohydrate-active enzymes database (cazy): An expert resource for glycogenomics. *Nucleic Acids Research* **37**, 233-238.
- Carpusca I., Jank T., Aktories K. (2006): *Bacillus sphaericus* mosquitocidal toxin (mtx) and pierisin: The enigmatic offspring from the family of adp-ribosyltransferases. *Molecular Microbiology* **62**, 621-630.
- Carpusca I., Schirmer J., Aktories K. (2004): Two-site autoinhibition of the adp-ribosylating mosquitocidal toxin (mtx) from *bacillus sphaericus* by its 70-kda ricin-like binding domains. *Biochemistry* **43**, 12009-12019.
- Cascales E., Buchanan S. K., Duche D., Kleanthous C., Lloubes R., Postle K., Riley M., Slatin S., Cavard D. (2007): Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**, 158-229.
- Casteels P., Ampe C., Jacobs F., Vaeck M., Tempst P. (1989): Apidaecins - antibacterial peptides from honeybees. *Embo Journal* **8**, 2387-2391.
- Cleveland D. W., Fischer S. G., Kirschner M. W., Laemmli U. K. (1977): Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl-sulfate and analysis by gel-electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry* **252**, 1102-1106.
- Cochrane S. A., Vederas J. C. (2016): Lipopeptides from *bacillus* and *paenibacillus* spp.: A gold mine of antibiotic candidates. *Medicinal Research Reviews* **36**, 4-31.
- Congdon R. W., Muth G. W., Splittgerber A. G. (1993): The binding interaction of coomassie blue with proteins. *Analytical Biochemistry* **213**, 407-413.
- Cremer S., Armitage S. a. O., Schmid-Hempel P. (2007): Social immunity. *Current Biology* **17**, 693-702.
- Dancer B. N., Chantawannakul P. (1997): The proteases of american foulbrood scales. *Journal of Invertebrate Pathology* **70**, 79-87.
- De Graaf D. C., Alippi A. M., Antunez K., Aronstein K. A., Budge G., De Koker D., De Smet L., Dingman D. W., Evans J. D., Foster L. J., Funfhaus A., Garcia-Gonzalez E., Gregorc A., Human H., Murray K. D., Nguyen B. K., Poppinga L., Spivak M., Vanengelsdorp D., Wilkins S., Genersch E. (2013): Standard methods for american foulbrood research. *Journal of Apicultural Research* **52**, 27.
- De Graaf D. C., Alippi A. M., Brown M., Evans J. D., Feldlaufer M., Gregorc A., Hornitzky M., Pernal S. F., Schuch D. M. T., Titera D., Tomkies V., Ritter W. (2006): Diagnosis of american foulbrood in honey bees: A synthesis and proposed analytical protocols. *Letters in Applied Microbiology* **43**, 583-590.
- Dingman D. W., Stahly D. P. (1983): Medium promoting sporulation of *bacillus*-larvae and metabolism of medium components. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 860-869.
- Djukic M., Brzuszkiewicz E., Funfhaus A., Voss J., Gollnow K., Poppinga L., Liesegang H., Garcia-Gonzalez E., Genersch E., Daniel R. (2014): How to kill the honey bee larva: Genomic potential and virulence mechanisms of *paenibacillus* larvae. *Plos One* **9**, 14.
- Dobbelaere W., De Graaf D. C., Peeters J. E., Jacobs F. J. (2001): Development of a fast and reliable diagnostic method for american foulbrood disease (*paenibacillus* larvae subsp larvae) using a 16s rrna gene based pcr. *Apidologie* **32**, 363-370.
- Duquesne S., Destoumieux-Garzon D., Peduzzi J., Rebuffat S. (2007): Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports* **24**, 708-734.
- Dyballa N., Metzger S. (2009). fast and sensitive colloidal coomassie g-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Secondary.: Journal of Visualized Experiments*.

- Ebeling J., Knispel H., Hertlein G., Funfhaus A., Genersch E. (2016): Biology of *paenibacillus* larvae, a deadly pathogen of honey bee larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**, 7387-7395.
- Emmerson A. M., Jones A. M. (2003): The quinolones: Decades of development and use. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**, 13-20.
- Erbán T., Ledvinka O., Kamler M., Hortová B., Nesvorná M., Tyl J., Titera D., Marković M., Hubert J. (2017): Bacterial community associated with worker honey bees (*Apis mellifera*) affected by European foulbrood. *PeerJ* **5**, 28.
- Fic E., Kedracka-Krok S., Jankowska U., Pirog A., Dziedzicka-Wasylewska M. (2010): Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis* **31**, 3573-3579.
- Finking R., Marahiel M. A. (2004): Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annual Review of Microbiology* **58**, 453-488.
- Forsgren E., Olofsson T. C., Vasquez A., Fries I. (2010): Novel lactic acid bacteria inhibiting *paenibacillus* larvae in honey bee larvae. *Apidologie* **41**, 99-108.
- Funfhaus A., Poppinga L., Genersch E. (2013): Identification and characterization of two novel toxins expressed by the lethal honey bee pathogen *paenibacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood. *Environmental Microbiology* **15**, 2951-2965.
- García-González E., Genersch E. (2013): Honey bee larval peritrophic matrix degradation during infection with *paenibacillus* larvae, the aetiological agent of American foulbrood of honey bees, is a key step in pathogenesis. *Environmental Microbiology* **15**, 2894-2901.
- García-González E., Müller S., Enslé P., Sussmuth R. D., Genersch E. (2014a): Elucidation of sevadicin, a novel non-ribosomal peptide secondary metabolite produced by the honey bee pathogenic bacterium *paenibacillus* larvae. *Environmental Microbiology* **16**, 1297-1309.
- García-González E., Poppinga L., Funfhaus A., Hertlein G., Hedtke K., Jakubowska A., Genersch E. (2014b): *Paenibacillus* larvae chitin-degrading protein *plcbp49* is a key virulence factor in American foulbrood of honey bees. *Plos Pathogens* **10**, 12.
- Gende L. B., Eguaras M. J., Fritz R. (2008): Evaluation of culture media for *paenibacillus* larvae applied to studies of antimicrobial activity. *Revista Argentina De Microbiologia* **40**, 147-150.
- Genersch E. (2010): American foulbrood in honeybees and its causative agent, *paenibacillus* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* **103**, S10-S19.
- Genersch E., Ashiralieva A., Fries I. (2005): Strain- and genotype-specific differences in virulence of *paenibacillus* larvae subsp. *larvae*, a bacterial pathogen causing American foulbrood disease in honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 7551-7555.
- Genersch E., Forsgren E., Pentikainen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I. (2006): Reclassification of *paenibacillus* larvae subsp. *pulvifaciens* and *paenibacillus* larvae subsp. *larvae* as *paenibacillus* larvae without subspecies differentiation. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 501-511.
- Gillespie J. P., Kanost M. R., Trenczek T. (1997): Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* **42**, 611-643.
- Gilliam M. (1997): Identification and roles of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *Fems Microbiology Letters* **155**, 1-10.
- Gordon D. M., O'Brien C. L. (2006): Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology-Sgm* **152**, 3239-3244.
- Gregorc A., Bowen I. D. (1998): Histopathological and histochemical changes in honeybee larvae (*Apis mellifera* L.) after infection with *Bacillus* larvae, the causative agent of American foulbrood disease. *Cell Biology International* **22**, 137-144.
- Hahn-Hagerdal B., Karhumaa K., Larsson C. U., Gorwa-Grauslund M., Gorgens J., Van Zyl W. H. (2005): Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microbial Cell Factories* **4**, 16.
- Hancock R. E. W., Diamond G. (2000): The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends in Microbiology* **8**, 402-410.
- Hansen H., Brodsgaard C. J. (1999): American foulbrood: A review of its biology, diagnosis and control. *Bee World* **80**, 5-23.

- Harder J., Bartels J., Christophers E., Schroder J. M. (2001): Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 5707-5713.
- Hasemann L. (1961). How long can spores of american foulbrood live? *Secondary*.: Am. Bee J.
- Hegedus D., Erlandson M., Gillott C., Toprak U. (2009): New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual Review of Entomology* **54**, 285-302.
- Hertlein G., Muller S., Garcia-Gonzalez E., Poppingal L., Sussmuth R. D., Genersch E. (2014): Production of the catechol type siderophore bacillibactin by the honey bee pathogen *paenibacillus* larvae. *Plos One* **9**, 12.
- Hertlein G., Seiffert M., Gensel S., Garcia-Gonzalez E., Ebeling J., Skobalj R., Kuthning A., Sussmuth R. D., Genersch E. (2016): Biological role of paenilarvins, iturin-like lipopeptide secondary metabolites produced by the honey bee pathogen *paenibacillus* larvae. *Plos One* **11**, 14.
- Heyndrickx M., Vandemeulebroecke K., Hoste B., Janssen P., Kersters K., Devos P., Logan N. A., Ali N., Berkeley R. C. W. (1996): Reclassification of *paenibacillus* (formerly *bacillus*) *pulvifaciens*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **46**, 270-279.
- Holbourn K. P., Shone C. C., Acharya K. R. (2006): A family of killer toxins - exploring the mechanism of adp-ribosylating toxins. *Febs Journal* **273**, 4579-4593.
- Hrabák J. (2007): Proteolytické enzymy vegetativních forem a spor bakterie *paenibacillus* larvae. Disertační práce, Karlova univerzita v Praze, Česká republika.
- Hrabak J., Martinek K. (2007): Screening of secreted proteases of *paenibacillus* larvae by using substrate-sds-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Apicultural Research* **46**, 160-164.
- Hurmalaianen V., Edelman S., Antikainen J., Baumann M., Lahteenmaki K., Korhonen T. K. (2007): Extracellular proteins of *lactobacillus crispatus* enhance activation of human plasminogen. *Microbiology-Sgm* **153**, 1112-1122.
- Chan Q. W. T., Cornman R. S., Birol I., Liao N. Y., Chan S. K., Docking T. R., Jackman S. D., Taylor G. A., Jones S. J. M., De Graaf D. C., Evans J. D., Foster L. J. (2011): Updated genome assembly and annotation of *paenibacillus* larvae, the agent of american foulbrood disease of honey bees. *Bmc Genomics* **12**, 15.
- Chertov O., Biragyn A., Kwak L. W., Simpson J. T., Boronina T., Hoang V. M., Prieto D. A., Conrads T. P., Veenstra T. D., Fisher R. J. (2004): Organic solvent extraction of proteins and peptides from serum as an effective sample preparation for detection and identification of biomarkers by mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 1195-1203.
- Cheshire F., R, Cheyne W., W (1885). The pathogenic history and history under cultivation of a new bacillus (b. Alvei), the cause of a disease of the hive bee hitherto known as foul brood. *Secondary*.: Journal of the Royal Microscopical Society.
- Chopra I., Hawkey P. M., Hinton M. (1992): Tetracyclines, molecular and clinical aspects. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **29**, 245-277.
- Chopra I., Roberts M. (2001): Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**, 232.
- Johnston C. J. C., Robertson E., Harcus Y., Grainger J. R., Coakley G., Smyth D. J., Mcsorley H. J., Maizels R. (2015): Cultivation of *heligmosomoides polygyrus*: An immunomodulatory nematode parasite and its secreted products. *Jove-Journal of Visualized Experiments* **10**.
- Katawera V., Siedner M., Boum Y. (2014): Evaluation of the modified colorimetric resazurin microtiter plate-based antibacterial assay for rapid and reliable tuberculosis drug susceptibility testing. *Bmc Microbiology* **14**, 4.
- Klaenhammer T. R. (1993): Genetics of bacteriocins produced by lactic-acid bacteria. *Fems Microbiology Reviews* **12**, 39-86.
- Kleinkauf H., Vondohren H. (1990): Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics. *European Journal of Biochemistry* **192**, 1-15.
- Klose J. (1975): Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues - novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* **26**, 231-243.

- Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K. (1999): Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* **402**, 656-660.
- Laemmli U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-t4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee C. H. (2017): A simple outline of methods for protein isolation and purification. *Endocrinology and Metabolism* **32**, 18-22.
- Liu J. (1994): Microcin b17 - posttranslational modifications and their biological implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 4618-4620.
- Marahiel M. A., Stachelhaus T., Mootz H. D. (1997): Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews* **97**, 2651-2673.
- Mattick A. T. R., Hirsch A. (1947): Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet* **253**, 5-8.
- Mckee B. A., Goodman R. D., Hornitzky M. A. (2004): The transmission of european foulbrood (melissococcus plutonius) to artificially reared honey bee larvae (apis mellifera). *Journal of Apicultural Research* **43**, 93-100.
- Nagao J. I., Asaduzzaman S. M., Aso Y., Okuda K., Nakayama J., Sonomoto K. (2006): Lantibiotics: Insight and foresight for new paradigm. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **102**, 139-149.
- Neu H. C. (1992): The crisis in antibiotic-resistance. *Science* **257**, 1064-1073.
- Nissenmeyer J., Nes I. F. (1997): Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: Their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Archives of Microbiology* **167**, 67-77.
- Nolan E. M., Fischbach M. A., Koglin A., Walsh C. T. (2007): Biosynthetic tailoring of microcin e492m: Post-translational modification affords an antibacterial siderophore-peptide conjugate. *Journal of the American Chemical Society* **129**, 14336-14347.
- Ozalp V. C., Kavruk M., Dilek O., Bayrac A. T. (2015): Aptamers: Molecular tools for medical diagnosis. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **15**, 1125-1137.
- Papagianni M. (2003): Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: Biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances* **21**, 465-499.
- Peterson G. L. (1983): Determination of total protein. *Methods in Enzymology* **91**, 95-119.
- Plow E. F., Herren T., Redlitz A., Miles L. A., Hooverplow J. L. (1995): The cell biology of the plasminogen system. *Faseb Journal* **9**, 939-945.
- Poppinga L., Janesch B., Funfhaus A., Sekot G., Garcia-Gonzalez E., Hertlein G., Hedtke K., Schaffer C., Genersch E. (2012): Identification and functional analysis of the s-layer protein spla of paenibacillus larvae, the causative agent of american foulbrood of honey bees. *Plos Pathogens* **8**, 13.
- Potts S. G., Biesmeijer J. C., Kremen C., Neumann P., Schweiger O., Kunin W. E. (2010): Global pollinator declines: Trends, impacts and drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 345-353.
- Rao M. B., Tanksale A. M., Ghatge M. S., Deshpande V. V. (1998): Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 597.
- Rauch S., Ashiralieva A., Hedtke K., Genersch E. (2009): Negative correlation between individual-insect-level virulence and colony-level virulence of paenibacillus larvae, the etiological agent of american foulbrood of honeybees. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 3344-3347.
- Rinaudo M. (2006): Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science* **31**, 603-632.
- Rothenbuhler W. C. (1964): Behavior genetics of nest cleaning in honey bees .4. Responses of fl and backcross generations to disease-killed brood. *American Zoologist* **4**, 111-123.
- Ryan M. P., Jack R. W., Josten M., Sahl H. G., Jung G., Ross R. P., Hill C. (1999): Extensive post-translational modification, including serine to d-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lactacin 3147. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 37544-37550.
- Sara M., Sleytr U. B. (2000): S-layer proteins. *Journal of Bacteriology* **182**, 859-868.
- Schagger H. (2006): Tricine-sds-page. *Nature Protocols* **1**, 16-22.

- Sood S., Steinmetz H., Beims H., Mohr K. I., Stadler M., Djukic M., Von Der Ohe W., Steinert M., Daniel R., Muller R. (2014): Paenilarvins: Iturin family lipopeptides from the honey bee pathogen *paenibacillus* larvae. *Chembiochem* **15**, 1947-1955.
- Stein T. (2005): *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* **56**, 845-857.
- Strieker M., Tanovic A., Marahiel M. A. (2010): Nonribosomal peptide synthetases: Structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology* **20**, 234-240.
- Tantipaiboonwong P., Sinchaikul S., Sriyam S., Phutrakul S., Chen S. T. (2005): Different techniques for urinary protein analysis of normal and lung cancer patients. *Proteomics* **5**, 1140-1149.
- Tarr H., L., A. (1936). Studies on european foulbrood of bees ii. The production of the disease experimentally. *Secondary.:* Ann. Appl. Biol.
- Tellam R. L., Wijffels G., Willadsen P. (1999): Peritrophic matrix proteins. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 87-101.
- Toprak U., Harris S., Baldwin D., Theilmann D., Gillott C., Hegedus D. D., Erlandson M. A. (2012): Role of enhancin in *mamestra configurata* nucleopolyhedrovirus virulence: Selective degradation of host peritrophic matrix proteins. *Journal of General Virology* **93**, 744-753.
- Vasquez A., Forsgren E., Fries I., Paxton R. J., Flaberg E., Szekely L., Olofsson T. C. (2012): Symbionts as major modulators of insect health: Lactic acid bacteria and honeybees. *Plos One* **7**, 9.
- Vasquez A., Olofsson T. C. (2009): The lactic acid bacteria involved in the production of bee pollen and bee bread. *Journal of Apicultural Research* **48**, 189-195.
- Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F., Lupski J. (1994): Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **5**, 25-40.
- Wang P., Granados R. R. (2000): Calcofluor disrupts the midgut defense system in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 135-143.
- White, G., F. (1912). The cause of european foul brood. *Secondary.:* U.S. Dept. of Agriculture, Bureau of Entomology.
- White F. (1906): *The bacteria of the apiary: With special reference to bee diseases*, Washington : Government Printing Office, Washington DC, 60.
- Wiedemann I., Breukink E., Van Kraaij C., Kuipers O. P., Bierbaum G., De Kruijff B., Sahl H. G. (2001): Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid ii combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 1772-1779.
- Winkelmann G. (2002): Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society Transactions* **30**, 691-696.
- Yuan M., Breitkopf S. B., Yang X. M., Asara J. M. (2012): A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nature Protocols* **7**, 872-881.
- 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.
- Zor T., Seliger Z. (1996): Linearization of the bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. *Analytical Biochemistry* **236**, 302-308.

7 Seznam použitých zkratek

AA	akrylamid
AFB	american foulbrood (anglický překlad moru včelího plodu)
AmP	antimikrobiální peptidy
APS	persíran sodný
BIS	methylenbisakrylamid
BME	betamerkaptoethanol
CAZy	databáze enzymů degradujících, tvořících a modifikujících glykosidické vazby
CBB	barvivo Coomassie Brilliant Blue
CW	chitin detekující barvivo Calcofluor White
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EFB	european foulbrood (anglický překlad hniloby včelího plodu)
ERIC	enterobacterial repetitive intergenic consensus – repetitivní sekvence v genomu některých bakterií sloužící pro genotypizaci
GH	glykosylhydrolasa
HR-ESI-MS	vysokorozlišovací hmotnostní spektrometrie s ionizací elektrosprejem
LAB	lactic acid bacteria (anglický překlad bakterií mléčného kvašení)
LC	letální koncentrace
LiDS	dodecylsíran lithný
LPMO	lytická polysacharidový monooxygenasa
LT	letální čas
MYPGP	kultivační médium
NCBI	genová databáze National Center for Biotechnology Information
NRPS	neribosomální peptidové synthetasy
NRPS-PKS	neribosomální polyketidové peptidové synthetasy
OD	optical density (optická hustota)
OmpF/OmpC	porinové kanály
PCP	thiolační doména neribosomálních peptidových synthetas
<i>pI</i>	isoelektrický bod
PKS	polyketidové synthetasy
PM	peritrofická membrána
SDS	dodecylsíran sodný

TE thioesterasová doména neribosomálních peptidových syntetas
TEMED Tetramethylethyldiamin